

OIKIRI H, ASANO Y, MATSUSAKI M, AKASHI M, SHIMODA H, YOKOYAMA Y. Inhibitory effect of carbonyl reductase 1 against peritoneal progression of ovarian cancer: evaluation by ex vivo 3D-human peritoneal model. *Mol Biol Rep.* 2019;46:4685-4697. doi:10.1007/s11033-019-04788-6.

人工ヒト腹膜組織を用いた Carbonyl reductase 1 による卵巣癌腹膜播種抑制効果の形態学的解析

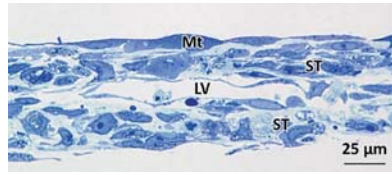
国立病院機構弘前病院 産婦人科
弘前大学大学院医学研究科 産科婦人科学講座
追 切 裕 江

【緒言】 当講座では、卵巣癌の遺伝子治療における研究をおこなっている。当講座で着目しているのが、Carbonyl reductase 1 DNA (以下、CR-1) である。CRはカルボニル還元酵素で、ヒトでは1, 2, 3, 4が存在する。肝臓、皮膚、腎、血管内皮など様々な臓器で発現しており、内因性生理活性物質や異物、薬物の代謝に関与している。これまで当講座では、CR-1と腫瘍制御の関係として、CR-1の発現が低下している上皮性卵巣癌は予後が悪いこと (M Umemoto et al. 2001)、マウス卵巣癌細胞株でCR-1を強発現させると、腫瘍増殖が抑制されること (H Wang et al. 2012)、ヒト卵巣癌細胞株でCR-1発現を低下させると腫瘍増殖が促進され、他臓器への転移頻度も増加すること (Y Osawa et al. 2014)、CR-1がTNFR1を介してcaspase-8, 3を活性化させ、アポトーシスを誘導すること、NF- κ B, c-junに関連する炎症や抗アポトーシス効果を抑制することで抗腫瘍効果を発揮している可能性 (R Miura et al. 2015) などについて報告してきた。最近では、DNAのデリバリーツールとしてdendrimerを用いてhCR-1 DNAを導入し、卵巣癌マウスの生存期間が有意に延長したという結果を得た (A Kobayashi et al. 2016)。しかし、これらはすべてin vivoでの結果であり、そこまでにいたる腫瘍細胞の経時的変化についてみたものはない。

そこで着目したのが、弘前大学と大阪大学で共同開発した人工ヒト腹膜組織である。これは、線維芽細胞、リンパ管内皮細胞、中皮細胞を特殊な方法でコーティング後に積層培養して作成した三次元腹膜モデル (図1)、これを用いた上皮性卵巣癌腹膜播種モデルでは、癌細胞の中皮への接着、増殖と浸潤、さらに血管/リンパ管侵襲までをin vitroで観察することができる。本研究の目的は、人工ヒト腹膜組織を用いて上皮性卵巣癌腹膜播種モデルを作製し、Carbonyl reductase 1 (CR1) DNA-デンドリマー複合体導入による癌腹膜播種初期動態の変化から、CR1による遺伝子治療効果の機序を明らかにすることである。

【方法】 ①人工ヒト腹膜組織に漿液性卵巣癌細胞 (HRA) を播種し、播種動態を形態学的に解析した。②その播種過程をマウスin vivoモデルと比較し、本卵巣癌播種モデルの妥当性を検証した。③本in vitroモデルにCR1DNAを導入し、癌細胞播種の抑制効果を経時的に解析した。

【結果】 ①SEMでは、HRA細胞が穿孔を形成しながら、中皮層に侵入し、24-72時間後には中皮間で増殖し集塊を形成していた (図2-1)。断面で見ると比較的早期に中皮下への浸潤がみられ、24時間後にはリンパ管への侵襲もみられた (図2-2)。TEMでは、HRA細胞が中皮細胞に間隙を形成しながら接着していた。中皮下で集塊を形成しながら浸潤したHRA細胞同士は細胞間接着装置で結合していた (図2-3)。②マウスの腹腔内にHRA細胞を投与し、癌性腹膜炎モデル (図3-1) を作成し観察した。腹腔内投与3日後のSEM像では、HRA細胞の中皮への接着像がin vitroの6時間後の所見と類似していた (図3-2)。腹腔内投与9日後のHE染色像では、HRA細胞の浸潤像がin vitroの72時間後の所見と類似していた (図3-3)。以上より、本in vitroモデルにおける卵巣癌腹膜播種動態の再現性を確認できた。③人工腹膜にHRAのみ、HRAとdendrimer、HRAとCR1DNA/dendrimer複合体を播種し、HRA細胞増殖の経時的変化をSEM像で観察した (図4-1)。CR1DNAを導入した場合、コントロール (HRA, dendrimer) に比べ増殖が抑制されていた。SEMと同様に播種し、HRA細胞増殖の経時的変化を断面で観察した (図4-2)。中皮



Mt: mesothelial cell
ST: stroma-like tissue
LV: lymphatic vessel

图 1

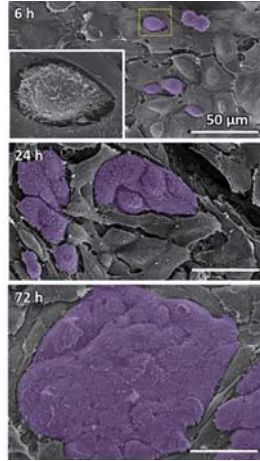


图 2-1

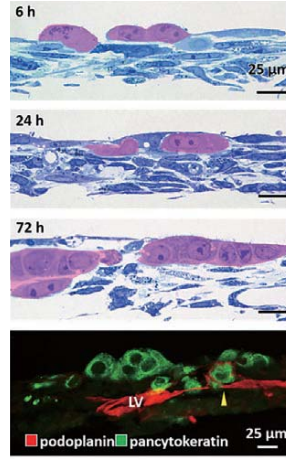


图 2-2

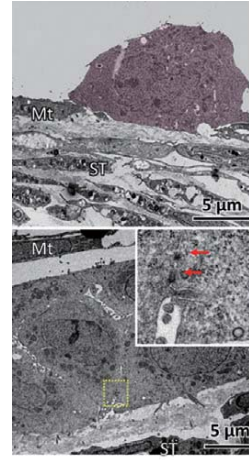


图 2-3

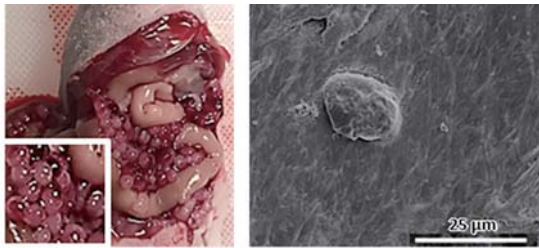


图 3-1, 3-2

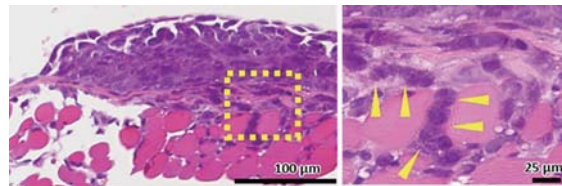


图 3-3

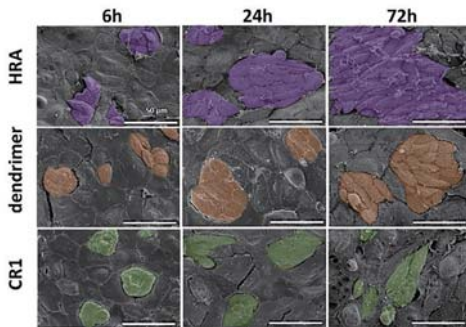


图 4-1

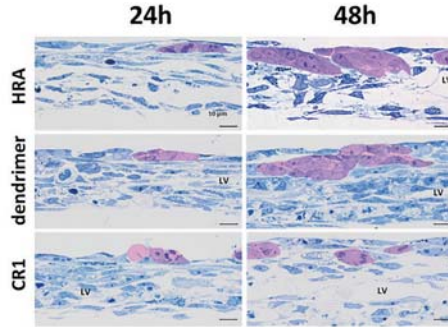


图 4-2

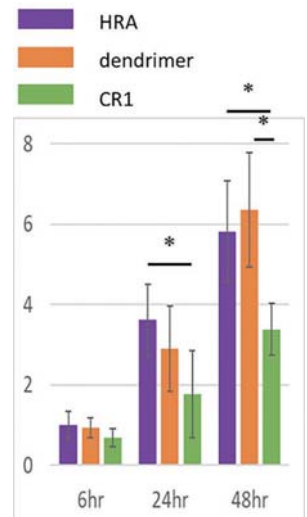


图 4-3

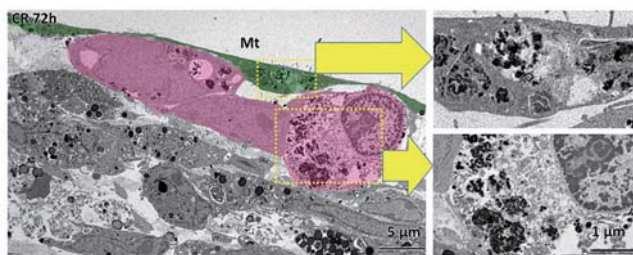


图 4-4, 4-5

下に浸潤した癌細胞は CR1DNA 導入により減少し、腫瘍増殖抑制効果が強く示唆された (図4-3)。人工腹膜に HRA と CR1DNA/dendrimer 複合体を播種し72時間経過した TEM 像では、中皮下に HRA 細胞のネクロシス像がみられた (図4-4)。また、高電子密度の粒状構造物で示される CR1-DNA/dendrimer 複合体の取り込みは腫瘍細胞だけでなく、中皮細胞にも取り込まれており、これが何かしら結果に影響を及ぼしている懸念もある (図4-5)。

【考察】 癌細胞は接着、増殖、浸潤をおこなうが、本研究の癌性腹膜炎モデルにおいて、CR1 の効果が最も発揮されたのは細胞増殖の過程と考えられた。そしてその機序としてネクロシスが関与している可能性が示唆された。in vivo の先行研究ではアポトーシスの誘導が示されていたが、今回の解析ではネクロシスの誘導も強く関与している可能性が示唆された。人工腹膜と生体の大きな違いとして、免疫細胞が存在しないこと、血流やリンパ流などの流れがないことが挙げられ、これらが今回の結果に影響した可能性もある。

【結論】 人工ヒト腹膜を用いた新たな in vitro 腹膜播種モデルにより、CR1 導入による増殖抑制とネクロシス誘導を通じた卵巣癌腹膜播種抑制効果が示唆された。今後、研究をすすめ、遺伝子治療へ臨床応用していきたいと考えています。