

論文の内容要旨

論文題名 同系マウスを用いた大腸癌肝転移モデルの作成と遺伝子の解析
氏名 森本 恵

【序論】

癌の転移は、遺伝子変異が重要である発癌とは異なって、多くの遺伝子の発現量の変化が生じた結果起こると考えられている。肺転移モデルを用いた研究により、遠隔組織に転移するまでに、原発巣の癌細胞中の一部の細胞が転移性を獲得し、原発巣から離脱し、間質組織や血管に浸潤し、血管中を移動して、遠隔組織に浸潤し、増殖するという多くのステップを経ることが明らかとなった。また、転移性の高い癌細胞は、宿主の免疫細胞からの攻撃をかわし、間質系細胞や血管系細胞を再構築して腫瘍を形成する能力を持っていることが多い。これら全ての過程に関与する複数の遺伝子の発現に変化が起きていると考えられる。しかし、これらの複数の遺伝子の発現が変化する機構が全て理解されているわけではない。肺への転移性の違いによって発現量の異なる遺伝子で、分子機能も明らかになっているものはいくつか報告されており、細胞の運動性や浸潤性に関わる RhoC、autocrine motility factor receptor やヘパラーゼがそれである。細胞に遺伝子を導入した際に転移を増強または抑制するものとしては、乳癌の転移能を増強する *Mts1*、黒色腫・乳癌の転移能を抑制する *nm23* や *KiSS-1*、前立腺癌の転移能を抑制する *KAI1*、黒色腫の転移能・増殖性を抑制する *Elm1* などが挙げられる。一方、消化器癌の主な転移標的臓器である肝臓への転移を規定する遺伝子とその発現制御に関する知見は非常に少ない。

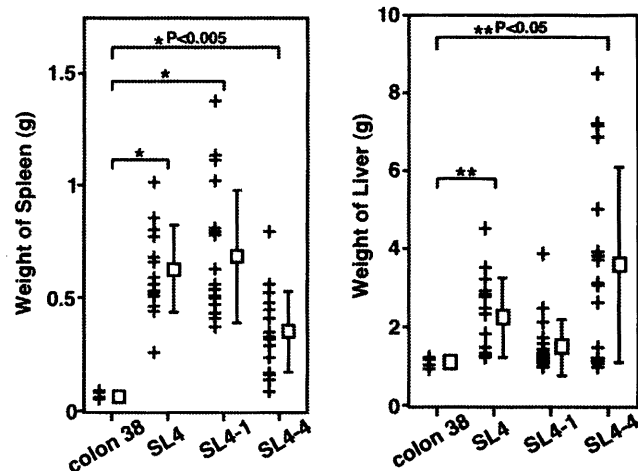
そこで私は、宿主との相互作用を考えるために有用である同系マウスを用いた大腸癌肝転移モ

デルを作成した。肝臓に高転移性バリエーション細胞を選別し、この細胞の特性を明らかにするとともに、発現量の変化している遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】

1. マウス大腸癌転移モデルの作成

マウス大腸癌細胞株 colon 38 は、脾臓内投与した際に肝転移巣を形成した。この肝転移腫瘍は線維化が起こり⁽¹⁾、宿主の免疫細胞の浸潤が見られ⁽²⁾、ヒトの大腸癌患者の肝転移巣で見られる現象がよく再現されていた。colon 38 細胞を同系 C57BL/6 マウスの脾臓に投与し、3 週間後に肝臓を摘出し、転移した癌細胞のみを培養し、再びマウスに投与した。これを 4 回繰り返すことにより、肝臓への高い転移性を持つ細胞株 colon 38-SL4 (SL4) を作成した。さらに限界希釈法によりクローン SL4-1、SL4-4 を得た。In vivo における移植した部位での造腫瘍性及び肝転移性は共に親株に比べ高転移性細胞株及びそのクローン株の方が高いことがわかった (Fig.1)⁽³⁾。



[Fig. 1] Evaluation of experimental primary tumor (left) and hepatic metastasis (right) by colon 38 cells, SL4 cells, and SL4 clones injected intrasplenically into C57BL/6 mice.

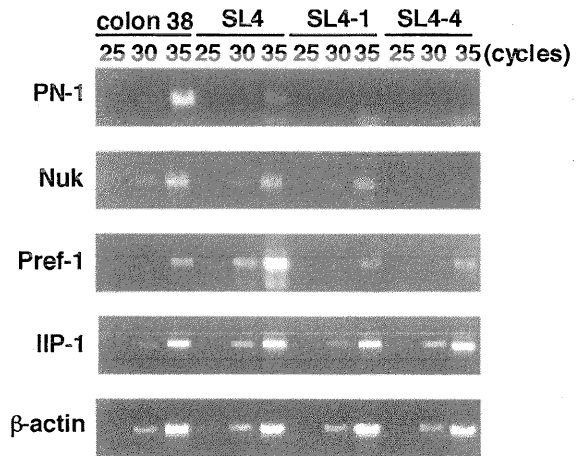
次に、この高転移性細胞株の生物学的性質を解析した。足場非依存的及び依存的増殖性は、共に親株に比べ高転移性細胞株及びそのクローン株の方が高かった。増殖速度の速い肝転移巣を持つ大腸癌患者は極めて予後が悪いことが知られており、臨床との相関が示された。しかし、肺への転移性と関連することが知られている運動性、ヘパラーゼ活性には差がなかった。また、細胞の形態及びアクチンフィラメントの形成を調べたが、アクチンフィラメントの形成と colon 38 バリエーション細胞の肝臓への転移性とは相関関係がないことが示された。また、本実験モデルでは脾臓内に移植した際の肝転移形成によって高転移性細胞株を選別したが、SL4 細胞は同所移植した際にも肝転移巣を高頻度に形成した。以上より、肝臓に高転移性を持つ大腸癌細胞の形質が、肺に高転移性を持つ黒色腫、乳癌、前立腺癌の細胞の形質と異なることが示された。

2. 親株と肝高転移性細胞株における遺伝子の発現量の比較

大腸癌の肝転移性に関与する遺伝子を明らかにするため、SL4 細胞に高発現または低発現している遺伝子を Mouse cDNA Expression Array と Differential Display 法を用いて解析し、それら遺伝子の転移性との関連を調べた。

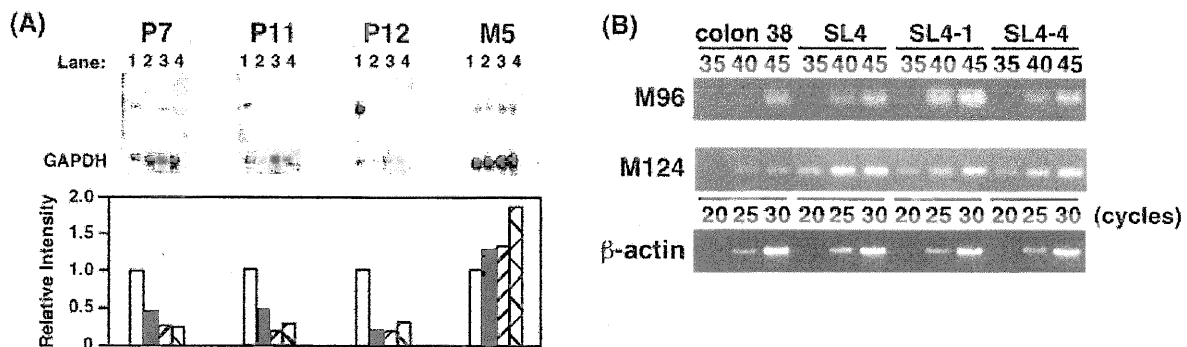
まず、Mouse cDNA Expression Array を用い、588 個の既知の遺伝子（癌関連遺伝子、増殖因子、

接着分子など) に関して colon 38 細胞と SL4 細胞での発現量の違いを Reverse Northern 法で検討した。発現強度が 3 倍以上違った 15 個の遺伝子について半定量 RT-PCR 法を用いて、発現量を確認した。プロテアーゼインヒビターであるネキシン-1 (PN-1) と Nuk キナーゼレセプター/EphB2 (Nuk) は SL4 細胞及びそのクローンに比べて colon 38 細胞において高発現であり、インターフェロン誘導タンパク質-1 (IIP-1) は colon 38 細胞で低発現であった (Fig. 2)。前脂肪細胞因子-1 (Pref-1) は SL4 細胞で高発現だが、そのクローン株での発現は低く、転移性との関係はなかった。



[Fig. 2] Semiquantitative RT-PCR analysis of genes identified by differential hybridization of the Atlas Mouse cDNA Expression Array using colon 38 cells, SL4 cells, and SL4 clones (SL4-1 and SL4-4 cells).

既知の 588 個の遺伝子を解析した結果からは、肝高転移性で増殖性の高い細胞に特徴的な遺伝子発現のパターンは明らかにされなかった。新規の分子が関与している可能性も視点に入れ、Differential Display 法による遺伝子同定を試みた。80 通りのプライマーの組み合わせについて Differential Display 法を行い、colon 38 細胞に高発現である遺伝子断片を 89 個、SL4 細胞、SL4-1 細胞、SL4-4 細胞に高発現である遺伝子断片を 127 個得た。これら遺伝子の配列を決定した。Reverse Northern 法、Northern Blot 法、および半定量 RT-PCR 法により、発現量に差があることを再確認した。その結果、P7 (translation initiation factor eIF-3)、P11 (collagen α I chain type VI)、P12 (destrin)、M5 (COP9 complex subunit 7a)、M96 (新規遺伝子)、M124 (Reelin) の遺伝子の発現量に大きな差異を見いだした (Fig. 3)。



[Fig. 3] Northern blotting analysis (A) of P7 (translation initiation factor eIF-3), P11 (collagen α I chain type VI), P12 (destrin), M5 (COP9 complex subunit 7a) and semiquantitative RT-PCR analysis (B) of M96 and M124 (Reelin) using colon 38 cells (lane 1), SL4 cells (lane 2), SL4-1 cells (lane 3), and SL4-4 cells (lane 4).

3. 転移関連遺伝子の *in vivo* で増殖した細胞及び大腸癌臨床標本における発現パターン

次に、これら colon 38 バリエーション細胞間で発現レベルの異なることが分った遺伝子が、直接、

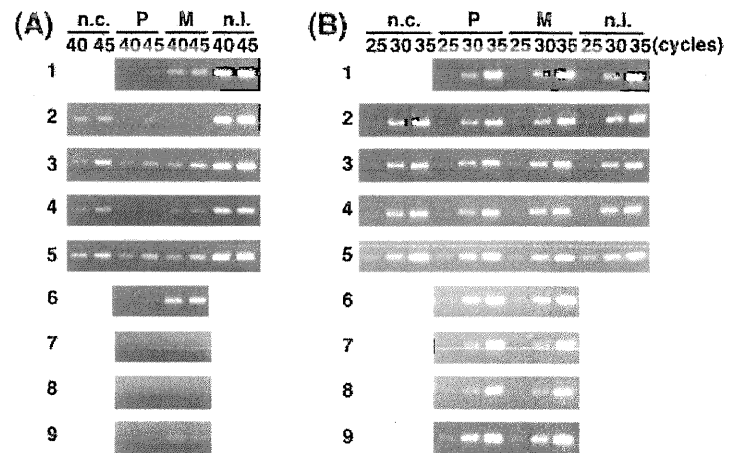
肝転移性に影響するものであるかを確認するために、まず、*in vivo* で増殖した colon 38 細胞及び SL4 細胞での発現パターンと *in vitro* で増殖した細胞での発現パターンを比較した。その結果、PN-1、Nuk と Reelin は一致したが、他の 6 個の遺伝子では一致しなかった。これら 3 個の遺伝子はヒト大腸癌臨床標本（正常大腸、原発巣、肝転移巣及び正常肝臓）においてどれも発現はしていたが、PN-1 と Nuk は肝転移性と相関するか不明であった。予後診断のマーカーとなり得るか、今後さらに多くの臨床標本を用いて検討する予定である。Reelin の発現量は、9 例中 5 例において原発巣よりも肝転移巣で高発現であり (Fig. 4)、最も肝転移性に関与すると考えられたことから、この分子についてさらに解析を行った。

抗体を用いた組織学的検討で、*in vivo* では Reelin は腫瘍組織内の間質系組織には存在せず、癌細胞にのみ存在することが示された。次に、colon 38 細胞に Reelin cDNA を強制発現した細胞株を作成した。*In vitro* での足場依存的増殖性には有意な差が見られなかったが、足場非依

存的増殖性は、強制発現株の方が有意に高かった⁽⁴⁾。この細胞をマウスの脾臓内に投与し、24 日後に解剖し、脾臓及び肝臓の重量を測定し、その転移性を評価した。その結果、転移性には有意な変化が見られなかった。このことから、Reelin が単独で肝転移性を規定する分子であるかは明らかとならなかった。

【まとめと考察】

同種同系マウスを用いて大腸癌肝転移モデルを作成した。このモデルでは高頻度に転移が起り、また再現性に優れること、微小転移から転移巣形成の過程が臨床の実体に近いことなどから、肝転移を抑制する医薬品のスクリーニングに有用であると考えられる。このモデルを用いて肝臓に高転移性のバリエーション細胞を得た。この肝高転移性細胞株は増殖性が高いことを特徴とし、細胞の運動性や浸潤性が高いなどの肺に高転移性の細胞にみられる形質は持たず、また、それらに関わる遺伝子の発現にも大きな差がないことが Mouse cDNA Expression Array による解析で明らかとなった。肝臓に高転移性の細胞に特徴的な遺伝子発現を明らかにすることを目的に解析を行い、9 つの遺伝子の発現量が異なることを示したが、単独で肝転移性を規定する遺伝子は見いだせなかった。今後、SL4 細胞の *in vitro* での増殖性に Reelin の他にどのような分子が関与するか、また、親株と肝高転移性細胞株の増殖性の違いが肝転移性にどのように関与するかを探るこ



[Fig. 4] Expression of Reelin (A) and β -actin (B) in normal colon (n.c.), primary colon carcinoma (P), hepatic metastasis of colon carcinoma (M), and normal liver (n.l.) of nine patients demonstrated by semiquantitative RT-PCR analysis.

とが必要であると考えている。また、肝転移が 1 つの細胞形質により規定されているのではない可能性が高いので、他の分子の関連を調べるために、肝臓への転移性を規定する遺伝子発現パターンをさらに多面的に調べることが必要である。

【参考文献】

- (1) Morimoto, M. and Irimura, T. Fibroblast Migratory Factor Derived from Mouse Colon Carcinoma Cells: Potential Roles of Fibronectin in Tumor Stroma Formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, in press (2001).
- (2) Higashi, N., Ishii, H., Fujiwara, T., Morimoto-Tomita, M. and Irimura, T. Redistribution of fibroblasts and macrophages during development of micrometastasis into established liver metastasis in a mouse colon carcinoma model. Submitted.
- (3) Morimoto-Tomita, M., Uchida, K., Tsuiji, M., Nakamori, S. and Irimura, T. Differential Gene Expression in Highly Metastatic Variants of Mouse Colon Adenocarcinoma Cells. Submitted.
- (4) Morimoto-Tomita, M., Uchida, K., Tsuiji, M., Nakamori, S. and Irimura, T. Molecular Determinants of Hepatic Metastasis of Colon Carcinoma in an Experimental Mouse Model: Genes identified by differential display analysis. In preparation.