

医研 第346号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

In Vivo Gene Transfer between Interacting Human Osteosarcoma Cell  
Lines is Associated with Acquisition of Enhanced Metastatic Potential  
(in vivo 解析による骨肉腫細胞間遺伝子伝達の肺転移能獲得の検討)

氏名 菅 銘 伴 則



|   |   |    |    |   |   |   |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|----|----|---|---|---|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|
| 私 | 達 | は  | i  | n | v | i | v  | o  | で  | 骨  | 肉  | 腫  | 細 | 胞 | 同 | 士 | の |   |   |
| 遺 | 伝 | 子  | 伝  | 達 | が | 肺 | 転  | 移  | の  | 獲  | 得  | に  | 関 | 与 | す | る | こ | と | を |
| 報 | 告 | し  | た  | 。 |   |   |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |
| T | E | 8  | 5  | ヒ | ト | 骨 | 肉  | 腫  | 細  | 胞  | 株  | か  | ら | 分 | 離 | し | た | 高 |   |
| 転 | 移 | 株  | 1  | 4 | 3 | B | と  | 低  | 転  | 移  | 株  | M  | N | N | G | / | H | O | S |
| へ | そ | れ  | ぞ  | れ | 緑 | 色 | 蛍  | 光  | タン | パク | 質  | (  | G | F | P | ) | , |   |   |
| 赤 | 色 | タン | パク | 質 | ( | R | F  | P  | )  | を  | 形  | 質  | 導 | 入 | し | た | 。 |   |   |
| 異 | な | る  | 色  | の | 蛍 | 光 | タン | パク | 質  | を  | 導  | 入  | す | る | こ | と | に |   |   |
| よ | っ | て  | ,  | 緑 | 色 | ま | た  | は  | 赤  | 色  | の  | 発  | 光 | す | る | 転 | 移 | 巣 | が |
| 形 | 成 | さ  | れ  | , | ど | の | 株  | の  | コロ | ニー | が  | 判  | 別 | で | き | る | よ |   |   |
| う | に | な  | る  | 。 | こ | れ | ら  | の  | 蛍  | 光  | タン | パク | 質 | を | 導 | 入 | し |   |   |
| た | 細 | 胞  | 株  | を | 単 | 独 | も  | し  | く  | は  | 混  | 合  | し | て | ヌ | ー | ド | マ | ウ |
| ス | の | 脛  | 骨  | へ | 移 | 植 | し  | て  | 自  | 然  | 肺  | 転  | 移 | モ | デ | ル | を | 作 | 成 |
| し | た | 。  |    |   |   |   |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |
| 1 | 4 | 3  | B  | - | G | F | P  | (  | 高  | 転  | 移  | 株  | ) | と | M | N | N | G |   |
| / | H | O  | S  | - | R | F | P  | (  | 低  | 転  | 移  | 株  | ) | を | 混 | 合 | し | て | 脛 |
| 骨 | へ | 移  | 植  | し | た | モ | デ  | ル  | で  | は  | ,  | M  | N | N | G | / | H | O | S |
| R | F | P  | を  | 単 | 独 | 移 | 植  | し  | た  | モ  | デ  | ル  | と | 比 | 較 | し | て | 約 | 8 |
| 倍 | の | M  | N  | N | G | / | H  | O  | S  | -  | R  | F  | P | の | 転 | 移 | 巣 | を | 形 |
| 成 | し | た  | 。  | 一 | 方 | , | 1  | 4  | 3  | B  | -  | G  | F | P | と | M | N | N | G |

\*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

(20×20)

|   |   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
|---|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| / | H | O        | S        | -        | R        | F        | P        | を        | 左        | 右        | 別 | 々 | の | 脛 | 骨 | へ | 移 | 植 | し |  |
| た | モ | デ        | ル        | で        | は        | M        | N        | N        | G        | /        | H | O | S | - | R | F | P | の | 転 |  |
| 移 | 能 | は        | 上        | 昇        | し        | な        | か        | っ        | た        | 。        | こ | の | こ | と | は | 、 | 2 | 種 | 類 |  |
| の | 細 | 胞        | 株        | が        | 混        | 合        | し        | た        | 腫        | 瘍        | 内 | 部 | で | 1 | 4 | 3 | B | - | G |  |
| F | P | の        | 存        | 在        | 下        | で        | M        | N        | N        | G        | / | H | O | S | - | R | F | P | の |  |
| 転 | 移 | 能        | が        | 上        | 昇        | し        | た        | と        | 考        | え        | ら | れ | た | 。 |   |   |   |   |   |  |
| 私 | 達 | は        | ま        | た        | 、        | 2        | 種        | 類        | の        | 細        | 胞 | 株 | を | 混 | 合 | 移 | 植 | し |   |  |
| た | モ | デ        | ル        | に        | お        | い        | て        | 1        | 4        | 3        | B | - | G | F | P | か | ら | M | N |  |
| N | G | /        | H        | O        | S        | -        | R        | F        | P        | へ        | K | i | - | r | a | s | 遺 | 伝 | 子 |  |
| が | 伝 | 達        | さ        | れ        | て        | い        | る        | こ        | と        | を        | 見 | 出 | し | た | 。 | 1 | 4 | 3 | B |  |
| - | G | F        | P        | 存        | 在        | 下        | で        | K        | i        | -        | r | a | s | 遺 | 伝 | 子 | の | M | N |  |
| N | G | /        | H        | O        | S        | -        | R        | F        | P        | へ        | の | 導 | 入 | が | 肺 | 転 | 移 | 能 | を |  |
| 上 | 昇 | さ        | せ        | る        | 可        | 能        | 性        | が        | 考        | え        | ら | れ | た | 。 |   |   |   |   |   |  |
| 今 | 回 | の        | 研        | 究        | で        | 骨        | 肉        | 腫        | 細        | 胞        | 株 | の | 肺 | 転 | 移 | 能 | 上 | 昇 |   |  |
| に | お | い        | て        | <i>i</i> | <i>n</i> |          | <i>v</i> | <i>i</i> | <i>v</i> | <i>o</i> | に | お | け | る | 遺 | 伝 | 子 | 伝 | 達 |  |
| が | 一 | つ        | の        | 可        | 能        | 性        | と        | し        | て        | 示        | 唆 | さ | れ | た | 。 | 今 | 回 | の | 結 |  |
| 果 | か | ら        | 、        | 蛍        | 光        | タン       | パク       | 質        | を        | 用        | い | た | イ | メ | - | ジ | ン |   |   |  |
| グ | は | <i>i</i> | <i>n</i> |          | <i>v</i> | <i>i</i> | <i>v</i> | <i>o</i> | で        | の        | 癌 | 細 | 胞 | 同 | 士 | の | 相 | 互 | 作 |  |
| 用 | を | 視        | 覚        | 化        | で        | き        | る        | 可        | 能        | 性        | を | 示 | 唆 | し | た | 。 |   |   |   |  |
|   |   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |




\*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

(20×20)

平成21年12月24日

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

|   |                       |             |   |
|---|-----------------------|-------------|---|
| 報告番号  | 課程博<br>* 第346号<br>論文博 | 氏名          | 當銘 保則   |
| 論文審査委員  | 審査日                   | 平成21年12月24日 |   |
|   | 主査教授                  | 森 直樹        |  |
|   | 副査教授                  | 西 巻 正       |  |
|   | 副査教授                  | 吉 見 直己      |  |
| (論文題目)  |                       |             |   |
| In vivo gene transfer between interacting human osteosarcoma cell lines is associated with acquisition of enhanced metastatic potential<br>(in vivo 解析による骨肉腫細胞間遺伝子伝達の肺転移能獲得の検討) |                       |             |   |
| (論文審査結果の要旨)   |                       |             |   |
| 上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。   |                       |             |   |
| 1. 研究に至る背景と目的   |                       |             |   |
| 骨肉腫は10代の小児に多く発生し、現在、化学療法と手術療法の組み合わせで5年生存率は60~80%と生命予後は改善してきている。しかし、初診時もしくは治療後に肺転移を生じる例では5年生存率は10~30%と低く、骨肉腫肺転移の克服に向けた研究が必要である。  |                       |             |   |
| 腫瘍細胞間の遺伝子伝達による多様性の報告はこれまでいくつかの報告がある。しかし、遺伝子伝達による肺転移能の獲得に関する報告は少ない。  |                       |             |   |
| 本研究の目的はマウス脛骨移植モデルを用いて、骨肉腫細胞間の遺伝子伝達による低肺転移骨肉腫細胞株の新たな肺転移能獲得の可能性を検討することである。  |                       |             |   |

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。

## 論文審査結果の要旨

## 2. 研究内容

## 実験1

骨肉腫細胞株として高肺転移ヒト骨肉腫細胞株 143B と低肺転移ヒト骨肉腫細胞株 MNNG/HOS を用いた。実験動物にはヌードマウス 4~6 週齢雌を用いた。In vivo で両細胞株を識別するために、異なる色の蛍光タンパク質 GFP と RFP をそれぞれ 143B と MNNG/HOS へ形質導入し、143B-GFP 細胞と MNNG/HOS-RFP 細胞を作製した。実験系は脛骨移植モデルとして 1. 単独移植 (両細胞株をそれぞれ単独移植)、2. 混合移植 (両細胞株の混合移植とコントロール: MNNG/HOS-RFP の単独移植)、3. 左右別移植 (両細胞株を同一マウスの左右別に移植) の 3 群をデザインした。移植後 6 週でマウスを屠殺し肺を採取後、蛍光顕微鏡を用いて肺転移を評価した。

その結果、単独移植では 143B-GFP 移植マウスでは多数の緑色発光肺転移巣を認め、MNNG/HOS-RFP 移植マウスでは赤色発光肺転移数はわずかで蛍光タンパク質導入による肺転移能の影響はないと確認できた。混合移植では低肺転移株 MNNG/HOS-RFP の赤色発光肺転移巣を多数認め、MNNG/HOS-RFP 単独移植したものと比べ、有意に赤色発光肺転移巣が増加していた ( $p < 0.01$ )。左右別移植では MNNG/HOS-RFP の赤色発光肺転移巣はわずかであった。

## 実験2

混合移植で高肺転移株 143B-GFP の *Ki-ras* が低肺転移株 MNNG/HOS-RFP 赤色発光肺転移株へ遺伝子伝達しているかを解析するため、RT-PCR 解析を行った。解析試料は混合移植での赤色発光肺転移巣とコントロールとしてマウス肺、MNNG/HOS-RFP 培養細胞、143B-GFP 培養細胞から RNA を抽出した。分析遺伝子は *Ki-ras*、positive コントロールとして human  $\beta$ -actin、コンタミネーションの確認として GFP を解析した。

その結果、混合移植での赤色発光肺転移巣では GFP の発現は認められず、*Ki-ras* の発現を認めた。一方 MNNG/HOS-RFP 培養細胞では *Ki-ras* の発現は認めなかった。

以上より高肺転移株 143B-GFP と低肺転移株 MNNG/HOS-RFP を混合移植することで MNNG/HOS-RFP の肺転移能が上昇し、*Ki-ras* の遺伝子伝達によって MNNG/HOS-RFP がより高い肺転移能を獲得した可能性が示唆された。

## 3. 研究成果の意義と学術的水準

マウス脛骨移植モデルを用い、異なる肺転移能をもつ細胞を混合移植することで、*Ki-ras* の遺伝子伝達により新たな肺転移能を獲得する可能性を明らかにした。今後、レトロウイルスによる感染の可能性を含めた *Ki-ras* の遺伝子伝達の様式、頻度、機能的発現の有無や遺伝子伝達阻害による肺転移の抑制の可能性を検討することによりいまだ明らかにされていない骨肉腫肺転移の病態解明につながると思われる。本研究は整形外科領域において重要な基礎研究であり、国際的にも高く評価されるものであると判断される。

以上より、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。

2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。

3 \*印は記入しないこと。