

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591550
 研究課題名（和文） 胃癌細胞株の肝転移またはリンパ節転移能に関する遺伝子群と生物学的機能の解析
 研究課題名（英文） The analysis of the gene cluster and biological function about the gastric cancer cell lines highly metastatic to liver and lymph node metastasis
 研究代表者
 山口 浩司（YAMAGUCHI KOJI）
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60315512

研究成果の概要：

胃癌細胞株の細胞浮遊液をマウス胃壁に接種する細胞注入法を用いた同所性移植により、リンパ節転移モデル、肝転移モデルを樹立した。高リンパ節転移株における細胞表面接着分子の発現ではインテグリンの関与が、高肝転移株における転移成立には血管新生作用の関与が示唆された。AZ521より樹立した高リンパ節転移株 AZL5G では endothelin-A receptor、TGF-beta II R alpha の発現増強が転移成立に強く関与していることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胃十二指腸外科学

キーワード：①癌、②同所性移植、③肝転移、④リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞や腫瘍組織を本来の発生臓器に移植する同所性移植モデルは、移植癌細胞が単に存在すべき場で増殖促進が図られるということにとどまらず、自然発生癌に類似した微小環境が提供され、転移臓器組織との相互関係を評価することに適しているものと考えられる。

癌転移は、癌細胞の原発巣からの離脱と周辺組織への浸潤に始まり遠隔転移巣の形成に至るまでの複雑な反応カスケードから成り立つものである。こうした転移現象の機序の解明、新しい治療法の開発に向けた転移関連分子機序の解明には、適切な動物モデルの確立が課題のひとつとなっている。

2. 研究の目的

血行性転移やリンパ節転移は各種消化器癌症例の最重要予後規定因子となっているが、その機序や転移関連遺伝子は未だ明らかにされていない。そのため両転移に対する新しい治療法の開発に向け、転移の分子機序の解明が望まれており、臨床研究ためにも良い動物モデルの確立が課題のひとつとなっていた。

リンパ節は多くのヒト癌では最も転移頻度の高い組織でありながら、これまでしっかりとリンパ節転移モデルの樹立はみられず、リンパ節転移機構の *in vivo* 研究には限界があったのが現状である。リンパ節転移成立の機序を解明することは新しい治療法の開発に寄与する可能性が大きく、そのためにも動物モデルの確立が重要な課題となっていた。

近年、分子生物学および遺伝子学的研究手法の発展により転移機序の解析が飛躍的に進み、多くの転移関連因子が明らかにされつつある。これまで我々が検討を重ねてきた癌転移と細胞接着分発現の関連性において、転移形式別の異なる因子の関与が血行性転移モデルとリンパ節転移モデルの樹立により確認された。

そこで、研究の目的を以下の如く設定した。

(1) 同一のヒト胃癌細胞株から樹立した肝高転移モデルとリンパ節高転移モデルから肝・リンパ節転移成立に特異的に関与する因子、遺伝子の発現を同定すること。

(2) 肝・リンパ節転移成立に特異的に関与する因子、遺伝子の機能を明らかにすること。

(3) 肝・リンパ節転移成立に特異的に関与する因子、遺伝子の発現を抑制・制御すること。

3. 研究の方法

1. 細胞株

ヌードマウス可移植性培養株化細胞として低分化型腺癌である低転移性ヒト胃癌細胞株 AZ521 を用いる。さらには MKN45 を用いて同様の検討を行う。

2. 細胞培養

10%FBS、non-essential amino acids、50 g/ml streptomycin、50 unit/ml penicillin 付加 RPMI 1640 培養液に加え、37°C、5% CO₂ : 95% air incubator 内で培養する。

3. 同所性移植と高転移細胞株の樹立

AZ521 5×10⁶/0.1ml の細胞浮遊液をマウス胃壁に接種する細胞注入法を用い同所性移植を施行する。移植するマウスは生後 6-7 週、体重 16-20g の雌 (BALB/c Ajcl-nu) を用いる。6 週目に犠牲死せしめ、胃、所属リンパ節、肝、肺を採取し、腫瘍径や転移状況を検索する。リンパ節転移巣、肝転移巣の転移細胞を培養し AZL1G、AZH1G を樹立する。さらに上記のことを 4 回繰り返し AZL5G、AZH5G を樹立する (既に樹立しているため、細胞の viability、activity を評価する)。MKN45 については、cell line を樹立を図り、肝高転移株、リンパ節高転移株の樹立を目指す。

4. 細胞増殖能

1×10⁶/0.1ml の腫瘍細胞をマウス背部皮下に移植し、7 日毎に腫瘍径を測定した。腫瘍体積を以下の式により推定し *in vivo* 増殖能を評価する。腫瘍体積は、 $V=L \times W \times H / 2$ (V , 体積; L , 長さ; W , 広さ; H , 高さ) とした。1×10⁴/0.1ml の腫瘍細胞株を 96 穴プレートに加え、12 時間毎に MTT 法による *in vitro* 増殖能を評価する。

5. 細胞運動能

24 穴プレート(下室)とトランスウェル(上

室)から構成されるチャンバーを使用する。1 × 10⁴/0.1ml の細胞を無血清 RPMI 1640 に分散させ上室に加える。下室には 0.1% FBS 含 RPMI 1640 と chemoattractant として fibronectin 12.5 μg/ml あるいは 25.0 μg/ml を加えて、37°C で incubate する。6 時間後、フィルターを通過した細胞数をメタノール固定後、ギムザ液で染色し顕微鏡下で計測する。

6. 細胞表面接着分子の発現

フローサイトメトリーを用いて細胞株の表面接着分子の発現を検討した。一次抗体として抗マウスインテグリン α₁ 抗体(TS2/7)、α₂ 抗体(II E10)、α₃ 抗体(II F5)、α₄ 抗体(B5G10)、α₅ 抗体(A5-PUJ2)、α₆ 抗体(A6-ELE)、β₁ 抗体(A-1A6)、α_vβ₃ 抗体、E-cadherin 抗体、ICAM-1 抗体そして CD44H 抗体を使用した。二次抗体には FITC でラベルした抗マウス IgG+IgM 抗体を用い接着阻害能を検討する。

7. 細胞接着能

4 × 10⁴ の腫瘍細胞を 100 μl の 0.02% FBS 含 RPMI 1640 に分散し、細胞外マトリックス構成蛋白である fibronectin, type I collagen, type IV collagen, laminin でコートした 96 穴プレートに加え、37°C で incubate し、1 時間後における接着能を検討する。接着した細胞数の評価には MTT 法を用い、接着陽性細胞の比率は以下の式で評価する。また、α₂ インテグリンの認識するアミノ酸配列を有する合成ペプチドを用いて、接着阻害能を検討する。

8. 転移阻害実験

インテグリン α₁ 抗体、α₂ 抗体、DGEA ペプチドによる AZL5G、AZH5G のリンパ節転移阻害実験を行う。100 μg インテグリン α₁ 抗体、α₂ 抗体を 5 × 10⁶/0.1ml の AZL5G と

混合し同所性移植、DGEA ペプチドについては移植 1 週間後より 100 μg を隔日尾静脈内投与した。6 週目に犠牲死せしめ、リンパ節転、肝転移状況を検索する。

9. 血管新生因子産生量

1 × 10⁴ の腫瘍細胞を 10% FBS 含 RPMI 1640 とともに 96 穴プレートに加え、翌日に FBS を含有しない RPMI 1640 に培養液を交換する。さらにその 2 日後に培養上清を回収し、ELISA 法により VEGF、bFGF の発現を測定する。

10. 遺伝子発現解析-1

樹立した高転移株の遺伝子プロファイリングを cDNA マイクロアレイにより解析する。

11. 遺伝子発現解析-2

両転移株の腫瘍細胞から抽出した RNA を用いて cDNA マイクロアレイにより同定された転移関連遺伝子群の RT-PCR 解析を行う。さらにスプライスバリエントが存在しうる遺伝子についてはバリエント解析を行う。

12. 遺伝子導入

cDNA マイクロアレイにより同定された転移関連遺伝子群からこうとなる遺伝子を決定し、低転移性の親株に遺伝子導入することにより、転移現象における遺伝子機能を確認する。

4. 研究成果

(1)胃癌細胞株の細胞浮遊液をマウス胃壁に接種する細胞注入法を用い同所性移植を施行した。移植するマウスは生後 6-7 週、体重 16-20g の雌 (BALB/c Ajcl-nu)を用いた。AZ521 のリンパ節転移巣の転移細胞を培養し AZL1G を樹立した。さらに上記のことを 4 回繰り返し AZL5G を樹立した。胃癌細胞株

MKN45によるリンパ節転移株MKNL3Gを合わせて検討を行った。

(2)移植腫瘍の転移率：AZL5Gのリンパ節転移率は85.0%であった。MKNL3Gのリンパ節転移率は60.0%であった。

(3)細胞増殖能：*in vivo*ではAZL5G、MKNL3Gはそれぞれの親株の増殖能を上回った。

(4)細胞運動能：AZL5GはAZ521に比し亢進を認めた。MKNL3GはMKN45に比し亢進を認めた。

(5)接着分子の発現：FACSによる細胞表面接着分子の発現では、AZL5Gでは α_1 、 α_2 インテグリンの発現が亢進していた。MKNL3Gでは α_2 インテグリンの発現が亢進していた。

(6)細胞接着能：AZL5Gはtype IV collagen、fibronectinに対する接着能が亢進していた($P<0.05$)。

(7)血管新生因子産生量：VEGFの産生量ではAZL5Gは親株と差を認めなかった。MKNL3Gにおいても同様であった。

(8)DNAマイクロアレイにより転移関連因子の発現を遺伝子レベルで検討すると、AZL5Gではendothelin-A receptor、TGF-beta II R alphaなどがのup-regulated geneであった。

(9)リンパ節転移株における特異的転移関連遺伝子を標的とした発現阻害は、実験的な転移を抑制した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6件)

1: Tsuruma T, Iwayama Y, Ohmura T, Katsuramaki T, Hata F, Furuhashi T, Yamaguchi K, Kimura Y, Torigoe T, Toyota N, Yagihashi A, Hirohashi Y, Asanuma H, Shimozawa K, Okazaki M, Mizushima Y, Nomura N, Sato N, Hirata K. Clinical and immunological evaluation of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine in phase I clinical study for patients with advanced or recurrent breast cancer. J Transl Med. 2008 May 10;6:24. 査読有

2: Takayama T, Sato Y, Sagawa T, Okamoto T, Nagashima H, Takahashi Y, Ohnuma H, Kuroiwa G, Miyanishi K, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Yamaguchi K, Hirata K, Niitsu Y. Phase I study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. Br J Cancer. 2007 Oct 8;97(7):851-6. 査読有

3: Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. Oncogene. 2007 Jul 12;26(32):4699-713. 査読有

4: Sasaki K, Kon J, Mizuguchi T, Chen Q, Ooe H, Oshima H, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of hepatocyte progenitor cells isolated from adult human livers in serum-free medium. Cell Transplant. 2008;17(10-11):1221-30. 査読有

5: Kawasaki H, Mizuguchi T, Oshima H, Nobuoka T, Shibata T, Kaji S, Kokai Y, Katsuramaki T, Mitaka T, Hirata K. Efficient transformation of small hepatocytes into insulin-expressing cells by forced expression of

Pdx1. J Hepatobiliary Pancreat Surg.

2008;15(4):403-9. 査読有

6: Kikkawa Y, Sudo R, Kon J, Mizuguchi T,
Nomizu M, Hirata K, Mitaka T. Laminin alpha 5
mediates ectopic adhesion of hepatocellular
carcinoma through integrins and/or
Lutheran/basal cell adhesion molecule. Exp Cell
Res. 2008 Aug 15;314(14):2579-90. 査読有

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 浩司 (YAMAGUCHI KOJI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60315512

(2) 研究分担者

木村 康利 (KIMURA YASUTOSHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80311893

水口 徹 (MIZUGUCHI TORU)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30347174

平田 公一 (HIRATA KOICHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50136959

(3) 連携研究者

山口 浩司 (YAMAGUCHI KOJI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60315512