

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590451

研究課題名(和文)大腸癌の肝転移を抑制するHOX遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of HOX gene which suppresses hepatic metastasis of colon cancer

研究代表者

浜田 淳一 (Hamada, Jun-ichi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：50192703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HOXD8が大腸癌の肝転移抑制遺伝子として働くことを証明するために、肝転移成立過程の3つの段階におけるHOXD8の役割について実験病理学的に解析した。その結果、内皮下基底膜に対する浸潤性はHOXD8の低発現細胞に比べ、高発現細胞で高いこと、肝類洞内皮細胞への接着性とHOXD8の発現レベルには関連性がないこと、ならびにヌードマウスの肝臓で増殖している癌組織のHOXD8の発現は盲腸でのそれに比べ低いことが明らかとなった。以上より、大腸癌の肝転移において、HOXD8は転移成立過程の癌細胞が置かれた場所によって転移促進的あるいは抑制的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the roles of HOXD8 in three steps of hepatic metastasis of human colon cancer to demonstrate anti-metastatic function of HOXD8. We found the following: the cells highly invasive of subendothelial basement membrane showed higher expressions of HOXD8 than those weakly invasive; there was no correlation between adhesiveness of the cells to hepatic sinusoidal endothelial cells and the expression levels of HOXD8; the cells growing in the liver of nude mice expressed HOXD8 at higher levels than those growing in the cecum. These results suggested that HOXD8 functioned as a metastasis-enhancing or suppressive gene depending on the step where the cells were during hepatic metastasis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：転移 HOX 浸潤 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

癌の転移は、本来存在してはならない場所での癌細胞の増殖と捉えることができる。すなわち、癌細胞による正所・異所の誤認が転移を引き起こすと考えられる。そこで我々は、癌細胞のもつ位置情報と転移との関連性について研究を進めて来た。動物胚の形態形成過程において遺伝情報を位置情報に変換する遺伝子はホメオボックス遺伝子とよばれ、転写因子をコードしている。この遺伝子群が位置情報の最終的な担い手である細胞接着因子や増殖因子などの遺伝子発現を調節しながら形態形成を進めてゆく。ホメオボックス遺伝子ファミリーに属する HOX 遺伝子群は、ヒトでは 39 個知られており、9 から 11 個の HOX 遺伝子からなる 4 つのクラスター (A, B, C, D) を形成し、それぞれ異なった染色体上に位置している。

我々はこれまでに、1) 39 個の HOX 遺伝子の発現パターン (HOX コード) が胎生期だけでなくヒト成体においても臓器・組織に特徴的であること、2) 特定の HOX 遺伝子の異常発現が、その下位にある多くの標的遺伝子の発現を変化させ、より悪性な癌細胞に変換させること、3) 癌細胞の分化形質発現にも HOX 遺伝子が関与していること、ならびに 4) 癌組織 (口腔癌、食道癌、大腸癌、肝癌、乳癌、肺癌および悪性黒色腫) における HOX コードは、非癌部組織のそれとは異なることを報告してきた。これらの事実は、癌における HOX 遺伝子の発現異常が癌の発生・悪性化進展に密接に関与していることを示している。

これら一連の研究の中で、癌細胞の位置情報と転移性という観点から次の興味深い知見を得た。ヒト大腸癌の原発巣および転移巣の HOX コードを調べたところ、1) 原発巣における HOXD8 の発現レベルは、肝転移の有無にかかわらず同程度である；2) 大腸癌の肝転移巣における HOXD8 の発現レベルは原発巣のそれに比べ著しく低いことが明らかとなった。これらの事実から、我々は HOXD8 が肝転移に特異的な転移抑制遺伝子として働いている可能性を考えた。また、同時に、1) 原発巣に存在した HOXD8 を発現していない癌細胞が大腸を離れて肝臓で転移巣を形成する能力を有しているのか、あるいは 2) 肝臓の微小環境に適応するために癌細胞が HOXD8 の発現を低下させているのか、という新たな疑問が生じてきた。

2. 研究の目的

ヒト大腸癌細胞のヌードマウス移植モデルを用いて、HOXD8 が大腸癌の肝転移に対して転移抑制遺伝子として働くことを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト大腸癌細胞株 KM12SM および SW480、な

らびにマウス肝類洞内皮細胞 (HSE) を用いた。これらの細胞株は、D-MEM/Ham 's F-12 に非動化牛胎仔血清 (FBS) を 10% 添加した培地を用いて、CO₂ インキュベータで培養した。

(2) RNA 抽出

培養細胞および組織からの RNA 抽出は、TRIzol Reagent を用いて行った。

(3) 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は、SYBR Green ケミストリを利用した定量的リアルタイム RT-PCR 法で行った。内部標準には GAPDH 遺伝子の発現を定量した。PCR 終了後、解離曲線解析を行い、PCR 産物の特異性を確認した。また、データの解析には Sequence Detector Systems version 2.0 software を用いた。最初の材料である RNA 量のサンプル間におけるばらつきを考慮し、対象遺伝子の発現量は、内部標準として用いた GAPDH 遺伝子の発現量で補正した相対比 (対象遺伝子の発現量/GAPDH 遺伝子の発現量) で表した。

(4) 免疫不全マウスへのヒト大腸癌細胞の移植

D-MEM/F-12 に浮遊させた KM12SM 細胞を、雄ヌードマウスの盲腸、肝臓、脾臓および腹腔内に移植した。移植後、20~70 日に、マウスを犠牲死させ、解剖し、腫瘍組織を摘出した。摘出した組織は、液体窒素を用いて急速冷凍し、RNA 抽出を行うまで、-80 °C で保存した。

(5) 細胞浸潤アッセイ

細胞浸潤アッセイは、24 ウエルおよび 6 ウエルプレートのマトリゲル・インベージョン・チャンバーを用いて行った。このチャンバーは、8 μm の小孔の開いた膜によって上下に仕切られており、膜の上面には基底膜モデルであるマトリゲルがコートされている。チャンバー下室には、D-MEM/F-12-10 % FBS を入れ、上室には D-MEM/F-12-2 % FBS に浮遊させた癌細胞を入れた。24 ウエルプレートにおける浸潤アッセイは、37 °C、CO₂ インキュベータで 48 時間培養した後、浸潤細胞を計数した。6 ウエルプレートにおける浸潤アッセイは CO₂ インキュベータで 48 時間培養し、上室および下室の細胞をそれぞれ別々に回収した。回収した細胞は 60 mm ディッシュまたは 10 cm ディッシュで培養し、同様の実験を上室の細胞および下室の細胞をそれぞれ用いて 3 回繰り返し行い、3 回浸潤した細胞 (3 × 浸潤細胞) および 3 回浸潤しなかった細胞 (3 × 非浸潤細胞) を得た。

(6) 大腸癌細胞の肝類洞内皮細胞への接着アッセイ

96 マイクロウェルオプティカルボトムプレートにマウス肝類洞内皮細胞 (HSE) を単層培養した。癌細胞は蛍光色素 carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) で標識した。CFSE 標識癌細胞を HSE 培養ウエルに加えた。5、10、15、30、45、60、90、120 および 180 分間、CO₂ インキュベータ内に静置した後、培

地を除去し、PBS (-)で洗浄し、PBS(-)を 100 μ l/ウエルで加え、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を計測した。

(7) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) システムを用いた肝類洞内皮細胞に接着した大腸癌細胞の選別

10 cm 組織培養皿に培養した肝類洞内皮細胞 HSE がコンフルエントの単層培養に達した時点で、CFSE 標識癌細胞を播いた。播種 60 分後、まず非接着細胞を、つぎに残った細胞 (接着細胞) を PBS (-) で洗浄、トリプシン処理を施し、D-MEM/F-12-10% FBS に浮遊させた。細胞浮遊液から、FACS Aria を用いて CFSE 標識癌細胞を選別分取した。

(8) HOXD8 発現プラスミドベクターの構築と細胞への導入

pBOS プラスミドにヒト HOXD8 の全翻訳領域を挿入し、ヒト細胞での HOXD8 発現ベクターを構築した (pBOS-HOXD8)。この pBOS-HOXD8 を大腸癌細胞に電気穿孔法で導入した。

4. 研究成果

(1) ノードマウスに移植し形成されたヒト大腸癌組織の遺伝子発現解析

ノードマウスの肝臓、盲腸、脾臓および腹腔内に KM12SM 細胞を移植し、それぞれの臓器で増殖している癌組織から抽出した RNA をもとにリアルタイム RT-PCR 法で HOXD8 の発現解析を行った。

その結果、盲腸で増殖している KM12SM 癌組織の HOXD8 の発現レベルは他の臓器で増殖している癌組織および培養 KM12SM 細胞と比べ、高いことが明らかとなった。あわせて各臓器に形成された癌組織の heparanase (HPSE)、matrix metalloproteinase (MMP) および tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) の発現を調べた。その結果、盲腸で増殖している癌組織の HPSE の発現レベルは他の臓器で増殖している癌組織および培養 KM12SM 細胞に比べ、有意に高いことがわかった。また、その発現パターンは HOXD8 と類似していた。また、盲腸で増殖している癌組織の MMP-2、MMP-10 および TIMP-1 の発現レベルも他の臓器で増殖している癌組織および培養 KM12SM 細胞に比べ、高い傾向が認められた。

(2) 再構成基底膜マトリゲルに対する大腸癌細胞の浸潤

癌細胞が原発巣から出て行くためには血管内皮下基底膜を破壊しなければならない。そこで血管内皮下基底膜のモデルとしてしばしば利用されるマトリゲルに対する浸潤能と HOXD8 の発現について調べた。まず、ヒト大腸癌 SW480 細胞からマトリゲルへの浸潤能の高い細胞集団と低い細胞集団の選別を試みた。マトリゲルをコートしたインペジョン・チャンパーの上室に SW480 細胞をまき、浸潤アッセイを行った。浸潤しないで上室に残った細胞および浸潤して小孔の開いた膜

下面に接着している細胞をそれぞれ回収した (1 \times 非浸潤細胞 と 1 \times 浸潤細胞)。回収された各細胞を用いて、引き続き浸潤アッセイを行い、3 回連続して浸潤しなかった細胞 (3 \times 非浸潤細胞) と浸潤した細胞 (3 \times 浸潤細胞) を樹立した。得られた 3 \times 非浸潤細胞と 3 \times 浸潤細胞の浸潤能を確認したところ、3 \times 浸潤細胞の浸潤能は 3 \times 非浸潤細胞のそれに比べ約 15 倍であった。3 \times 非浸潤細胞および 3 \times 浸潤細胞の HOXD8 の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析したところ、3 \times 浸潤細胞の HOXD8 の発現レベルは 3 \times 非浸潤細胞と比べ、有意に高いことが明らかとなった。

また、MMP-1、MMP-2、HPSE ならびに TIMP-1 の発現についても解析した。

いずれの遺伝子発現も 3 \times 非浸潤細胞に比べて、3 \times 浸潤細胞において高い傾向が認められた。

(3) マウス由来肝類洞内皮細胞と大腸癌細胞との接着

門脈内に侵入した大腸癌細胞が標的臓器である肝臓に到達した際、最初に出会う組織は類洞内皮である。そこで、HOXD8 が大腸癌細胞の肝類洞内皮細胞への接着に有利に働くのか否かについて検討した。まず、単層培養したマウス肝類洞内皮細胞 (HSE) 上に蛍光色素で標識したヒト大腸癌細胞 (KM12SM および SW480) をまき、5 から 180 分まで経時的に接着率を測定した。いずれの細胞も経時的に HSE に接着する細胞の割合が増加した。つぎに、癌細胞播種後 60 分に接着細胞と非接着細胞を回収し、RNA を抽出、リアルタイム RT-PCR 法で HOXD8、MMP-1、MMP-2、MMP-10 および TIMP-1 の発現解析を行った。その結果、いずれの遺伝子の発現レベルも非接着細胞と接着細胞間で有意な差は認められなかった。

(4) HOXD8 を強制発現させたヒト大腸癌細胞作製の試み

HOXD8 発現プラスミドベクターを構築し、ヒト大腸癌細胞に導入した。導入後 24~48 時間後にその発現を調べたところ、Mock 導入細胞に比べ、HOXD8 の発現レベルは著しく高いことがわかった。しかしながら、安定発現株を樹立すべく、選択培地での培養を行ったところ、増殖してきた細胞はもはや HOXD8 を発現していないことが明らかとなった。

以上の実験結果から、HOXD8 の発現は大腸癌細胞が血管内へ侵入する段階 (マトリゲルへの浸潤) においては転移成立に対して促進的に働くが、肝臓における癌組織の形成段階においては必要がないと考えられた。したがって、本研究から、大腸癌の肝転移において、HOXD8 は転移成立過程の癌細胞が置かれた場所によって転移促進的あるいは抑制的に働く可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hida, Y. and Hamada, J. Differential expressions of matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs and their endogenous inhibitors among histologic subtypes of lung cancers. Anticancer Agents Med Chem. 2012, 12: 744-752, 2012.
(査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

古橋昌子・浜田淳一：ホメオボックス遺伝子 HOXD8 のヒト大腸癌の肝転移における役割について 第3回 IGM リサーチワークショップ (2013年3月12日、札幌)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/crg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 淳一 (HAMADA, Jun-ichi)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：50192703

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

飯笹 久 (Iizasa, Hisashi)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：80306662