

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 20日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21240042

研究課題名（和文）ヒューマナイズドがん転移モデルを用いたヒトがん転移機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the mechanism of human cancer metastasis using a humanized cancer metastasis model.

研究代表者

末水 洋志（SUEMIZU HIROSHI）

公益財団法人実験動物中央研究所・バイオメディカル研究部・部長

研究者番号：40332209

研究成果の概要（和文）：免疫不全マウスを用いた異種移植実験系によるヒトがん細胞の転移モデルでは、その転移能をヒトとは異なる微小環境で評価していた。ヒト生体におけるがん転移現象をより正確に反映したモデルとして、宿主標的組織対移植細胞の関係がヒト対ヒトになるよう、マウス肝臓をヒト型化したヒューマナイズドマウスを宿主として用いた。従来の異種移植モデルでは転移性が無い（あるいは極めて低い）と評価された細胞株でさえ、このモデルでは転移が認められた。本研究により、移植モデルにおける宿主・移植細胞の関係の重要性が示された。これらの結果によりヒト対ヒトの同種移植モデルの重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：When immunodeficient mice are used as a human cancer metastasis model, the metastatic potential of cell lines is evaluated in a microenvironment that differs from that of humans. To develop a model that reflects the phenomenon of human cancer metastasis *in vivo* more accurately, humanized mice in which the liver was reconstituted with human liver cells were used as the host animals to examine the relationship between host target tissue and transplanted cells in an allogeneic microenvironment. Even cell lines with no or extremely low metastatic potential in traditional xeno-transplantation models metastasized in this model. The results suggest the importance of allogeneic relationships in transplant models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	19,500,000	5,850,000	25,350,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
総計	34,400,000	10,320,000	44,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：免疫不全マウス、ヒューマナイズドマウス、ヒト化肝臓、uPA-NOGマウス、TK-NOGマウス、がん転移、膵臓がん、大腸がん

1. 研究開始当初の背景

我が国におけるがんの発生数は増加を続け、1981年には国民の死亡原因の第1位となり、現在では約3人に1人が、がんで死亡している。がんは早期に発見・外科的治療ができればその予後は概ね良好であるが、不幸にして発見の遅れた進行がん症例では遠隔転移をしばしば起こし、抗がん剤療法や分子標的療法等の全身的治療の追加が必要となる。

当研究所で開発した超免疫不全NOGマウスは高効率にヒト悪性腫瘍を受容できる他、非常に少数のがん細胞移植によっても再現性良く肝転移巣を形成することができる。免疫不全ヌードマウスを使用した従来の肝転移モデルでは、実に100万個ものがん細胞を脾臓に注入していたが、これに対しNOGマウスを用いた肝転移モデルでは、僅か100個の膵臓がん細胞(MIA PaCa-2, AsPC-1, PANC-1等)を脾臓に注入するだけで肝臓に転移巣の形成が可能である。また、NOGマウスは、皮下移植においても数段高いがん細胞の生着性を示す。一般に移植されたがん細胞の生着性は移植部位によって異なることが知られている。Capan-1, Capan-2細胞はいずれもNOGマウスの皮下に効率よく生着するヒト膵臓がん細胞株であるが、Capan-1細胞は 10^3 個の脾門部移植でさえ肝臓に転移巣を形成できるのに対し、Capan-2細胞は 10^5 個の移植によっても肝転移巣を形成させることができない。このことから移植部位周辺の微小環境の違いががん細胞の初期接着性、その後の生着・増殖性に大きな影響を与えていることが予測された。皮下組織内は比較的種特異性の低い膠原繊維や弾性繊維などの疎性結合組織からなり、肝臓ほど血流量が多くない。一方、肝転移の場である肝臓では血流量が多く、種特異性の比較的高い細胞接着因子が転移形成に関与していると考えられる。しかし、従来のモデルでは転移標的がマウスの肝臓であるため、初期の接着性が十分に得られず肝転移巣の形成に至らない可能性が考えられた。そのため、転移標的が同種、すなわちヒト肝臓からなる同種移植肝転移モデルがブレークスルーに必須と考えた。

本研究で用いる超免疫不全NOGマウスはT, B, NK細胞を有しないため、かつて無いほどの高い異種細胞生着性を示す。しかし、NOGマウスでさえ、皮下には生着し肝臓には生着しないがん細胞が存在する。本研究の独創的な点は肝転移実験において「種の壁」を取り除くことである。我々は創薬・感染症研究への応用をめざし、器官レベルでのヒト肝臓再構築NOGマウスの確立に取り組み、uPA-NOGマウスを用いたヒューマナイズド liver NOGマウスの開発に成功している。従来のがん転移モデルの最大の欠点「ヒトがん細胞の転移

標的がマウスの組織」を本研究で確立する「ヒューマナイズドがん転移モデル」で克服をめざした。ヒューマナイズドマウスの肝臓に形成されたがん転移巣におけるがん細胞と正常細胞の解析は、ヒトにおける肝転移機構の解明に役立ち、がん治療戦略にこれまでにない切り口を提供する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん遠隔転移における“種”と“畑”の関係をヒト/ヒト間の同種で解析する世界で初めての *in vivo* 実験モデルを提供することである。がんが致死難病たる最も決定的な生物学的特徴は転移である。しかしながら、がんの *in vivo* 遠隔転移動物実験モデルとして満足なものはなく、従来、ヌードマウスにヒト悪性腫瘍を移植した異種移植実験系(ゼノグラフトモデル)が多く用いられてきたが、この系の最大の欠点は、転移巣を得るに必要な移植細胞数が臨床病態と著しく異なることである。また、発生期間、転移率などの点で実用性・再現性に乏しい。一方、ヒト正常細胞でさえ受容可能な超免疫不全マウス(NOD/Shi-*scid* IL2Rg^{nu1}; NOGマウス)の開発により、がん転移の病態をよく再現したがん遠隔転移モデルを構築することが可能となった。我々はこれまでに臨床的に肝転移が多い膵臓がんや大腸がんといった消化器がんについて、がん細胞をNOGマウスの脾臓(脾門部)から移植して、短期間で高効率に肝転移をきたすモデルを作製した。既にNOGマウスを用いることによって、非常に少数のがん細胞移植によって再現性良く肝転移巣が形成されることを証明した。この系は、がんの血管浸潤以降の生物学的行動をヒト膵臓がん・大腸がんについてモデル化したものである。しかし、この系では転移の標的臓器である肝臓はマウスの肝臓であり、ヒトがん細胞が生着したのは異種の微小環境と言えらる。今日のがん幹細胞の学説ではがん実質細胞周辺のニッチ性が、がんの増殖・転移の鍵になると言われている。そこで、ヒト生体におけるがん転移現象をより正確に解析するために宿主もヒトであることが望ましいと考えた。マウスの組織・細胞の一部をヒト型化することに成功したヒューマナイズドマウスではヒト生体内で起こっている生命現象を正確に再現しうる。本研究はヒト肝組織で再構成したヒューマナイズドNOGマウスの肝臓をヒトがん細胞の転移標的と定め、従来にはない実質間質一体型のヒト型肝転移モデルの構築をめざすものである。宿主標的組織 vs. 移植されるがん細胞の関係が、ヒト vs. ヒトの同種モデルでは、異種(マウス)肝細胞との接着性、異種肝臓微小環境への不一致性を懸念することなく、

ヒト膵臓がん・大腸がん細胞の肝転移能評価、また、肝転移に関わる因子の探索をすることが可能になる。

3. 研究の方法

本研究テーマ「ヒューマナイズドがん転移モデル」の遂行には、(1) ヒューマナイズド liver NOG マウスの作製と、(2) ヒトがん細胞の転移モデル系の確立が必須であった。

(1) ヒューマナイズド liver NOG マウスの作製では、そのプラットフォームとして uPA-NOG マウスを用いた。肝傷害を発症した生後 6 週齢以降の uPA-NOG マウスに市販のヒト正常肝細胞を脾門部より移植し、ヒト細胞の生着、および、増殖を血中ヒトアルブミン濃度の変動でモニターした。また、肝炎自然発症型の uPA-NOG マウスとは異なり、ガンシクロビル(GCV) 投与により肝炎発症を誘導する TK-NOG マウスについてもヒューマナイズド liver マウスを作製した。トランスジェニックマウス選抜のため、離乳後のマウスより尾の先端を採取し、DNA 抽出を行い PCR 法によりトランスジェニック(TK-NOG)/非トランスジェニックの選別を行った。生後 6 週齢以降の TK-NOG に GCV を投与し、1 週間後に血清アラニン・アミノトランスフェラーゼ活性 (ALT) を測定して肝傷害発症マウスに市販のヒト正常肝細胞を脾門部より移植した。uPA-NOG マウスと同様にヒト細胞の生着、および、増殖を血中ヒトアルブミン濃度の変動でモニターした。これらヒューマナイズド liver NOG マウス作製にあたり、以下の項目について検討を行った。

a) 両系統の繁殖成績

b) 移植方法・移植細胞のロット

(2) ヒトがん細胞転移モデル系の確立については、これまで NOG マウスや SCID マウスを用いた肝転移モデルの開発で培った経験をヒューマナイズド liver NOG マウスに応用した。ヒューマナイズド liver NOG マウスの肝臓におけるヒト肝細胞の占有率(キメラ率)は、これまでに得ている結果から、血中ヒトアルブミン濃度 1 mg/ml では約 10%が、6 mg/ml ではマウス肝臓のおよそ 60%がヒト肝細胞で置換されていることがわかっている。また、これまでに行った膵臓がん細胞株、大腸がん細胞株、肝がん細胞株の NOG マウスにおける肝転移能評価の結果から、それぞれの細胞の転移能もわかっている。これらのデータをもとに以下の項目について検討を行った。

a) ヒューマナイズド liver NOG マウス膵臓に対するヒトがん細胞の再移植法の確立

b) *in vivo*イメージャーによるがん細胞の

検出

4. 研究成果

本研究課題「ヒューマナイズドがん転移モデルを用いたヒトがん転移機構の解明」では「肝生着促進因子、および、肝転移関連因子の同定」を最終目標と定めている。3年間の研究期間で、従来の異種移植実験系では再現できなかったある種のヒトがん細胞株について肝転移を再現することができた。この結果はヒト対ヒト同種移植実験系が従来以上にヒトの生体に近い動物実験モデルであることを示唆するものであり、本モデルにより肝生着促進因子、あるいは肝転移関連因子が同定されることを期待している。各テーマについての研究成果は以下の通りである。

(1) ヒューマナイズド liver NOG マウスの作製

a) 両系統の繁殖成績

uPA-NOG マウスの生産について

雌雄のホモ接合体の配偶子で体外受精、胚移植を実施し、得られた個体により 1 2 ペアの交配群を作り、その子孫による実験用動物の繁殖を計画した。研究初年度の uPA-NOG マウスの作出状況を図 1 に示す。

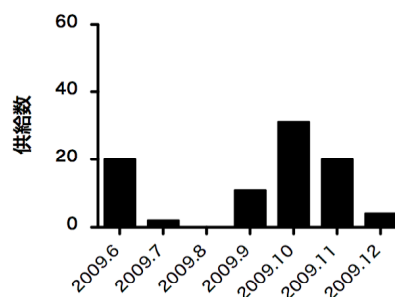


図 1 uPA-NOG マウスの作出数

従来の uPA/scid (Alberta) マウスでは胎生致死性や新生児致死性による繁殖の困難さが指摘されていたが、uPA-NOG マウスではそのような障害は見られず、ホモ接合体同士の交配が可能であった。ところが交配を続けるに従い、次第に妊娠率、出産率、離乳率が低下した。そこで研究計画通りに実験を進めるために TK-NOG マウスも使用した。

TK-NOG マウスの生産について

TK-NOG マウスは雄性不妊であることから、当初、その生産性の悪さが指摘されたが、幸い、交配ペア数を順調に増やすことができ、研究に必要な数のマウスを計画的に作出することが可能になった。研究初年度の TK-NOG マウスの作出状況を図 2 に示す。

b) 移植方法・移植細胞のロット

移植経路、宿主の週齢、移植細胞数、移植

細胞のロットなどの各要因について評価を

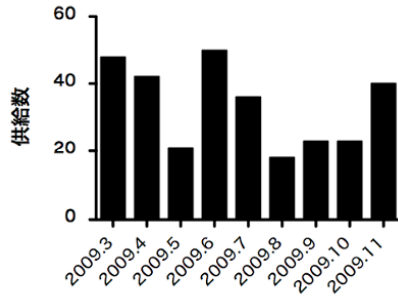


図2 TK-NOGマウスの作出数

行った。脾臓から門脈経由で直接、宿主肝臓にヒト肝臓細胞を移植する非門部移植法 (*isp*) と尾静脈にヒト肝臓細胞を移植する方法 (*iv*) を uPA-NOG マウスにて比較したところ、*isp* では移植後、ヒトアルブミン産生を認めたが、*iv* 法では全く認められなかった。次に生後 6, 8, 10 週齢の uPA-NOG マウスを宿主としてヒト肝臓細胞の生着性を比較したところ、いずれのマウスでもヒトアルブミンの産生が認められ、週齢による差は認められなかった。また、移植細胞数 ($0.5 - 2.0 \times 10^6$ cells/匹) を同様に検討したが、大きな差は認められなかった。TK-NOG マウスについては肝傷害誘導至適時期決定のため、GCV の代謝酵素 HSVtk 遺伝子の発現を 5 週齢と 8 週齢の肝で比較したところ、若齢では発現が十分でないことがわかった。このことから、実験には 8 週齢以降の TK-NOG マウスを使用した。

上記、uPA-NOG マウスの実験からヒト肝細胞には *isp* 移植が必須であることから、TK-NOG マウスへの移植は全て *isp* にて実施した。

表1 TK-NOG マウスにおけるヒト肝細胞生着性評価

ロット	年齢	性別	hAlb (mg/mL)	推定キメラ率 (%)
A	-	-	0.1	4.9
B	-	-	1.7	23.6
C	7歳	女	< 0.1	-
D	-	-	0.9	14.9
E	4歳	男	< 0.1	-
F	4歳	女	8.2	98.3
G	2歳	男	3.6	45.4
H	14ヶ月	男	4.4	54.6
I	21ヶ月	男	3.8	47.5
J	38歳	女	1.1	16.3
K	9歳	男	< 0.1	-
L	6歳	女	1.9	25.4
M	6歳	女	3.0	37.9
N	2歳	男	1.0	15.2
O	25歳	男	2.2	29.2
P	新生児	-	< 0.1	-
Q	34歳	男	8.6	103.1

ヒューマニズド liver NOG マウス作製に使用する凍結ヒト肝臓細胞は、数社から販売されており、全て異なる個人由来のものである。その調製方法や凍結方法、含まれる肝細胞ポ

ピュレーションなどの違いが作製効率に大きな影響を与えられとされることから、市販の 17 ロットのヒト肝臓細胞について、その生着性を TK-NOG マウスにて比較した (表 1)。その結果、全く生着しないものが 4 ロット、置換率 50%以下が 10 ロット、50%以上の高置換を示したものが 3 ロットであった。このような「ヒト凍結肝臓細胞のロット差」は解凍時の細胞生存率の差によることがわかっており、この問題を克服するため、死細胞を効率よく除去する精製法を検討した。磁気ビーズや Ficoll を用いた方法を検討し、解凍時生存率 40%程度の細胞から生存率 80%以上に精製する方法を確立し、以降、Ficoll 精製した細胞を用いてヒューマニズドがん転移モデルの作製を行った。

(2) ヒトがん細胞転移モデル系の確立

a) ヒューマニズド liver NOG マウス脾臓に対するヒトがん細胞の再移植法の確立

ヒト肝臓細胞移植法として *iv* 法が適さないことが判明したことから、脾臓に 2 度の細胞移植術を施す系の確立を行った。すなわち、ヒト肝臓細胞移植を *isp* 法で実施し、その 4 週間後、生着が確認できた個体について、再び *isp* 法によりヒトがん細胞を移植するものである。初めに高転移性のヒト大腸がん細胞 HCT 116 株を用いて検証を行った。血中にヒトアルブミンが検出された TK-NOG マウス (キメラ率 5%以上) の脾臓から 1×10^5 個の HCT 116 細胞を移植し、その 2 週間後に肝臓での生着性を評価した。その結果、肉眼的には肝表面に腫瘍は認められなかったが、ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色による病理解析では、HCT 116 細胞の集団が所々に認められた。このことは従来、異種微小環境で解析していた転移現象を同種、すなわち、よりヒトに近い環境で再現したものであり意義あるものとする。しかし、異種の肝臓にも生着しやすい HCT 116 細胞では宿主の違いによる生着性の差を検証するのは難しいことから、次に従来の条件では生着しがたいヒト大腸がん細胞 SW48 株について、ヒューマニズド liver uPA-NOG マウスによる転移能評価を行った。 1×10^5 個の SW48 細胞株を移植したところ、ヒューマニズド肝臓マウスでのみ生着が確認され、ヒト肝臓細胞が移植されていない uPA-NOG マウスでは生着が確認されなかった。同様にヒト膀胱がん細胞 BxPC-3 株についても検討したところ、ヒト肝臓細胞が移植されていない uPA-NOG マウスの肝臓にも生着は認められたが、ヒューマニズド肝臓マウスでは生着の程度が極度に亢進していた。

b) *in vivo* imager によるがん細胞の検出 肝転移能評価にイメージングを取り入れ

るにあたり、検出方法の検討を行った。赤色蛍光タンパク遺伝子を導入した発現細胞株を樹立することにより、図4左のようにがん細胞を検出することができた。また、遺伝子導入をしなくてもがん細胞の動態を観察できるよう、近赤外蛍光分子標識グルコース類似体プローブを用いてがん細胞の検出を試みたところ、非遺伝子導入HCT 116細胞を検出することができた(図4右)。既存の細胞株をそのまま解析できる本技術は、今後、*in vivo* イメージングによるヒューマナイズドがん転移モデルの評価に役立つものと思われる。

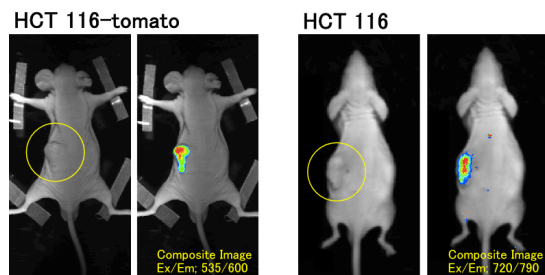


図4 ヒトがん細胞のイメージング(左:赤色蛍光タンパク、右:近赤外蛍光分子標識グルコース類似体)

本研究の作業仮説「ヒトがん細胞の生着性には種差がある」を実験的に証明し、克服するモデルを確立できたことにより、ヒトがん肝転移に関わる因子の*in vivo*探索研究に新たな道が拓けるものと思われる。

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19件)

1. Yamazaki, H., Suemizu, H. (8名・2番目) In Vivo Formation of Dihydroxylated and Glutathione Conjugate Metabolites Derived from Thalidomide and 5-Hydroxythalidomide in Humanized TK-NOG Mice Chem Res Toxicol 査読有り、25:2012:274-6. (DOI: 10.1021/tx300009j)
2. Michishita, M., Suemizu, H. (8名・3番目) Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines Vet 査読有り、in press. 2012 (DOI:10.1016/j.tvjl.2012.01.006)
3. Hashimoto, H., Suemizu, H. (15名・12番目) Vinyl isolator breeding induces insulin resistance in C57BL/6JJcl mice Exp Anim 査読有り、60:2011:497-508. (DOI:10.1538/expanim.60.497)
4. Hasegawa, M., Suemizu, H. (11名・11番目) The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional

Biochem Biophys Res Commun 査読有り、405:2011;405-410.

(DOI:10.1016/j.bbrc.2011.01.042)

5. Shiozawa, S., Suemizu, H. (12名・8番目) Gene targeting and subsequent site-specific transgenesis at the β -actin (ACTB) locus in common marmoset embryonic stem cells Stem Cells Dev 査読有り、20:2011;1587-99. (DOI:10.1089/scd.2010.0351)
6. Yamazaki, H., Suemizu, H. (8名・2番目) In Vivo Formation of a Glutathione Conjugate Derived from Thalidomide in Humanized uPA-NOG Mice Chem Res Toxicol 査読有り、24:2011;287-289. (DOI:10.1021/tx200005g)
7. Kubo, A., Suemizu, H. (10名・7番目) Semi-quantitative analyses of metabolic systems of human colon cancer metastatic xenografts in livers of superimmunodeficient NOG mice Anal Bioanal Chem 査読有り、400:2011;1895-904. (DOI:10.1007/s00216-011-4895-5)
8. 伊藤守、末水洋志 ヒト化マウスの改良と疾患モデルへの応用、実験医学増刊、査読無し、30:2011;300-5
9. 末水洋志 マウスを用いたヒト肝臓モデル、Surgical Frontier、査読無し、18:2011;284-7
10. 末水洋志 ヒト化肝臓マウスモデル、細胞工学、査読無し、31:2011;3226-30
11. Tomioka, I., Suemizu, H. (15名・13番目) Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (Callithrix jacchus) fetal liver cells using defined factors, including Lin28 Genes Cells 査読有り、15:2010;959-69. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2970909/?tool=pubmed>)
12. Hashimoto, H., Suemizu, H. (7名・6番目) Comparative study of doses of exogenous progesterone administration needed to delay parturition in Jcl:MCH(ICR) mice Exp Anim 査読有り、59:2010;521-4. (DOI:10.1538/expanim.59.521)
13. Handa, K., Suemizu, H. (12名・7番目) Phosphorescence-assisted microvascular O₂ measurements reveal alterations of oxygen demand in human metastatic colon cancer in the liver of superimmunodeficient NOG mice Adv Exp Med Biol 査読有り、662:2010;423-9. (DOI:10.1007/978-1-4419-1241-1_61)
14. Chijiwa, T., Suemizu, H. (14名・6番目) Thrombospondin 2 inhibits

metastasis of human malignant melanoma through microenvironment-modification in NOD/SCID/gammaCnull (NOG) mice Int J Oncol 査読有り、34: 2009; 5-13. (DOI:10.3892/ijo_00000123)

15. Machida, K., Suemizu, H. (7名・2番目) Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors J Toxicol Sci 査読有り、34: 2009; 123-7. (DOI:10.2131/jts.34.123)
16. Sasaki, E., Suemizu, H. (23名・2番目) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission Nature 査読有り、459: 2009; 523-7. (DOI:10.1038/nature08090)
17. Matsuyama, M., Suemizu, H. (12名・9番目) Alternative splicing variant of vascular endothelial growth factor-A is a critical prognostic factor in non-small cell lung cancer Oncol Rep 査読有り、22: 2009; 1407-13. (DOI:10.3892/or_00000582)
18. 伊藤守、末水洋志 NOG マウスとヒト化マウス、ファルマシア、査読無し、45:2009;1077-80
19. 涌井昌俊、末水洋志 NOG マウスを用いたヒト化動物モデルの研究展開、生化学、査読無し、82: 2009; 314-8

[学会発表] (計5件)

1. 末水洋志、NOG マウスを用いたヒト化肝臓モデルの確立、日本実験動物学会第56回総会、2009年5月14日、大宮
2. 末水洋志、Establishing a humanized model of the liver using NOG mice、International Workshop on Humanized Mice 第2回大会、2009年4月4日、オランダ
3. 長谷川雅巳、末水洋志、Establishing a humanized model of the liver using NOG mice、The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 第7回大会、2009年7月9日
4. 末水洋志、TK-NOG マウスを用いた機能性‘ヒト化肝臓’の作製、日本実験動物学会第58回総会、2011年5月26日、東京
5. 清水万紀子、末水洋志、ヒト肝移植マウスを用いたアセフェートの代謝消失、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：ヒト肝細胞が移植されたマウス
発明者：末水洋志、川井健司、中村雅登、長谷川雅巳
権利者：同上

種類：

番号：特願2009-008097

出願年月日：2009年10月6日

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.ciea.or.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末水 洋志 (SUEMIZU HIROSHI)
公益財団法人実験動物中央研究所・バイオ
メディカル研究部・部長
研究者番号：4332209

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：