【総 説】

7. ヒトスキルス胃癌の腹膜播種性転移マウスモデルの開発

柳 原 五 吉

国立がんセンター研究所 実験動物管理室

Development of Mouse Models for Peritoneal Metastasis from a Human Scirrhous Gastric Carcinomas

Kazuyoshi YANAGIHARA

Central Animal Laboratory, National Cancer Center Research Institute

Summary

Scirrhous carcinoma of the stomach, known as diffusely infiltrative carcinoma or Borrmann's type-IV carcinoma, Linitis plastica-type, is characterized clinically as having the worst prognosis among various types of gastric cancers, because of frequent metastases due to peritoneal and pleural dissemination. However, the mechanisms responsible for the dissemination processes are not clearly understood. Therefore, establishment of relevant animal metastatic models is highly important for elucidating mechanisms and providing leads to therapeutic approaches. Transplants of human tumors in nude mice are increasingly used as experimental systems for this purpose. We have established two human signet ring cell gastric carcinoma cell lines (designated as HSC-44PE and HSC-58) from body fluids of Japanese patients with scirrhous gastric carcinomas. Subcutaneous injection of both cell lines into nude mice gave 100% tumor take rates with production of lymph node and lung metastases in 20% to 33% of recipients. We next established three sublines with highly peritoneal metastatic potential (designated as 44As3, 58As1 and 58As9) from the HSC-44PE and HSC-58 cell lines using the technique of repeated orthotopic implantation and limitation dilution, respectively. Peritoneal metastasis with ascites formation in 90% to 100% of recipients developed within 40 days after orthotopic injection of 44As3, 58As1 and 58As9 cells into nude mice. It is important to now elucidate the metastatic processes with each orthotopic model include all the steps leading to peritoneal dissemination. These models should be useful for analyzing the mechanisms of peritoneal metastasis of human scirrhous gastric carcinoma. The high reproducible metastasis and its short latency period should prove to be of advantage for the screening of agents active in suppression of metastasis.

はじめに

近年、胃癌の治療成績は向上しているにもかかわらず、スキルス胃癌（びまん浸潤性胃癌・4型胃癌）の予後は極めて不良である。スキルス胃癌は、肉眼的には腫瘍塊としてではなく、胃壁が広い範囲で板状を呈する硬い癌として認められる。病理組織学的には癌細胞は腺管を形成することなく、個々にバラバラとびまん性に浸潤し、胃壁は癌細胞の増殖に伴う繊維性組織

の増生によって肥厚している^{1,2)}。従って臨床的には早期診断が困難であり、発見時には既に腹膜播種性転移や遠隔リンパ節転移がみられることが予後不良の主な要因である。根治手術後も腹膜播種性転移（以下腹膜播種と記載する）が極めて起こりやすい特徴を持ち、再発死亡例の多くは腹膜播種によることが知られている³⁾。このように腹膜播種はスキルス胃癌の再発および転移形式の中でも極めて高頻度に認められ、予後を

本論稿は、第19回日本疾患モデル学会における投票結果に基づく優秀選抜論文である。

決定する重要な因子であるにもかかわらず、その機序は未だ明確ではない。この領域では「転移を制するものは癌を制する」という末舛恵一前国立がんセンター総長の名言を、「腹膜播種を制するものは胃癌を制する」と置き換えても過言ではなからう。

癌転移の成立には原発巣から転移巣形成まで複数のステップからなる複雑な過程をとる。癌細胞の進展様式からみて主なものとして血行性転移、リンパ行性転移、播種性転移がある。最近では転移に関わる遺伝子が同定され、転移という複雑な現象を徐々にではあるが分子レベルで説明できるようになってきた。このような分子生物学的研究への展開は動物実験で転移モデルが確立し、この実験系から転移能の異なる癌細胞株が樹立されたことに始まっている⁴⁾。動物モデルを用いて転移する細胞の動態が個体レベルで解析され、転移の大まかな経路が理解されるようになった⁵⁾。さらに癌細胞は発生する母地（組織・臓器）により微小環境が異なっており、増殖、浸潤様式、および転移の過程も異なることが知られている。また転移する癌細胞の性質も多彩である。たとえ同じ臓器に由来する癌であっても、異なる分子が関与する複数の経路が存在する可能性がある。従って、臨床癌についても個々の癌細胞系で成り立つ現象をそれぞれ個別に解析し、検証を加える必要がある。

ヒト胃癌の腹膜播種においても、癌細胞がどのようにして原発巣から腹腔内に剝脱・遊離し、いかなる機

序で腹膜に着床し、癌性腹膜炎に進展していくかのメカニズムは推測されていても確固たる証拠に基づいている研究は極めて少ない^{6,7)}。腹膜播種の動物実験モデルとして、培養胃癌細胞を腹腔内に直接接種する報告があるが^{7,8)}、臨床でみられる癌性腹膜炎を反映したものとは言い難い。従来、“原発巣が進展して確実に腹膜播種を起こすモデルを得る”のは困難と考えられてきた。しかし、臓器癌（スキルス胃癌）の特徴を持つ癌細胞を樹立し、それを用いて臨床に対応できる腹膜播種のモデルを確立することは、極めて重要である。技術的にも難しく、研究としてもリスクなこの課題に愚直にも挑戦することにしたのは、今から9年前である。

ヒトスキルス胃癌由来培養細胞株の樹立

腹膜播種の動物モデルを開発する戦略の手始めとして、スキルス胃癌に由来する培養細胞を樹立することから開始した。スキルス胃癌患者の体腔液中の癌細胞を培養材料として細胞株の樹立を試み、HSC-44PE並びにHSC-58, HSC-60の3細胞株の樹立に成功した。培養方法については報告している^{9,10)}ので本稿では省略する。既に樹立していた細胞HSC-39, HSC-40A, HSC-43, HSC-45⁹⁻¹¹⁾を加えた7株をヌードマウスに皮下移植し、造腫瘍性と自然転移能を検討した。また尾静脈注射による肺転移巣形成の有無で判別する実験転移能を検索した（Table 1）。新たに樹立したHSC-44PE並びにHSC-58細胞はリンパ節、肺で転移巣が

Table 1 Biological properties of established cell lines derived from human gastric scirrhus carcinoma.

Cell line	Origin		Tumor source	Histological typing		Tumor formation	Metastasis	
	Sex	Age		Original	Xenograft		Spontaneous	Experimental
HSC-39	M	54	As	sig (sci)	sig	10/10	0/10	0/10
HSC-40 A	M	54	X	sig (sci)	sig	10/10	0/10	0/10
HSC-43	M	56	T	sig (sci)	por/sig	10/10	0/10	0/9
HSC-45	F	28	As	sig (sci)	sig	10/10	0/10	0/9
HSC-44 PE	F	28	P	sig (sci)	sig	10/10	2/10	3/10
HSC-58	M	57	As	por/sig (sci)	por/sig	10/10	3/10	3/10
HSC-60	M	40	As	sig (sci)	sig	10/10	0/10	0/10

As, ascitic tumor; T, primary tumor; X, xenotransplantable tumor; P, pleural effusion. Histological typing of the gastric carcinoma follow that of the Japanese Classification of Gastric Carcinoma (1999). sig, signet-ring cell carcinoma; sci, tumor with scirrhus stromal reaction; por, poorly differentiated adenocarcinoma. Viable cultured cells ($2 \times 10^6/0.2$ ml) were injected s.c. into 6-week-old BALB/c nude mice. Number of mice with tumors or metastatic nodules/number of mice given injection. Autopsy of mice bearing tumors was performed 180 days after injection. To test the experimental metastatic potential, viable cells ($1 \times 10^6/1.0$ ml) were injected into the lateral tail vein of nude mice. Six weeks later, mice were killed and the lungs were removed, and metastasis were counted under a dissecting microscope.

観察され、自然転移する（20～30％の頻度）ことが判明した。この皮下腫瘍の病理組織像は腫瘍の境界が極めて不明瞭で、かつ腫瘍周囲のリンパ管への浸襲がみられるなど浸潤能が極めて高い傾向を示した。これはHSC-39 など他のスキルス胃癌由来培養細胞では全くみられない。初代培養細胞を移植したマウスでも転移巣が観察された成績より、両細胞の持つ転移能は培養中の選択・変異等により獲得したのではなく、植え込んだ培養材料に既に転移能を持つ悪性度の高い細胞が存在していたことは明白である。

次に、この自然転移能を有する胃癌細胞を本来の臓器である胃壁内に同所性移植を行った。培養細胞をトリプシンにて分散し、細胞浮遊液を調整し、 1×10^6 個/0.05 ml/head の割合で胃大湾部（腺胃部）に30Gの注射針にて注入した。この移植された細胞は粘膜下組織で増殖することが知られており¹²⁾、ヒトの癌が粘膜から発生することを考えると、臨床腫瘍の浸潤様式に類似した適切な移植法と思われる。HSC-44PE 並びにHSC-58 細胞とも移植部位に腫瘍を形成し、胃壁全体の肥厚をきたした。胃重量も増加し無処置の2～3倍を示した。この腫瘍の病理組織像は、腫瘍周囲だけでなく、中心部においても線維芽細胞などの間質増生の目立つ部分もみられたが、全体的には間質成分に乏しく印環細胞が蜂巢状構造をとり、髄様性を呈していた。著明な間質増生・線維化がスキルス胃癌の組織学的特

徴の一つであることは前述したが、これは再建することができなかった。

さらにHSC-44PE 並びにHSC-58 細胞の同所性移植は、頻度は低いが、大網、腸間膜、体壁腹膜、横隔膜等に播種巣を認めた。また腋下リンパ節への遠隔転移、肝臓への転移も認められる症例もあった。極めて希ではあったが、血性腹水の貯留が観察された。この血性腹水の形成は臨床でみられる癌性腹膜炎に類似しており、腹膜播種モデルの樹立の可能性を大いに期待させる所見と思われた。

腹膜播種動物モデルの樹立

そこで、同所性移植後、癌性腹膜炎を惹起したマウスの腹水中の癌細胞を培養し、増殖してくる細胞を再び同所性移植した。この操作を繰り返し行い（11回以上）、より播種性転移能の高い、形質の安定した細胞株の分離を試みた。着想から樹立まで長い年月が経過したが「原発巣が進展して確実に腹膜播種を起こすモデル」を手にすることができたので、以下にその生物学的特性について記述する（Table 2）。最初にHSC-58 細胞から高率に癌性腹膜炎を生じる2つの腹膜播種性転移株（58As1, 58As9）を樹立した。58As1 および58As9 細胞は同所性移植後、4～5週で血性腹水が貯留し、大網、腸間膜、体壁腹膜、横隔膜などに播種し、死に至る（Fig. 1）。しばしば肝臓、リンパ節、希に腎臓、卵巣にも転移巣がみられた。時には胸水の貯留も

Table 2 Metastasis and peritoneal dissemination after the orthotopic inoculation of cell lines.

Cells	Survival days	Tumor	Ascites	Metastasis				Peritoneal dissemination			
				Liv.	L.N.	Kid.	Ov.	Omentum	Mesenterium	Parietal peritoneum	Dia-phragm
44As3	25.6 (16-33)	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
HSC-44PE	157 (92-160)	+	-	-	--+	-	-	--+	--+	--+	--+
58As1	29.3 (22-35)	+	+	++	++	+	+	++	++	++	++
58As9	38.8 (22-53)	+	+	++	++	+	+	++	++	++	++
HSC-58	81.2 (60-110)	+	-	--+	--+	-	-	--+	--+	--+	--+

Viable cultured cells (1×10^6 /0.05 ml) were inoculated into the middle wall of the greater curvature of the glandular portion of the stomach with 30G needles. The stomach was then returned to the peritoneal cavity, and the abdominal wall and skin was closed with a transmural suture. These mice were sacrificed 160 days after the tumor cells inoculation and peritoneal dissemination was evaluated from the number of tumor nodules in the mesentery.

A

B

Fig. 1. Macroscopic appearance of peritoneal dissemination. (A) Carcinomatous peritonitis was observed 4 weeks after orthotopic injection of 58As1 cells. Abdominal distention was evident from bloody ascites. (B) Peritoneal dissemination was recognized as innumerable whitish nodules in the abdominal cavity at the mesentery, omentum, parietal peritoneum and diaphragm.

認めた。58As1 細胞の増殖は親株に比べ、in vitro および in vivo で、いずれも速くなっていた。一方、親株 HSC-58 細胞の移植では約 12 週で瀕死となった。死亡時には軽度の腹膜播種は認められるものの、腹水形成は極めて希にしかみられない。

さらに、HSC-44PE 細胞からも同様の方法にて、高率に腹水貯留を惹起する腹膜播種性転移株 (44As3) を得ることができた。播種の形成部位は大網、腸間膜、体壁腹膜、横隔膜などに高率にみられた (Table 2)。肝臓、リンパ節への転移も高い頻度で認められた。44As3 細胞の in vitro での細胞増殖能、皮下移植での腫瘍形成能等は親株との明らかな差異は認めなかった。44As3 株は同所性移植後、約 3 週で血性腹水が貯留し、瀕死になるのに対し、親株の移植では約 18 週で死に至るが、腹水の形成は全く認められない。次に、この腹膜播種転移株を用いた動物モデルの有用性あるいは問題点について言及したい。

ヒト胃がんの腹膜播種の研究手段として

1) 腹膜播種の成立機構の解析への有用性

スキルス胃癌細胞が原発巣から剝脱・遊離し、どのようにして腹腔内に着床・増殖し、癌性腹膜炎に進展するかに関しては明らかではない。本研究で樹立した

モデルで重要なことは「胃壁粘膜内での浸潤増殖と腹膜播種および腹水の形成に至る癌性腹膜炎の全過程が再現でき、臨床に近似した動物モデルであり、かつ、培養細胞であるので定量性がある」ことである。従って、増殖・浸潤・転移の現象の形態学的解析と遺伝子発現の関連性、血性腹水貯留のメカニズム、微小環境の影響因子などの検討に有用であり、転移能を異にする細胞株間の遺伝子発現の比較解析から腹膜播種に関わる新規転移関連分子の単離なども可能となる。さらに様々な方法で同定された分子が腹膜播種性転移のどの過程に関与し、どのような働きをしているのかを個体レベルで検証できる利点も挙げられる。以上のように、今までアプローチの方法がなかった原発臓器での増殖から腹水形成までのカスケードに関与する遺伝子の単離並びにその機能解析が大きく進展することが期待される。

2) 薬剤の評価系としての可能性

抗がん剤開発におけるスクリーニングモデルの重要性については論を待たないが^{35,13)}、薬剤評価には大量の細胞と多数のヌードマウスを必要とし、また同所性移植には洗練された外科的手技も必須である。薬剤スクリーニングの際の必要条件に関しては、既に佐野ら

Fig. 2. Prolongation of survival time by CPT11. In the control (non treatment) group, >50% of mice died 27 days, and no animals survived >32 days after the inoculation of 58As1 cells. In contrast, when mice were treated with CPT-11, survival was significantly prolonged in a dose-dependent fashion as compared with control group. This experiment was done 3 times and gave similar results each time.

が総説¹⁴⁾で適確に述べている。大事な点なので引用し、本研究で樹立した腹膜播種株の動物モデルの条件を当てはめて検討したところ、3種類の転移株は「①増殖進展、播種・転移が臨床と近似している。②同所移植（胃壁）の生着率は100%である。③転移頻度は90~100%である。④実験の再現性が高い。⑤個体間の変動が少なく、実験群間の比較が可能である。⑥多数動物実験への適用が比較的容易である。」等の、いずれの条件にも合致していた。そこで、転移形質も極めて安定している58As1株の動物転移モデルで、CPT-11、ジェムサイタミン、およびイレッサ等の薬剤による抗腫瘍効果を検討した。CPT-11の静脈内投与群で、腫瘍の増殖・進展が抑制され、有意に生存日数の延長がみられ、それぞれの実験群間においても明らかな用量依存性が認められた (Fig. 2)。胃癌の病態との対応付けも可能であり、潜伏期の短い (40 日以内に死に至る) ことも使い易いモデルの条件と思われる。また臨床効果の予測モデルとしての特性は新たな分子標的医薬の創出に有力な手段となろう。

しかし、腹膜播種動物モデルを普遍的な薬剤評価系として実用化するには、適正な観察方法の確立が急務である。胃壁での腫瘍増殖、それに引き続く癌性腹膜炎の進展状況は、皮下腫瘍と異なり外部からは窺い知ることができない。薬剤処置後の観察は、腹囲、体重などの他に、細胞にマーカーを導入し、転移細胞の動

態をモニターする方法¹⁵⁻¹⁷⁾など客観的な指標を考慮すべきであろう。また、高い再現性を確保するためには、同所性移植には洗練された外科的手技が必須であり、かつ、大量の動物を使用する場合には技術レベルの均一性も要求される。

3) 異種動物移植系としての注意点

最後に、ヒト癌の転移研究に異種移植系を用いることの注意を敢えて述べる。一つはヒト癌を異種動物に移植するのであるから、免疫系が絡む現象の解析にはこのことを十分考慮すべきである。薬剤評価系としては、宿主での薬剤の分布や代謝がヒトとは異なることも認識する必要がある。

まとめ

異種移植で自然転移するヒトスキルス胃がん由来培養細胞株 (2 株; HSC-44/45, HSC-58) を樹立した。培養細胞の同所性移植を繰り返すことにより、高頻度に腹水形成に至る腹膜播種性転移株 (44As3, 58As1, 58As9) を樹立した。この転移株の動物モデルは、薬剤の評価系として応用可能であることが確認された。一連の高転移性細胞を用いた動物モデルは、ヒトスキルス胃癌の腹膜播種の病態解明や治療薬開発研究に有力な手段を提供することになろう。

文 献

- 1) Tahara, E. Growth factors and oncogenes in

- human gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, **116**: 121-131, 1990
- 2) 中村恭一：胃癌の構造 改訂第2版増補 (医学書院) 1993
 - 3) 曾和融生：スキルス胃癌の歴史的背景と問題点 (曾和融生, 井藤久雄 編著, スキルス胃癌・基礎と臨床, 医薬ジャーナル社) pp. 11-17, 1997
 - 4) Fidler, I.J. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature (New Biol)*, **242**: 148-149, 1973
 - 5) Fidler, I.J. Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metast Rev*, **5**: 29-49, 1986
 - 6) Yashiro, M., Chung, Y.-S., Nishimura, S., Inoue, T. and Sowa, M. Peritoneal metastatic model for human scirrhous gastric carcinoma in nude mice. *Clin Exp Metastasis*, **14**: 43-54, 1996
 - 7) Ishii, Y., Ochiai, A., Yamada, T., Akimoto, S., Yanagihara, K., Kitajima, M. and Hirohashi, S. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology*, **118**: 497-506, 2000
 - 8) Kotanagi, H., Saito, Y., Shinozawa, N. and Koyama, K. Establishment of a human cancer cell line with high potential for peritoneal dissemination. *J Gastroenterol*, **30**: 437-438, 1995
 - 9) Yanagihara, K., Seyama, T., Tsumuraya, M., Kamada, N. and Yokoro, K. Establishment and characterization of human signet ring cell gastric cell lines with amplification of the c-myc oncogene. *Cancer Res*, **51**: 381-386, 1991
 - 10) Yanagihara, K., Kamada, N., Tsumuraya, T. and Fumio, A. Establishment and characterization of a human gastric scirrhous carcinoma cell line in serum-free chemically defined medium. *Int J Cancer*, **54**: 200-207, 1993
 - 11) Yanagihara, K., Ito, A., Toge, T. and Numoto, M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res*, **53**: 5815-5821, 1993
 - 12) Takahashi, Y., Watanabe, M., Mai, M., Sasaki, T. and Fidler, I.J. Orthotopic implantation of stomach cancer. *Biotherapy*, **11**: 1011-1015, 1997
 - 13) 稲葉 實, 田代田鶴子：新評価システムとしてのヒト癌/ヌードマウスの意義 (野村達次, 櫻井欽夫, 稲葉 實 編著, ヌードマウスと抗癌剤評価, 蟹書房) pp. 92-132, 1991
 - 14) 佐野正樹, 村上孝司, 米倉和比古, 青柳空美夫, 山田祐司：制ガン剤開発からみた新しいヒト臓器ガンモデル—ヒトガンの同所再建・転移モデル—。アニテクス, **9**: 93-99, 1997
 - 15) Vooijs, M., Jonkers, J., Lyons, S. and Berns, A. Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res*, **62**: 1862-1867, 2002
 - 16) Nakanishi, H., Mochizuki, Y., Kodera, Y., Ito, S., Yamamura, Y., Ito, K., Akiyama, S., Nakao, A. and Tatematsu, M. Chemosensitivity of peritoneal micrometastases as evaluated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Cancer Sci*, **94**: 112-118, 2003
 - 17) Hoffman, R.M. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. *Lancet Oncol*, **3**: 546-556, 2002