



Title	Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8 : VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy
Author(s)	田中, 太晶
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59710
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	田 中 太 晶
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 9 4 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8: VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy (マウス骨肉腫高肺転移亜株LM8における肺転移形成の動的解釈-VEGFは抗転移治療のターゲットとなりうる-)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 秀樹 (副査) 教 授 森井 英一 教 授 森 正樹

られた。

論文審査の結果の要旨

LM8は大阪大学医学整形外科と大阪府立成人病センターで樹立されたきわめてユニークな実験系で、親株のDunn骨肉腫が全く肺転移を起こさないのに比べ、同種同所移植モデルにおいて、4-5週で100%肺転移を引き起す。

本研究ではこのモデルを用いて、転移の各stepを評価できる実験系を種々確立し、きわめてユニークな実験結果を見いたしました。すなわち、

1. Circulating tumor cells(CTC) は LM8 で移植後早期より循環血液中に現れ、その頻度、数は Dunn に比べて多い。
2. LM8 由来の CTC は、Dunn 由来の CTC に比べ、浮遊状態での増殖能力が高く、anti-anoikis 活性を有する。
3. 肺の内皮細胞層を通過する過程(transendothelial migration, TEM)においては、LM8 が Dunn に比べ TEM の能力が高く、また endothelial cell の分裂を引き起す活性も高い。
4. TEM, endothelial cells の分裂を引き起す能力は VEGF-dependent で VEGF-TKI である pazopanib により抑制される。
5. マウス動物実験モデルで、移植後早期に原発巣を切除し、その後 pazopanib を経口投薬すると、肺転移数、CTC 数、血中 VEGF がすべて抑制される。

とりわけ CTC を生きた状態で同一個体より連続して分離、解析するのは世界に例がなく、初めての報告と考えられ、博士 (医学) の学位授与に値する。

論文内容の要旨

〔目的(Purpose)〕

転移形成には1.原発巣から血管内への腫瘍細胞の侵入(intravasation) 2.流血中の生存3.血管内から転移先への運動(extravasation) 4.転移巣での増殖(colonization)の4つのステップが想定されている。血中循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cells, CTCs)は上記1から3の過程において重要な役割を果たしており、転移能の評価ツールとして有用である。CTCsの検出法については抗体やRT-PCRを用いる方法など報告されているが、どれも血中に存在する生細胞のみならず死細胞を認識するため、実際の生きたCTCを反映していない可能性がある。本研究では、生細胞のみを培養、検出する方法を用いて、同系マウス(高肺転移マウス骨肉腫株LM8と肺転移を認めない親株Dunn)におけるCTCsの動的・経時的な解析を行った。

〔方法ならびに結果(Methods/Results)〕

高肺転移マウス骨肉腫株LM8と肺転移を認めない親株Dunnを用いた。Dunnを同系マウスC3Hに皮下移植すると、肺転移を認めないが、LM8は4~5週で全例肺転移を形成する。①in vivo皮下移植後で1週毎に採血を行い、CTCsを培養・検出し、両細胞株においてCTCsの出現時期、頻度を解析した。②両細胞株において原発巣とCTCの浮遊培養を行い、増殖能を評価した。③腫瘍細胞が血管内皮細胞に浸潤するextravasationを模倣したtransendothelial migration assayのビデオ撮影を行い、内皮細胞への浸潤能を評価した。また血管内皮細胞の分裂回数を評価した。④1型コラーゲンを用いて肺、軟部組織を模倣する環境(硬度)を作成、3次元培養を行い、その増殖能を評価した。⑤VEGFR TKIであるpazopanibを用いてpermeability assay、transendothelial migration assay、血管内皮細胞の分裂回数を評価した。⑥LM8の原発巣切除モデルに対してpazopanibの連日経口投与を行い、肺転移巣、CTC数、VEGF濃度を評価した。①~④のすべての実験においてLM8が転移に関して優位な結果を得た。⑤からはVEGFによって宿主側内皮細胞の細胞-細胞間隙が開くことによって、TEMが亢進するもの、pazopanibによってその効果が阻害されること。⑥によつてin vivoにおいてもpazopanibの投与は肺転移巣の有意な減少を認めた。

〔総括(Conclusion)〕

LM8はDunnに比べ血管内皮増殖因子(VEGF)産生が高く、運動能も約2倍高いことが報告されている。またVEGFは血管新生を促進するのみでなく、血管透過性を促進することが報告されている。LM8の高肺転移性は高い運動能を持つこと、浮遊培養下での増殖能、肺を模倣する環境での増殖能、宿主側の血管内皮細胞に対して透過性を促進し血管内皮のパリア機能を減弱させることと考えられた。VEGFR TKIであるpazopanibは抗転移治療のひとつ候補となりうると考え