

## 論文要旨

### Molecular analysis of estrogen dependent breast cancer in animal model and cell lines エストロゲン依存性乳がんの動物モデルおよび細胞株の分子生物学的解析

M. Jerald Mahesh Kumar

乳がんは女性の悪性腫瘍として最もよく見られ、エストロゲン受容体(ER)に着目した場合、乳がんの約70%がER陽性でエストロゲン依存性である。マウスの乳がんモデルは、乳がんの本来の生物学的性質を研究する上で、最も有用である。しかし、従来のマウスモデルにおいて、エストロゲン依存性乳がんはまれであり、そのモデルの確立が待ち望まれていた。私は、自然発症のエストロゲン依存性乳がんモデルマウスを新たに開発し、さらにそのマウスより確立した細胞株(MAC51)も含めて、分子生物学的解析を行った。

インド国立細胞分子生物学センター(CCMB)、動物実験施設のNIHヌードマウスコロニーにおいて生産に用いられているメスのヌードヘテロマウスの1匹で乳がんが認められた。このマウスをFounderとして兄妹交配を実施し、乳がんを高率に発症する中規模のヘテロマウスコロニーを確立した。乳がんは、生産を行っているメスのマウスでのみ、とくに多くは2回目の経産以降に観察された。交配をさせていないマウスでは、生涯、がんの発生は認められなかった。42匹の交配メスマウス中、26匹に乳がんの発生を認めた(発症率62%)。乳がんの発症月齢は、3.5から12か月であり、平均発症月齢は、7か月であった。腫瘍は、右側あるいは左側の乳腺に発症する片側性であり、2番目あるいは5番目あるいはその両方にのみ観察された。安楽死時点での平均体重は、 $33.5 \pm 0.68$  g、腫瘍の平均サイズは、 $3.6$  cm  $\times$   $3.2$  cm  $\times$   $2.8$  cm (長さ  $\times$  幅  $\times$  高さ)であった。

血液生化学検査では、乳がんマウスのヘモグロビン量の軽微な上昇、白血球数および好中球数( $p < 0.01$ )の有意な増加が、正常マウスに比し認められたが、赤血球数およびリンパ球数は、有意に低下していた( $p < 0.05$ )。乳がんマウスの血清中アラニンアミノ基転移酵素(SGOT)およびアスパラギン酸アミノ転移酵素(SGPT)レベルは、正常マウスに比べ、有意に上昇していたが( $p < 0.01$ )、アルブミンおよび総タンパク量に変動はみられなかった。乳がんマウスでは、エストロゲン量が、異常に高かったが( $p < 0.01$ )、プロゲステロンおよび血糖値に関しては、有意差は観察されなかった。

細胞学的検査では、細胞は多型性、紡錘状、円形、多角性あるいは印章様で正常あるいは空胞を持った細胞質の大小細胞であり、偏心性あるいは中心性の核を持つ。肉眼所見では、腫瘍塊は多葉性であり、各葉は、中心に壊死組織がある固形多結節を保有していた。組織学的には、腫瘍塊は良く分化した(グレード1)、管腔上皮様の形態に類似していた。腫瘍の管腔上皮様細胞は、血行性およびリンパ行性に、局所リンパ節、肝臓、心臓、肺、脾臓、脳への転移が認められた。電子顕微鏡観察では、腫瘍塊に数多くの小胞体と分泌顆粒を含んだ円形から楕円形の暗い上皮細胞が観察された。

正常の乳腺に比し、すべての乳がんマウスの悪性上皮細胞には、ER $\alpha$ 、K18、K19、PCNAの高発現および p53 遺伝子の低発現が観察された。電子顕微鏡観察では、腫瘍細胞にウイルス様粒子は観察されず、腫瘍組織および近交系マウス組織から、マウス乳がんウイルス(MMTV)の Long terminal repeat(LTR)特異的プライマー(FPC1 & RP)を用いた RT-PCRによっても、MMTVは検出されなかった。ホルモン感受性試験、エストロゲン、プロゲステロンレベルおよび腫瘍サイズは、卵巣切除術および抗エストロゲン剤 tamoxifen 投与群では、処置後7日目以降に減少した。

MAC51(乳腺がん細胞株)は、番号51の動物由来であり、上皮様形態を示し、核には多数の核小体を保有する。最適な培養条件は、ダルベッコの MEM(10%ウシ胎児血清含有)によって得られた。MAC51細胞の平均倍加時間は、15.4時間で、平均接着効率は、18.4%であった。免疫蛍光染色法で、ER $\alpha$ の高い発現が、細胞質で観察されたが、ER $\beta$ の発現は、腫瘍および MAC51細胞両方でまったく観察されなかった。

Real time PCR 法によって ER $\alpha$ 遺伝子の発現を定量したところ、乳がんマウスがん組織および細胞株で、正常の乳腺組織にくらべて各々、64倍および16倍の増加を認めた。腫瘍組織試料および MAC51細胞株で、アポトーシスタンパク(Bcl-2、caspase 3)を細胞質から核まで広範囲に検出したが、正常マウス乳腺と比べ、p53 タンパクの発現はほぼ同じであった。

ある種の乳がん細胞では、グルココルチコイド受容体(GR)機能が異常であり、GRのライガンドであるデキサメサゾンおよびカチオン性リポソーム DNA 複合体(DX-lipoplex)を用いることにより、DNAを効率よく導入できる。MAC51細胞は、GR発現がアフリカミドリザル由来細胞 COS-1に比較し、免疫蛍光染色法および ELISA法で明らかに高かったが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子の導入を指標とした DX-lipoplex と従来の Lipofectamine 法との比較では、逆にその導入効率は低かった。

アポトーシス関連遺伝子を発現するプラスミドを従来の Lipofectamine 法を用いて、MAC51細胞へ導入した。GFP-Bcl をトランスフェクションされた細胞は、細胞質で発現を認めたが、GFP-Bax をトランスフェクトされた細胞では細胞質、核両方に発現が観察された。GFP-Bad および Bid の MAC51細胞へのトランスフェクション後の発現効率は低かった。

ヌードマウスへの MAC51細胞の腫瘍移植実験では、 $3 \times 10^5$ 個の細胞を移植したところ、接種した部位において6日以内に触診可能な固形腫瘍形成があったが、 $3 \times 10^4$ 個では、触診可能な固形腫瘍形成までに15日間を要した。それら腫瘍は、その後、急速に大きくなり、自然発症モデルと同様、多結節様であった。組織学的にも転移の形態も自然発症モデルと良く似ていた。

私の作出した乳がん動物モデルは、ヒト乳がんの大部分を占める(約70%)型である、ER陽性、管状上皮型と良く類似しており、局所リンパ節および他臓器への転移を示す。この動物モデルはヒト乳がん研究およびその治療薬研究に、非常に有用であると思われる。