

## 論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌細胞における高転移性と肝特異的転移性の分子基盤

氏名 大 橋 愛 美

### 【序】

大腸癌の血行性肝転移は患者の予後を決定する主要な因子であるが、いかにして転移性の癌細胞が生じるかは解明されていない。臨床標本の解析から、原発腫瘍が異なる細胞の集団であること、悪性度の高い癌細胞が原発腫瘍の大部分を占めるようになっていくこと、その集団にしばしばジェネティックやエピジェネティックな変化を起こした癌細胞が含まれることが明らかにされてきた。しかし臨床所見からは転移の最終点しか観察できず、原発腫瘍から悪性度の高い転移性癌細胞が生じる過程を連続的に観察し解析することは不可能である。動物を用いた転移実験モデルは、転移性の癌細胞のもつ形質を明らかにするために有用であるばかりでなく、転移性の癌細胞を生じる過程と機構の解明に役立つ。本研究では、C57BL/6 マウスに同種同系な大腸癌細胞株 colon 38 細胞を移植する動物実験モデルを用い、肝転移形成に至る過程を制御する複数の形質変化とその分子基盤を明らかにすることを目指した。

Fidlerらは「原発腫瘍は高い転移能をもつ細胞を含む多様な集団から成る」という仮説を

たて、実験的転移による癌細胞の選別 (*in vivo*選別) を繰り返して肺に高転移性を示すバリエーションを樹立した。当研究室の森本は同様に、colon 38 細胞を脾臓に移植して得られた肝転移結節を回収、培養して再び脾臓に移植する操作を 4 回繰り返すことにより、肝臓に高転移性のバリエーション SL4 細胞を樹立した。SL4 細胞では colon38 細胞に比べて、浸潤性や運動性は増強していないが、接着と非接着の両条件下で高い増殖性を示し、特に非接着条件下で G<sub>1</sub> 停止を起こさなかった。そこで本研究では SL4 細胞が高い増殖性と転移性を獲得する過程と機構の解明を試みた。

一方、転移が臓器特異的に生じることはよく知られており、消化器癌は主に肝臓へ転移する。Paget らは「転移の成立は癌細胞 (Seed) の増殖に適した臓器環境 (Soil) にのみ可能である」という仮説を提唱した。複数のグループは、肝実質細胞表面に特異的に発現する galactose/N-acetylgalactosamine (Gal/GalNAc) 特異的レクチンの Asialoglycoprotein receptor (Asgr) と癌細胞表面に発現する Gal/GalNAc 糖鎖との結合が、肝特異的な転移の形成に重要である可能性を提案しているが、分子レベルでの証明はなされていなかった。そこで *Asgr1* 欠損マウスにおける colon 38 細胞の肝転移性を評価した。

## 【方法と結果】

### 1. SL4 細胞の異なる臓器における転移性

SL4 細胞は臓器特異的な高転移性を示すのか否かを検証した。

#### 脾注脾摘モデル

脾臓における腫瘍の増殖が肝転移性に及ぼす影響を排除している脾注脾摘モデルの肝転移形成頻度は、colon 38 群で 60% (6/10) であったのに対し SL4 群で 100% (10/10) だった。

#### 同所移植モデル

癌細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) を盲腸漿膜下に移植し、19 日目にマウスを犠牲死させ転移能を評価した。肝転移形成頻度は colon 38 群で 0% (0/8) であったのに対し SL4 群で 63% (5/8) だった。

#### 尾静注肺転移モデル

肝臓の他に、頻度は低いですが肺が大腸癌の遠隔転移先として知られている。尾静注肺転移モデルでは、肺転移形成頻度は colon 38 で 27% (3/11) であったのに対し SL4 群で 100% (11/11) だった。肺転移結節数は SL4 群の方が colon 38 群に比べて有意

に高かった ( $p < 0.005$ )。

以上の結果から、肝転移による選別によって得られた SL4 細胞は、肝へ高い転移性を示すだけでなく、肺へも高い転移性を示すことが明らかになった。

## 2. 高肝転移性バリエーション SL4 細胞の高い増殖性を規定する分子基盤の解明

### 接着条件下および非接着条件下における colon 38 細胞と SL4 細胞の mRNA 発現量の網羅的解析

接着条件下の colon 38 細胞と SL4 細胞から得た mRNA を用いて、Affymetrix 社 Murine Genome U74Av2 chip にて発現量を網羅的に解析し、差異がある遺伝子を「接着条件下で SL4 細胞の高い増殖性を規定する遺伝子」とした。次に、接着条件下と非接着条件下で両細胞から得た mRNA を用いてアレイ解析し、接着条件から非接着条件にすると colon 38 細胞では発現量に差異があるが、SL4 細胞では差異がない遺伝子を「非接着条件下で SL4 細胞の高い増殖性を規定する遺伝子」とした。2つのグループに共通する既知の遺伝子は 16 個あり、RT-PCR 法によって発現の差異を確認した結果、このうち 7 遺伝子を「SL4 細胞の高い増殖性を規定する遺伝子の候補」とした。その内訳は、*chemokine (C-C motif) ligand 2*、*erythrocyte protein band 4.1-like 4a*、*procollagen type VI alpha 1*、*aquaporin 1*、*Insulin-like growth factor binding protein 6*、*cyclin-dependent kinase inhibitor 2a* 遺伝子である  $p16^{INK4a}$  遺伝子とその alternative splicing variant である  $p19^{ARF}$  遺伝子だった。

### in vivo 選別の段階で得られたバリエーションにおける 7 候補遺伝子の発現と肝転移性の関係

colon 38 細胞と *in vivo* 選別の各段階で得られた SL1, SL2, SL3, SL4, SL5 の各バリエーションについて、上記 7 遺伝子の発現を解析した。5 遺伝子は各選別により段階的に発現量が増加したのに対し、 $p16^{INK4a}$  遺伝子と  $p19^{ARF}$  遺伝子の発現は、SL3, SL4, SL5 細胞でサイレンシングだった。この結果はタンパク質の発現においても再現された。次に各バリエーションの増殖性を、接着条件下では WST-1 アッセイにて、非接着条件下では軟寒天培地中のコロニー形成数にて評価した。増殖性はどちらも各選別の過程で上昇するが、SL2 細胞と SL3 細胞の間に大きな差があることが判明した ( $p < 0.001$ )。また各バリエーション ( $1 \times 10^6$  cells) を脾臓に移植し 4 分後に脾臓を摘出し、14 日目に犠牲死させ、実験的転移能を評価した。肝転移形成頻度と肝臓重量は、各選別により段階的に上昇するが、SL2 細胞と SL3 細胞の間に大きな差がみられた ( $p < 0.001$ )。以上の結果から、高い増殖性や転移性の獲得に伴い複数の遺伝子の発現変化が並行して生じること、それらの遺伝子

の中で $p16^{INK4a}$  と $p19^{ARF}$ の発現がサイレンシングになることと高い増殖性、転移性の獲得が相関することが示された。

#### SL3, SL4, SL5 細胞における $p16^{INK4a}$ , $p19^{ARF}$ 遺伝子発現のサイレンシングの原因解析

癌細胞株や臨床標本で、 $p16^{INK4a}$ と $p19^{ARF}$ 遺伝子の発現がメチル化または欠損によってサイレンシングになることが多数報告されている。そこで、SL3, SL4, SL5 細胞を脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidineにて処理し発現が回復するか調べたが、両遺伝子とも発現が回復しなかった。次にゲノムDNAを鋳型にして、これらの遺伝子およびしばしば同時に欠損していることが報告されている近傍のマイクロサテライトマーカー遺伝子の存在を、PCR増幅により調べた。SL3, SL4, SL5 細胞では、これらの遺伝子が増幅せず、 $p16^{INK4a}$ と $p19^{ARF}$ 遺伝子の欠損が示唆された。

以上の結果から、大腸癌の原発腫瘍を *in vivo* で転移性を指標に選別を繰り返すと増殖性が上昇していくこと、その分子機構として転写の調節とゲノムの欠損という2つの機構が起きていることが、実験モデルで初めて示された。

### 3. 肝特異的転移の成立を規定する分子基盤の解明

colon 38 細胞の転移形成に肝臓に特異的な要因があるかどうかを検証するため、肝実質細胞の表面に特異的に発現する Asgr と colon 38 細胞表面の糖鎖との結合が肝転移の成立を規定する可能性を調べた。

#### Asgr1 欠損マウスにおける colon 38 細胞の肝転移形成頻度

colon 38 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を、Asgr1 欠損マウスと同腹野生型マウスの脾臓に移植し4分後に脾臓を摘出し、28日目にマウスを犠牲死させて転移能を評価した。肝転移形成頻度は、同腹野生型マウス群で68% (11/16) であったのに対し、Asgr1 欠損マウス群で29% (5/17) に低下した。

#### D-Gal の連続投与による colon 38 細胞の肝転移形成頻度の阻害効果

colon 38 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を脾臓に移植し4分後に脾臓を摘出した。脾摘1時間前、及び脾摘後8時間ごと3日間(計10回) D-Gal (2 mg/g B.W.) を尾静注し、14日目にマウスを犠牲死させて転移能を評価した。肝転移形成頻度は、生理食塩水投与群で60% (6/10) であったのに対し、D-Gal投与群で9% (1/11) に低下した。

以上より、肝転移形成において宿主 Asgr と癌細胞表面に発現する Gal/GalNAc 結合性糖鎖の結合の重要性が証明され、この結合性は臓器特異性を決定するだけでなく、治療の対象

となることが判明した。

#### 【まとめ】

動物実験モデルを用い、原発腫瘍から悪性度が上昇し高転移性の細胞が獲得される過程が解析できた。

大腸癌細胞が進行度にかかわらず持っている性質に肝特異的な転移性があり、これを規定する分子として宿主肝実質細胞表面に発現する Asialoglycoprotein receptor と癌細胞の接着が重要であること、その接着をガラクトース投与によって阻害し、転移を抑制できることが判明した。

また *in vivo* 選別の過程を追跡した結果、増殖性が高い細胞が原発腫瘍の中で増加して転移性が上昇すること、原発腫瘍の中に細胞増殖に関わる遺伝子の発現変化やゲノムの欠損を起こした癌細胞が存在し、それが転移する細胞であることが示唆された。*in vivo* 選別を繰り返すごとに細胞増殖に関わる遺伝子の発現と転移性が変化していく過程は、原発腫瘍に clonal evolution が起きていることを示している。また SL2 から SL3 細胞が選別された過程では  $p16^{INK4a}$  と  $p19^{ARF}$  遺伝子の欠損が起こり転移性が大きく上昇しており、clonal dominance が起きた可能性が示唆された。これらの現象の積み重ねで悪性度が上昇すると予想される。

複数の臓器に転移する癌細胞は、より進行した癌を形成していると考えられる。この細胞では足場非依存的増殖性が加速されており、この形質が治療の標的となる。

今回、1つの細胞株から、まず臓器特異的な転移が観察され、進行に伴い増殖性が上昇し、悪性度が高く複数の臓器に転移する状態が観察されること、またこれらの転移性を規定する遺伝子の発現が変化することを、動物実験で初めて示した。今後は、このモデル系を利用して治療の改善につなげていきたい。

#### 【発表論文】

(1) Morimoto TM, Ohashi Y, Matsubara A, Tsuiji M, and Irimura T, Mouse colon carcinoma cells established for high incidence of experimental hepatic metastasis exhibit accelerated and anchorage-independent growth, *Clin Exp Metastasis.*, 22:513-521, 2005