

機関番号：32202

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791092

研究課題名 (和文) ヒトメラノーマの脳転移に特徴的な分子群の同定とその機能解析

研究課題名 (英文) Genes associated with brain-tropic human melanoma cells and their function

研究代表者

佐藤 篤子 (SATO ATSUKO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50382916

研究成果の概要 (和文)：

ヒト悪性黒色腫 (メラノーマ) の臨床では、「脳」「肝臓」「肺」「リンパ節」への臓器転移がしばしば観察される。しかしながらこのようなメラノーマの臓器選択的な転移能の獲得について不明な点が多い。とりわけ脳転移研究は、「脳」に転移する細胞株を実験的に作る事が困難であったため、脳転移を引き起こす分子群についての解明は困難を極めていた。ルシフェラーゼ発光を起点としたマウス生体内イメージング技法と高周波型超音波画像解析の組み合わせにより、重症免疫不全 (SCID) マウスへの左心室腔内への正確な細胞接種方法を確立し、脳に親和性を持つヒトがん細胞株の樹立をした (SK-MEL-28-Br2、MeWo-Br2)。これら高脳転移メラノーマ細胞株は、1) 細胞接種後30 minから24 hr以内のイメージング解析では脳への有意な親和性は観察されなかったが、15日以降に顕著な転移性増殖が認められること、2) 親株との比較において *in vitro* で再構築されたラット血液脳関門 (BBB) を効率よく浸潤透過しうることが判明した。さらに、アジレント社製マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析を進めた結果、高脳転移メラノーマ細胞株で2倍以上高い遺伝子413個の中に、TGF-beta 受容体2、LM07、PDE4Dなどの上皮間葉転換 (EMT) にかかわる遺伝子の発現が高いことが判った。

研究成果の概要 (英文)：

Metastasis formation is responsible for most cancer deaths. Brain metastases, most often with melanomas as with lung and breast carcinomas, induce a high morbidity and mortality. Our analysis of many human cancer cell lines using bio-luminescent imaging (BLI) technology, has demonstrated cancer cell-type dependent metastasis to specific organs of NOD/SCID mice. Herein we established brain-tropic melanoma cell lines (SK-MEL-28-luc-br2 and Mewo-luc-br2) after 3 cycles of sequential intra-cardiac (i.c.) inoculation into mice, and determined the kinetics of brain accumulation of melanoma cells after i.c. injection. While both the brain-tropic and the low-metastatic melanoma (SK-MEL-2-luc) cells were present to similar degrees in the brain 0.5-5 hrs after injection, brain-tropic melanoma cells showed a significant increase in tumor-derived photons at the late phase (after 15-20 days). Further a comprehensive transcriptome analysis showed a significant increase (3-6 fold) of TGF-beta receptor II in brain-tropic melanoma and breast carcinoma (MDA-MB-231-luc-br1) cells. The BLI-mediated *in vivo* imaging should promote identification of potential molecular markers for cancer metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メラノーマ、転移

### 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）は種々の治療に抵抗性を示す悪性腫瘍である。その治療抵抗性を獲得する機構や臓器特異的転移の仕組みは依然としてよく解っていない。特に、メラノーマの臓器特異的転移機構の一つは特定のケモカイン受容体との相関が指摘されているものの (Murakami et al. J Dermatol Sci 2004 Review)、ヒトメラノーマの臨床的な自然転移動態を模倣する動物モデルが確立されていなかった。とりわけ脳転移モデルの作製に関して、「脳」に転移する細胞株を実験的に作ることが困難であったため、脳転移を引き起こす分子群についての解明は全く不明のままであった。

### 2. 研究の目的

これまでのマウスを用いた血行性転移モデルは静脈系を介した接種実験であり、多くは「肺」転移を標的にしたものであった。本研究では、1) 繊細な超音波画像モニタリングシステムを活用し、動脈系にヒトメラノーマ細胞株を安定的に導入する技法を確立し、脳に選択的な親和性を持つメラノーマ細胞株の分離を目指した。さらに、2) 生体内イメージング技術との融合によりそれら細胞から脳転移に特徴的な遺伝子発現の変化を抽出し、それらの機能解析の基盤造りを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼ発現ヒトメラノーマ細胞株の作製

メラノーマ細胞株のソースはヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB)、American Type Culture Collection (ATCC) 等から購入した。pMSCV-luc 発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現するヒトがん細胞株を作製した。ホタル由来ルシフェラーゼを発現する細胞株の *in vitro* ルミネッセンス発光量をプロファイル化するため、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の限界希釈系列を作製し、細胞数 ( $10^1$  -  $10^5$  個) とルミネッセンス発光量を試験した。機器は Thermo 社、Applisskan を用いた。

(2) 免疫不全マウス体内におけるメラノーマ細胞の動態解析

VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下に NOD/SCID マウスの左心室腔内へ樹立したルシフェラーゼ発現細胞株を注射し、全身散布による主要臓器 (肝臓、肺、脳など) への血行性転移動態について発光イメージング解析を行った。使用機器は Xenogen 社 IVIS® を用いた。微少転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を *ex vivo* に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

### 4. 研究成果

(1) NOD/SCID マウスの左心室腔内への細胞接種法の確立

① SCID マウス及び NOD/SCID マウスの腹部を正中切開し、開腹した後、腹腔の滅菌生理食塩水による乾燥を防ぎながら門脈内に PH 7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) を注射し閉腹した (その間約 20 分)。その後、約 1 ヶ月間にわたり行動等の観察をおこなったが、全例 (n=5) 生存することが判った。

The use of a high-resolution ultrasound (25-75 MHz) allows accurate intra-cardiac injection.



図1: マウス左心室腔内への正確な細胞接種技術の確立

② VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下で 30 ゲージ針による左心室腔への生理食塩水の注射を行った (図 1) ところ、心タンポナーデなどの重篤な肉眼的傷害は観察されなかった。これらのマウスは 30 日以上に渡って全例 (n=5) 生存することが判った。これにより、マウス左心室腔内への細胞接種が安定的に行なわれることが判った。

③ ルミネッセンス発光量とマウス個体内検出限界を知る目的でルシフェラーゼ発現細胞株 G401 を SCID マウスの左腎臓被膜下に接種し、その検出感度について評価を行った。その結果、 $10^3$  個での検出には現行の機器では

約 50,000 単位 ( $/10^5$  個) 以上の発光量が必要であることが判った。特に正面および背部からの撮影に位置によって検出される発光量が異なるため、観察期間中決まったポジションを定める必要性があった。

## (2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

①作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株から約 50,000 単位 ( $/10^5$  個) 以上の範囲にある細胞株について NOD C. B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J(NOD/SCID) マウスにおける血行性転移の自然動態をモニタリングした。5 x 10<sup>5</sup> 個細胞を左心室腔内に接種し、「ルミネッセンス発光」を指標に経時的な変化を追跡した。悪性黒色腫細胞では脳、肝、肺に転移し易い傾向が観察された。これら臓器に対する転移親和性は他のメラノーマ細胞においても同様の傾向を示した。その一方で、大腸がん細胞株 HT-29-luc では *in vivo* イメージング解析では肝転移が顕著であり、*ex vivo* に取り出しルシフェラーゼ発光検定では、肝臓の他に、腎転移が顕著であった。肺やリンパ節にも小さな転移巣が検出された (図 2B)。トリプルネガティブの乳がん細胞株の代表である MDA-MB-231-luc 細胞では、乳がんに特徴的な骨転移が観られる他、脳転移や肺転移が観察されている (図 2C)。これまでの結果を考えあわせると、がんの臨床的病態の特徴として知られていた「臓器選択的な転移」がマウスを宿主とする異種移植系においても再現されることが強く示唆された。

### ヒトがんの種類に依存した臓器選択的転移の特徴

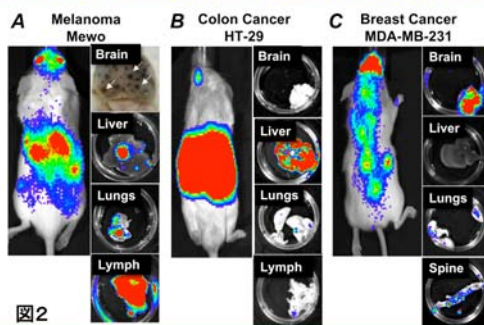


図 2

マウス体内でもヒトのがん細胞の転移特性は引き継がれる傾向にある

③メラノーマ細胞の転移は *ex vivo* 観察でも確認された (脳、肝、肺、リンパ節、腸管への転移)。脳転移に関しては、顕微鏡学的検索により脳表近くから実質に向かってがん細胞が浸潤する像が観察されている (図 3)。

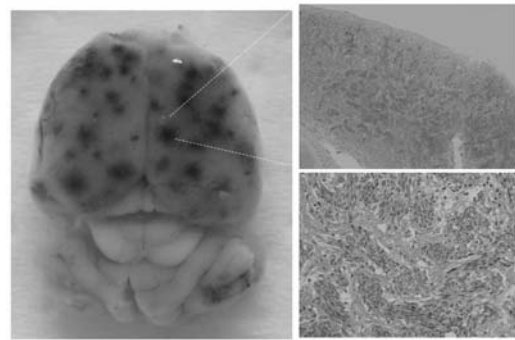


図 3: Mewo-luc メラノーマ細胞の脳転移とその浸潤像

④SCID マウスへの左心室腔内への正確な細胞接種が可能になり、上記の左心室細胞接種と細胞分離を繰り返し行ない、脳に親和性を持つヒトがん細胞株の樹立を行なった。高脳転移メラノーマ細胞株を分離することができた (SK-MEL-28-Br2、MeWo-Br2)。これら高脳転移メラノーマ細胞株は、1) 細胞接種後 30 min から 24 hr 以内のイメージング解析では脳への有意な親和性は観察されなかったが、15 日以降に顕著な転移性増殖が認められること (図 4)、2) 親株との比較において *in vitro* で再構築されたラット血液脳関門 (BBB) を効率よく浸潤透過しうることが判明した (図 5)。

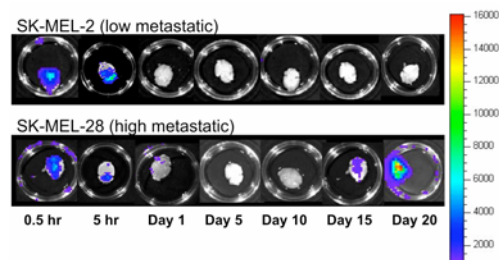


図 4. メラノーマSK-MEL-2 細胞とSK-MEL-28細胞における転移性脳腫瘍形成の初期動態解析

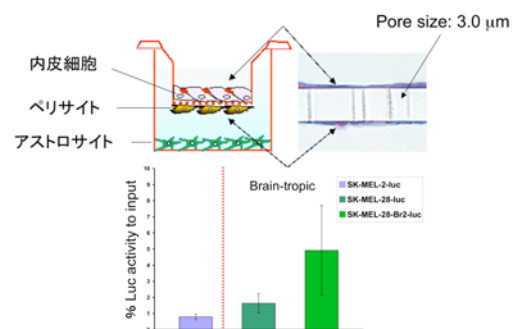
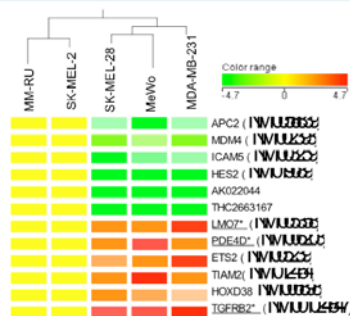


図 5. 血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) *in vitro* 再構成モデル

⑤アジレント社製マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析を進めた結果、高脳転移メラノーマ細胞株で 2 倍以上高い遺伝子 413 個

の中に、TGF-beta 受容体 2、LM07、PDE4D などの上皮間葉転換 (EMT) にかかわる遺伝子の発現が高いことが判った (図 6)。これらの結果から、少なくともメラノーマの脳転移には細胞の EMT 化が関与していることが示唆された。B16-F0 メラノーマ細胞を用いた同系移植による動物接種実験では、B16-F0 メラノーマ細胞は明らかな脳親和性を示さなかったため、上記の候補遺伝子を強制発現させた同系移植モデルによる絞り込み等を行なう必要があると考えられた。

図6 Microarray analysis between non-metastatic cells and brain-metastatic cells



## 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 1 件)

- ① 佐藤篤子、村上 孝. III 型インターフェロン. 臨床免疫・アレルギー科 2011 (印刷中) 査読なし.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Murakami T, Chun ALN, Matsui A, Sato A. Kinetics of brain metastasis in human melanoma cells using the bio-luminescent imaging. 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 篤子 (SATO ATSUKO)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 50382916