

審査の結果の要旨

氏名 森 本 恵

生物学的に見た時、癌が転移を形成する過程は発癌の過程とは大きく異なっており、前者では複数の遺伝子の変異が原因であるのに対して、後者では複数の遺伝子の発現量の変化が原因であると考えられている。これらの複数の細胞形質は、細胞の移動と特定の微小環境における増殖に必要な、細胞間相互作用を規定するものであることが、メラノーマや乳癌などの肺転移モデルを用いた研究によりこれまで明らかにされて来た。しかし、悪性腫瘍の増殖に伴って転移性の高い癌細胞亜集団が生じる機構や、これらの亜集団における遺伝子発現の変化の全体像が理解されているわけではなかった。肺への転移性に関しては、転移性と相関して発現量の異なる遺伝子でその産物の分子機能も明らかになっているもの（接着分子やマトリクス分解酵素など）が報告されていたので、これらが癌転移の本質そのものであるかのように錯覚されていた。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細胞形質や遺伝子とその発現制御に関する知見は非常に少なかった。「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」と題する本論文では、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、肝臓に高転移性のバリエーション細胞を選別した。開発された肝転移モデルは抗転移薬開発にも用いられうる非常に有用なものであった。この高転移性バリエーション細胞は、親株に比べて増殖性が高く、アポトーシスを起こしている細胞の比率が低いが、肺転移性と関係があるとされている種々の細胞形質に関しては、親株と比較して有意な差異が見られなかった。さらに本研究では、高転移性バリエーション細胞と親株との間で発現解析を行うことによって、発現量の変化している複数の遺伝子の同定に成功した。転移性と相関して発現する複数の遺伝子の中で、神経系に発現して細胞の移動に関係する細胞外分子である reelin は、ヒト大腸癌手術標本において転移巣に発現レベルが高いことを確認した。この分子の発現レベルを遺伝子導入によって改変すると、細胞の足場非依存的な増殖性が上昇することを証明した。本研究は、動物実験モデル、ゲノム科学的なアプローチ、臨床的なアプローチ、分子細胞生物学的な方法論を縦横に駆使した、新しい創薬基礎科学としてまた腫瘍生物学として価値の高いものである。

本論文の内容は、具体的には三章から成りたっており、それぞれ、モデル系の構築、遺伝子発現解析、臨床試料による解析と細胞機能との関連が中心課題である。

第一章「マウス大腸癌転移モデルの作成」では、マウス大腸癌細胞株 colon 38 によって肝転移巣を形成させる条件を見出し、肝臓への高い転移性を持つバリエーション細胞株 colon 38-SL4 (SL4)、及びそのクローンを作成した経過が述べられている。これらの高転移性株は親株と比すると、足場非依存的及び依存的増殖能が高く、アポトーシスを起こしている細胞の比率が非常に低かった。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やマトリクス分解酵素活性には差がなかった。

第二章「親株と高転移性株における遺伝子の発現量の比較」では、これらの細胞で発現レベルの異

なる遺伝子を明らかにするため、Expression Array と Differential Display 法を用いて mRNA を比較した。前者の解析からは、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。しかし、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を見出すことは出来なかった。そこで、より多数の発現レベルを異にする遺伝子を見出すため、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を用いて、colon 38細胞に高発現であった遺伝子断片を89個、SL4細胞とそのクローン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、ノザンプロット法、逆ノザンプロット法、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 7 α)、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。このように、網羅的に肝転移性の高い癌細胞の遺伝子発現が解析された例は今までになかった。

第三章では「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」というタイトルの下に、これら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を診断に用いる可能性について追求した結果が述べられている。遺伝子発現における差異が *in vivo* で増殖した細胞で保たれているかどうか確認したところ、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サンプル（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。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、肝転移性との相関が考えられた。reelin は遺伝子診断の道具として役立つかどうかを更に明確にするために、*in vitro* 及び *in vivo* における発現についてさらに検討した。抗体による免疫組織学的方法では、*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。そこで、colon 38細胞に reelin cDNA を強制発現した細胞株を作成した。*In vitro* での足場非依存的増殖能は、強制発現株の方が有意に高かった。この細胞をマウスの脾臓内に投与し肝転移能を評価した。その結果、転移性には有意な変化が見られず、reelin が単独で肝転移性を規定する分子である可能性は低かったとのことであった。

以上のように、本研究では同種同系マウスを用いて大腸癌肝転移モデルを作成し、肝臓に高転移性のバリエーション細胞及びそのクローンを取得した。これらの細胞株は親株よりも増殖性が高いが、細胞の運動性や浸潤性などの肺に高転移性の癌細胞にみられる特徴を持たないことを明らかにした。この細胞の遺伝子発現の特徴を明らかにすることを目的に解析を行い、9つの遺伝子を示した。それらの遺伝子の *in vivo* における発現パターンを実験モデル及びヒト臨床サンプルを用いて明らかにした。本研究はヒト消化器癌の病態に関与する分子と遺伝子を新たに同定したことから、腫瘍生物学及び分子生物学に重要な貢献をするものであり、本研究を行った森本 恵は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。