

審査の結果の要旨

氏名 大橋 愛美

「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」と題する本論文は、大腸癌の進行に伴って如何にして悪性度の高い転移しやすい癌細胞が生じるかを、また大腸癌においては肝臓が転移先となり易いのは何故であるかを、実験的な転移モデルの解析を通して追究した結果が述べられている。従来から主として臨床病理学的な所見に基づいて、原発腫瘍は遺伝子の変異状態において均一な細胞集団であっても、転移性を異にする多様な細胞の集団であり、悪性腫瘍の増殖に伴って悪性度の高い癌細胞が原発腫瘍の大部分を占める様になって転移を起こすと考えられていた。また、特定の種類の癌の転移はしばしば特定の臓器に見られるが、進行癌では複数の臓器の複数の部位に転移が生じるようになることも観察されていた。しかし、原発腫瘍から悪性度の高い転移性癌細胞が生じ、さらに遠隔転移が広範囲に起るようになる過程を連続的に病理学的な手法で観察し解析することは不可能である故、実験的な検証が必要とされていた。動物を用いた転移実験モデルは、転移性の高い癌細胞の持つ形質を明らかにするために有用であるばかりでなく、転移性の高い癌細胞が生じる過程とその生じる機構の解明にも役立つ。学位申請者は、C57BL/6 マウスに同種同系である大腸癌細胞株 colon 38 細胞を移植する動物実験モデルを用い、転移が肝臓に特異的に起るメカニズムの一端を解明した。さらに、進行に伴って転移性が上昇し、臓器部位の制限を超えた広範囲な転移をする癌細胞が生じる過程を分子レベルで明らかにすることに成功した。

全体は5章から成り、第1章と第5章はそれぞれ序論と結論である。第2章は、SL4 細胞の異なる臓器環境における転移性、第3章は、大腸癌細胞がその転移性を上昇させていく過程と機構の解明、第4章は、肝特異的な転移に重要な因子とその基盤となる宿主側の分子、がタイトルである。

第2章では、移植可能な大腸癌細胞株 colon 38 細胞とそれ由来の進行癌に相当する細胞株すなわち肝転移性によって選別された高転移細胞である SL4 細胞の *in vivo* に移植した際の増殖性及び転移性を比較し、進行癌の性質を持つ癌細胞では移植部位によらない高い造腫瘍性を持つこと、より進行度の低い癌では転移先は肝臓により限局する傾向があることが示されている。具体的には、脾注脾摘モデル、同所移植モデル、尾静注肺転移モデルなどによる *in vivo* における腫瘍増殖と転移の検証を行った結果、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持っていること、親株である colon 38 細胞は肺への転移性が低く、転移はむしろ肝臓に特異的であることが明らかになったことが述べられ

ている。

第3章では、colon 38 細胞と SL4 細胞の性質を比較した際に最も差異が顕著であった増殖性の違いと増殖における足場依存性に注目して、それらの分子基盤を明らかにした成果が述べられている。また、これらの分子の発現と細胞生物学的な特性及び実験的な転移性を、高転移細胞を選別していく過程の各ステップで得ていた細胞株 (SL1~SL5 細胞) について比較検証した結果が述べられている。遺伝子発現を網羅的に解析した結果「接着条件下で SL4 細胞の高い増殖性を規定する遺伝子」と「非接着条件下で SL4 細胞の高い増殖性を規定する遺伝子」の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}* 遺伝子であった。すなわち、大腸癌細胞が癌の進行に伴って悪性化する際に獲得する形質は、運動性や浸潤性ではなく、細胞のおかれた微小環境に依存しない増殖性であり、これを達成するために複数の分子の発現レベルが変動していることが判明した。

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変化したのに対し、*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、接着条件下と非接着条件下で比較するとともに、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。

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。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ジェノムの存在を、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、colon 38 細胞において *in vivo* で高い転移性によって選別を繰り返すと、高い増殖性や転移性が獲得され、それに伴い複数の遺伝子の発現変化を起こすメカニズムは多様であり、選別の各ステップで異なる変化が起っていることが明らかとなった。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が高い増殖性、転移性の獲得に最も強く影響していることが示された。

第4章では、上記の研究で選別に用いた親株であり、高転移性によって選別後の SL4 細胞よ

りも肝臓以外の臓器への転移性は低いことが解った colon 38 細胞を用いて、そ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した結果が述べられている。具体的には、肝実質細胞表面に発現し単糖としては galactose と N-acetylgalactosamine (Gal/GalNAc) に特異的なレクチンである Asialoglycoprotein receptor (Asgr) と癌細胞表面に発現する糖鎖との結合が、肝特異的な転移の形成に重要であるかどうか *Asgr1* 遺伝子欠損マウスを用いて検証した。肝転移形成頻度は、同腹野生型マウス群と比較すると劇的に低下した。もし *Asgr1* とそのリガンドとの相互作用が肝臓特異的な転移に必須であるなら、ガラクトースを連続投与することにより colon 38 細胞の肝転移形成が阻害されるはずであると考え、次にこれを検証した結果が示されている。ガラクトースを癌細胞移植後 8 時間ごと 10 回 (2 mg/g 体重) 尾静注して投与した結果、肝転移形成頻度は、60%から 9%に低下した。以上により、肝転移形成において宿主肝臓実質細胞に発現する *Asgr* と癌細胞表面に発現する糖鎖の結合が重要であることが証明され、このメカニズムは転移を抑制する治療のターゲットとなることが判明した。

以上の研究によって、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 *Asgr* 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された。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、この性質が治療の標的となる。マウス大腸癌培養細胞株を用いた本研究によって、動物モデルで臓器特異的な転移が観察され、進行に伴い悪性度が高く複数の臓器に転移する癌細胞が生じるという臨床的に観察される事象が初めて再現された。これらの転移性を規定する複数の遺伝子の発現が独立したメカニズムによって変化することを、動物実験で初めて示した。この成果は、悪性腫瘍の増殖、進行、転移の生物学的な理解に多大に貢献するものである。このように腫瘍生物学と臨床腫瘍学に大きく貢献する本研究を行った 大橋 愛美 は博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。