

博士論文

肺腺がん細胞の実験的転移系を用いた  
転移関連分子の同定と機能解析

熊谷 友紀

## 目次

要旨	-----	1
序文	-----	2-14
材料と方法	-----	15-27
結果	-----	28-55
考察	-----	56-63
結論	-----	64
謝辞	-----	65
参考文献	-----	66-75

## 要旨

新規転移関連遺伝子を同定するために、マウス肺腺がん細胞株から実験的肺転移系により高転移性の細胞株を作成した。この親株と高転移性亜株より抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現パターンの比較により、転移促進候補遺伝子として *Podnl1*、転移抑制候補遺伝子として *Stc2* を同定した。また、ヒト *STC2* を過剰発現した高転移性亜株では、マウス尾静脈注入による肺への転移能および軟寒天培地中でのコロニー形成能、マウス皮下移植による腫瘍増殖能が低下することが示された。したがって、*STC2* は転移抑制機能をもつことが示唆された。

## 序文

現在の日本では、3人に1人ががんで亡くなっており、死因に占める悪性新生物の割合は増加の一途をたどっている<sup>1</sup>。これは日本の高齢化を大きく反映しているということが第一に考えられるが、治療技術の発展が未だ不十分であるということも考えられる。

国立がん研究センターの2003-2005年診断例の部位別臨床進行度別5年相対生存率のデータによると、限局型のがんでは5年相対生存率が、胃がん96.0%、肝臓がん40.8%、肺がん77.2%であるのに対し、遠隔転移を伴うがんではそれぞれ5.1%、2.0%、3.7%にまで低下する<sup>2</sup>。原因の1つとしては、がん治療の中心である手術療法や放射線療法が局所的な治療であり、限局型のがんであれば完治の可能性が高まってきているが、遠隔転移を伴うがんや画像診断で発見できないような微小転移の治療には適応できていないということなどが考えられる。また、化学療法は全身の治療に適しており微小転移にも効果があるが、正常細胞への副作用、がん細胞の耐性獲得などの解決すべき問題点を抱える。このようなことから、がんの治療技術の向上には、転移の分子メカニズムの解明が必須であると考えられる。

がん転移に関する研究は、1973年に *Isaiah J. Fidler* がマウスメラノーマ細胞株



B16 をマウス尾静脈に注射し、肺に形成された転移巣から細胞株を作成するという実験的肺転移過程を繰り返し、高転移性細胞株 B16F10 を選択してきたことにより、細胞生物学および分子生物学的な研究が急速に展開されるようになった<sup>3</sup>。

がん細胞が原発巣から離れて他の場所に転移する過程には、大きく 3 通りの経路がある。1 つ目はリンパ行性転移であり、がん細胞がリンパ管に侵入し、リンパ節に転移巣を形成する。2 つ目は血行性転移であり、がん細胞が近くの血管に侵入し、血流によって他の臓器へ移動し、転移巣を形成する。3 つ目は播種性転移であり、がん細胞が胸腔や腹腔へ侵入し、それら体腔に面した他の臓器に転移巣を形成する。以降では、がん転移の中でも最も頻度の高い血行性転移について主に述べることとする。血行性転移は基本的に、がん細胞の浸潤、血管内侵入、血中移動、血管内皮への接着、血管外遊出、転移巣形成といった多段階機構から成っており、これら全てのステップを乗り越えるための能力を獲得したわずかながん細胞が転移巣を形成できるといわれている (図 1)<sup>4</sup>。例えば 1998 年の Keith J. Luzzi らの研究によると、マウスメラノーマ B16F1 細胞をマウスの門脈内に注射すると 2.0% の細胞が血管外遊走をして肝臓に微小転移を形成し、さらにそのうちのわずか 1.0% が肉眼で観察可能なサイズまで増殖すること

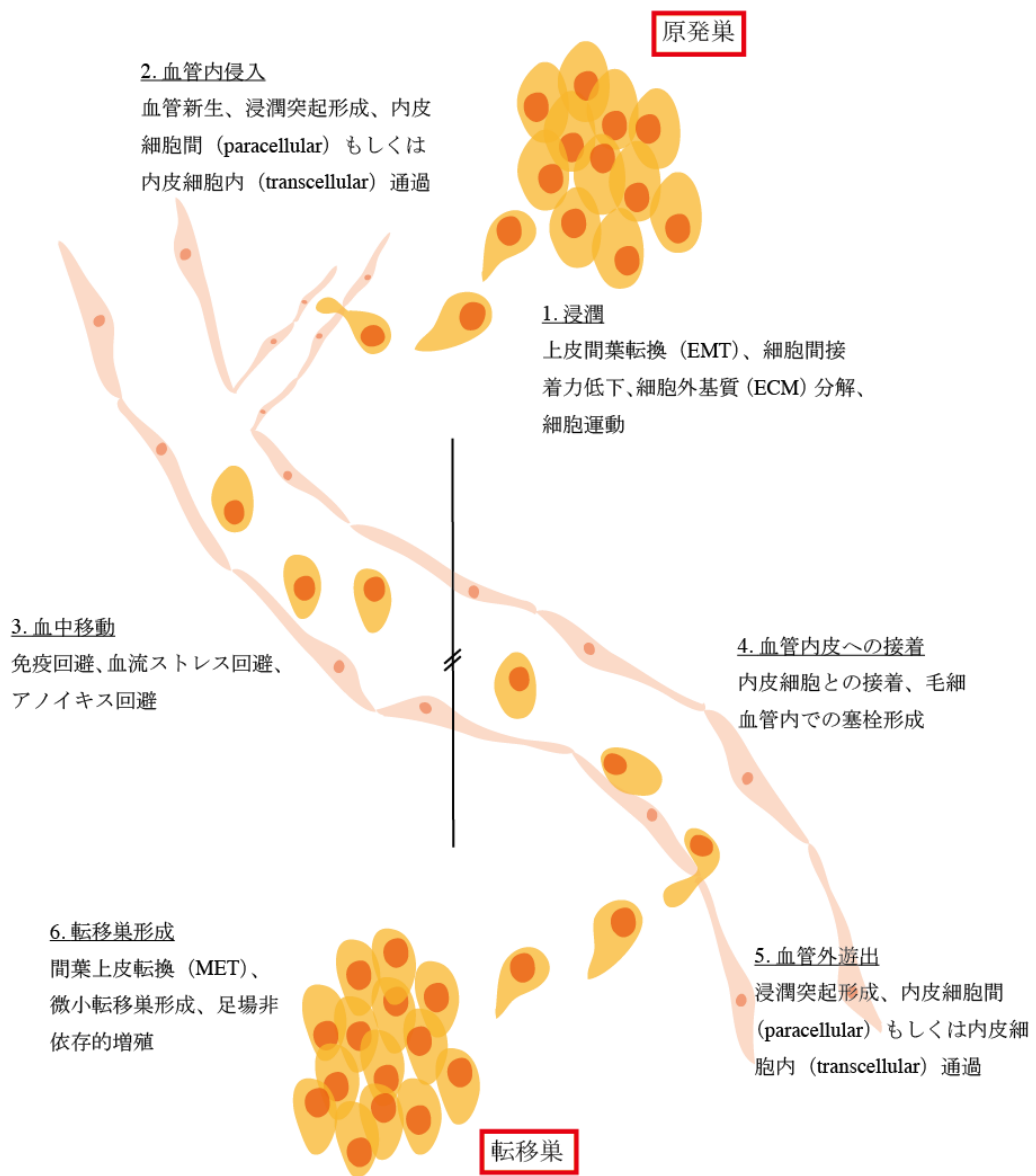


図1 血行性転移の多段階メカニズム

血行性転移の過程はさまざまな段階からなり、がん細胞が血管を通して離れた場所や臓器に転移巣を形成するためには、これら全ての段階を乗り越える必要があると考えられている。

ができる<sup>5</sup>。このように多くのがん細胞が転移の途中の段階で脱落していく原因としては、免疫機構による攻撃や血流による物理的ストレス、細胞が足場を失うことによる細胞死などが考えられる。このように血行性転移は一般的に、がん細胞自体がさまざまな能力を獲得することにより浸潤・血管の破壊を行い、多くのストレスを回避して血中を移動し、その後血管壁との結合を経て他臓器への遊出および転移巣形成をする。ただし例外も存在し、主に肝細胞がんや腎細胞がんでは、がん細胞が集団で腫瘍血管に包み込まれて血中に遊離し、転移先臓器に到着すると血管外へは遊出せずに、血管内に塞栓を形成し増殖するという転移過程も存在することが報告されている<sup>6,7</sup>。このような非浸潤型の転移は細胞集団で血管内移動をするため、単一細胞で移動する浸潤型転移と比較して、腫瘍免疫や血流などによる物理的ストレスを回避しやすく、高い転移効率を示すことがわかっている。以上のように、がん転移の機構は多段階の現象からなり、転移の分子機構の解析においては、それぞれの段階における細胞や周囲の微小環境の変化を理解することが重要である。

転移の第一段階である浸潤過程に関与していると考えられる細胞変化の1つとして、上皮間葉転換（EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition）が挙げられる。細胞間接着が強く運動能の低い上皮細胞は EMT を起こすことにより、細胞間接

着が弱く運動性の高い間葉系細胞のような性質を獲得し、組織の中を移動できるようになる。TGF- $\beta$  シグナルおよびその下流の Snail、Twist、ZEB1 を含む転写関連因子により E カドヘリンの発現が抑制され、細胞間の接着が弱まることが重要な要因の 1 つであると考えられている<sup>8</sup>。原発がん組織中で EMT を起こしたがん細胞は、原発巣から離脱し、転移の初期段階である周辺の組織への浸潤能を獲得する。また、EMT は可逆的な細胞変化であり、がんの転移においては血管外遊出し転移先臓器に入り込んだ後、定着する段階において間葉上皮転換 (MET: Mesenchymal-Epithelial Transition) が起きているという報告もある<sup>9</sup>。このように、EMT-MET の細胞変化は浸潤転移の機構において、重要な要素の 1 つであると考えられている。

がん幹細胞の概念も転移に関連する要因の 1 つと考えられている。がん幹細胞仮説は、がん組織中の一部の細胞が造腫瘍能をもつと考えられている仮説であり、1960 年代から提唱されている。近年では、フローサイトメトリーにより CD44 や CD133 を代表とする幹細胞マーカー発現細胞を分離し、さらに免疫不全マウスでその造腫瘍能を検討できるようになり、特定のがん種においては、がん幹細胞の存在が確立されている。がん幹細胞の定義としては、造腫瘍能、多分化能、自己複製能を全てもつこととされている<sup>10</sup>。がん幹細胞の起源は 2 通

りの説がある。1つ目は、正常組織幹細胞のがん化である。例えば消化管上皮細胞では数日というように、分化した細胞の寿命は短く、その間に変異が蓄積してがん化するとは考えにくく、寿命の長い幹細胞が主にごん化するのではないかと考えられている。2つ目は、分化した細胞のがん幹細胞化であるが、この原因としては、細胞の遺伝子変異の蓄積の他に、細胞周囲の微小環境からの刺激に誘導される可能性が考えられる。Vermeulen L.らの研究によると、間質筋線維芽細胞から分泌された HGF (Hepatocyte Growth Factor) が、大腸がん細胞の Wnt シグナルを活性化させることにより脱分化を誘導し、がん幹細胞化させるということが報告されている<sup>11</sup>。がん幹細胞はストレス抵抗性が強く、また分裂が遅いため、放射線治療や細胞分裂を阻害する抗がん剤に耐性を持っている場合が多い<sup>12</sup>。さらに、がん幹細胞の遺伝子発現パターンは EMT を起こした細胞と非常によく似ているということや、EMT を誘導した上皮がん細胞はがん幹細胞様の性質を示すことも報告されている<sup>13,14</sup>。また、血管内を移動し他組織へ移動・生着できたとしても、造腫瘍能を持つ細胞でなければ転移巣は形成できない。以上のことから、がん幹細胞はがんの再発や転移と密接に関わっていると考えられている。

がんの転移にはがん細胞自身の性質だけでなく、がん細胞とそれを取り囲む

微小環境との相互作用も重要な要素となる。がん細胞は由来する原発巣によって転移しやすい臓器が異なるが、その要因として血流の方向の他に、転移先臓器の微小環境との相性が挙げられる（表 1）<sup>15,16</sup>。1889 年に Paget により提唱された “Seed and Soil” 説では、がん細胞はそれぞれ生着・増殖しやすい環境が異なり、転移巣の形成には適した微小環境が必要であると考えられている<sup>17</sup>。微小環境は、線維芽細胞をはじめとし、炎症細胞、免疫細胞、血管、リンパ管、結合組織といった間質細胞から構成されており、これらの細胞が分泌する増殖因子およびサイトカインががん細胞の増殖に大きく影響していることがわかってきている。一方、急速に増殖するがん組織は、酸素や栄養を補給するために VEGF や PDGF、HGF などを分泌し、近くの血管内皮細胞に作用することで新生血管を誘導する<sup>18,19</sup>。さらに、がん幹細胞自体が血管内皮様細胞に分化するということも示されてきている<sup>20</sup>。2010 年には、Rong Wang らと Lucia Ricci-Vitiani らの別々のグループの報告により、神経膠芽種のがん幹細胞自体が Notch シグナルの活性化により血管内皮前駆細胞に分化し、さらに VEGF 刺激を受けることで血管を形成するということが示された<sup>21,22</sup>。

以上に示したように、転移には細胞や微小環境の様々な変化が関与している。

1 個の正常細胞ががん化すると、正常な細胞分裂機構が破綻し、増殖に伴いゲノ

表 1 肺がんおよび膵がんの転移の臓器別頻度

肺がん		膵がん	
転移臓器	頻度 (%)	転移臓器	頻度 (%)
肺	49.4	リンパ節	20.6
肝臓	42.2	肝臓	20.1
骨	39.1	腹膜播種	8.9
副腎	35.7	肺	2.4
腎臓	26.3	骨	0.7
大脳	22.8	胸膜播種	0.3
心臓	16.5	副腎	0.3

(参考文献<sup>15,16</sup>)

ム異常、遺伝子異常を蓄積していく<sup>23</sup>。その結果、形成されたがん組織は多様なゲノム異常をもつ不均一な細胞集団となり、その中に浸潤能を獲得した細胞が出現する。さらにこれらの浸潤細胞の中に、転移の多段階を乗り越える能力を獲得した細胞が出現し、遠隔転移の形成に至ると考えられている。それぞれの現象には多くの遺伝子の関与が報告されているが、未だ解明されていないことも多い。転移に関わる新規遺伝子の網羅的な探索方法の一つとして、前述の Isaiah J. Fidler による B16F10 作成のように動物を用いた転移系により高転移性の亜株を作成し、親株と遺伝子発現パターンを比較するという手法がある。E. A. Clark らは、ヒトメラノーマ細胞株 A375 およびマウスメラノーマ細胞株 B16 をマウスの尾静脈に注入し、肺に形成された転移巣から細胞株を作成するという過程 (*in vivo* セレクション) をそれぞれ 2 回 (A375) もしくは 3 回 (B16) まで繰り返し、転移巣由来の細胞株 A375M1, M2 および B16F1, F2, F3 を作成した<sup>24</sup>。彼らはこれらのいずれかの細胞株で、親株に比べて発現が 2.5 倍以上である遺伝子 32 種類を同定した。さらにそれらの遺伝子の中で、全ての転移巣由来細胞株で、親株に比べて発現が 2.5 倍以上である遺伝子である *RhoC* に着目し、*RhoC* が細胞運動能および浸潤能を促進することを報告した。A. J. Minn らは、乳がん細胞株 MDA-MB-231 を心臓に注入し、肺に形成された転移巣から LM0 細胞を



作成、さらに尾静脈へ注入し得られた肺転移巣から細胞株を作成する過程を 2 回繰り返し、LM2 細胞を作成した<sup>25</sup>。彼らは LM2 と MDA-MB-231 の遺伝子発現プロファイルを比較して、54 遺伝子からなる転移関連候補遺伝子リストを作成した。さらにその中から、生物学的機能により 9 遺伝子 (*EREG*、*GRO1/CXCL1*、*MMP1*、*MMP2*、*SPARC*、*IL13RA2*、*VCAM1*、*ID1*、*PTGS2/COX2*) に着目し、機能解析および臨床的検証により、これら 9 つの遺伝子が転移促進に寄与することや、乳がんの肺転移マーカーになりうることを示した。後に彼らは、この遺伝子発現解析に基づいた解析を行い、*RARRES-3* を転移抑制遺伝子として同定した<sup>26</sup>。N. Sugiyama らは、ヒト膀胱がん細胞株 KK-47 のマウスへの尾静脈注入による *in vivo* セレクションを 4 回繰り返し、KK-47HM4 細胞を作成した<sup>27</sup>。マイクロアレイ解析により KK-47HM4 の遺伝子発現プロファイルを親株と比較した結果、KK-47HM4 で発現が高い 36 遺伝子 (1.5 倍以上) および低い 31 遺伝子 (0.75 倍以下) を同定した。彼らは更なる解析を行い、KK-47HM4 の内皮細胞浸潤能が親株と比較して高いことを見出し、*VIM/Vimentin* と *PLEC/Plectin* が浸潤突起形成に寄与することを示した<sup>28</sup>。

本研究では転移に関わる新規遺伝子を網羅的に探索するため、実験的肺転移系で高転移性の細胞株を樹立し、その遺伝子発現パターンを親株と比較するこ

ととした。本実験系では、尾静脈移植により肺への転移巣を形成できる程度の転移能をもつ細胞を親株として用いる必要がある。そこで、先行研究において、がん抑制遺伝子 *Cadm1* (*Cell Adhesion Molecule 1*) のノックアウトマウスより樹立した細胞株 IMSMP1 を用いることとした<sup>29</sup>。CADM1 (*Cell Adhesion Molecule 1*) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する一回膜貫通型細胞接着分子であり、非小細胞肺がんの抑制因子として同定された<sup>30</sup>。肺腺がんにおける CADM1 の不活化は特に浸潤がんで認められている<sup>31</sup>。*Cadm1* ノックアウトマウスは肺腺腫・腺がんの自然発生を認める (図 2A and B)<sup>29</sup>。この肺腺がん由来の IMSMP1 細胞は上皮様の形態を示し (図 2C and D)、培養ディッシュへの接着が非常に強く、また接触依存的増殖抑性能 (contact-inhibition of cell growth) を失っている。動物実験においては、IMSMP1 はヌードマウスに皮下移植することにより、皮下腫瘍を形成すること、肝臓、肺およびリンパ節へ転移することが示されている。また、腫瘍抵抗性の系統である C57BL6/J マウスへの皮下移植実験によっても、皮下腫瘍の形成および肺転移が示されている。さらに、IMSMP1 をヌードマウスの腹腔内へ投与することにより腹水が生じること、尾静脈へ投与することにより多発肺転移腫瘍を形成することが示されている。これらのことから、IMSMP1 は強い増殖・浸潤・転移能を持ち、本実験系に適すると考えられる。

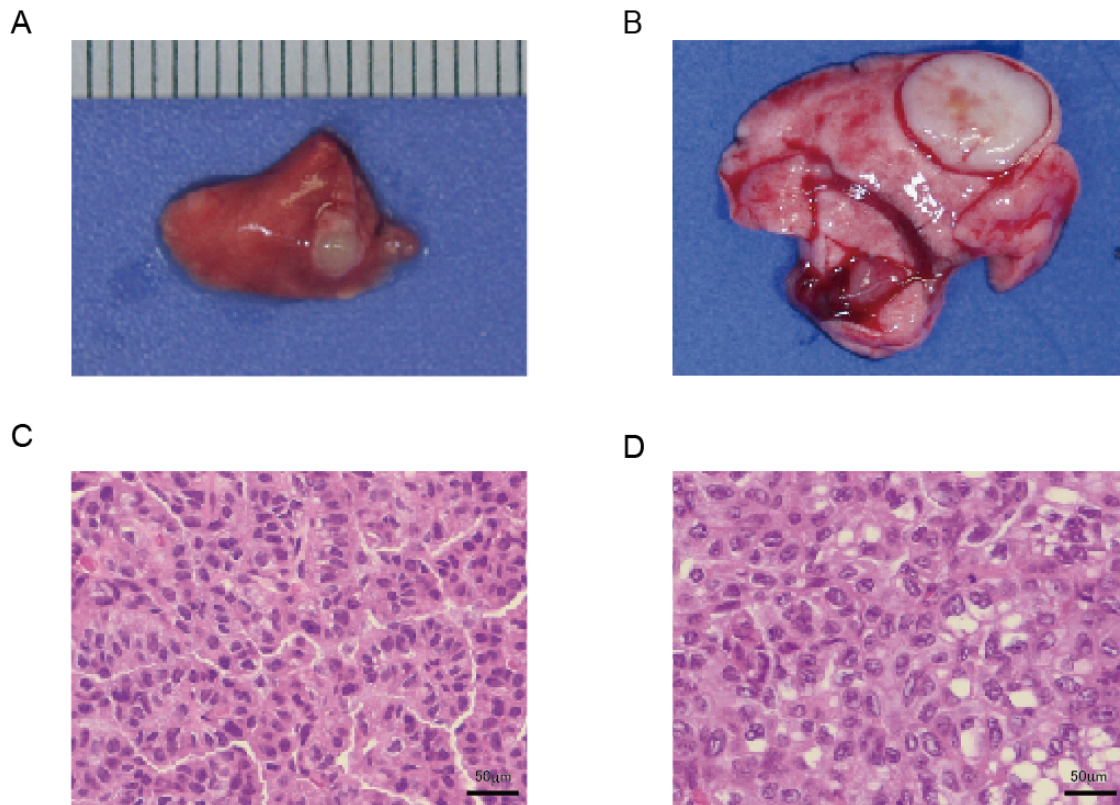


図2 *Cadm1*<sup>-/-</sup> マウスに自然発生した肺腫瘍の肉眼的所見と HE 染色標本  
 A. 月齢 15 ヲ月の *Cadm1*<sup>-/-</sup> マウスに自然発生した径 2mm の肺腫瘍。白色透明の膨隆性で境界明瞭な腫瘍であり、周囲への浸潤は認めない。B. 月齢 15 ヲ月の *Cadm1*<sup>-/-</sup> マウスに自然発生した径 5mm を超える巨大な肺腫瘍。巨大であるが膨隆性腫瘍であり、周囲との境界は明瞭で、周囲への明らかな浸潤は認めない。C. (A) の腫瘍の HE 染色標本。正常肺胞上皮は腫瘍細胞に置き換わっており、核の異型は高度ではない肺腺腫。腺管構造は一部保たれている。D. (B) と同じ腫瘍の HE 染色標本。核の異型度は強く、腺管構造はほぼ破壊されている肺腺がん。脂肪変性も伴う細胞異型が目立つ。

(参考文献<sup>29)</sup>)

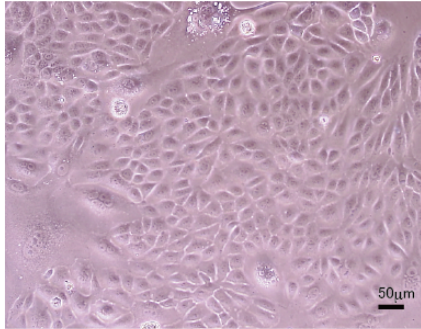
また、IMSMP1 は、原発巣におけるがん細胞間の接着に関わり、浸潤がんにおいて発現低下が報告されている遺伝子 *Cadm1* の発現が欠如していることから高い浸潤能を持つことが推測され、血中に遊離したがん細胞による転移成立の後半の過程を検討する本実験的肺転移系をより適切に反映していると考えられる。そこで、IMSMP1 細胞を用いて実験的肺転移を 8 回繰り返すことにより高転移性亜株を作成し、親株および 4 回転移株、8 回転移株を用いてマイクロアレイ解析により段階的な遺伝子変化を指標とした遺伝子抽出を行った。

## 材料と方法

### IMSMP1 細胞の高転移細胞亜株の作成

当研究室において、遺伝的背景が C57BL6/J 系統 : 129Sv 系統が 3 : 1 である *Cadm1* ノックアウトマウスに自然発生した肺腺がんより樹立した細胞株 IMSMP1 を用い、高転移性細胞株の作成を行った (図 3)。IMSMP1 をヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu、日本クレア社、東京、日本) の尾静脈に注射し、マウスが衰弱した時点で解剖し、肺に形成された独立した 2 つの転移巣からそれぞれ細胞株を作成し、IMSMP1-1PA (Pulmonary A) および IMSMP1-1PB (Pulmonary B) とした。さらに、両細胞株を用いてそれぞれ独立に同様の方法で実験的肺転移を繰り返すことにより、8 回転移株 IMSMP1-8PA および IMSMP1-8PB (以下 8PA および 8PB) の 2 系列の細胞株を作成した。肺腫瘍は無菌的に切除し、100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン (Invitrogen 社、Carlsbad, CA, USA) を加えた PBS にてよく洗浄した。10% ウシ胎児血清 (FBS) (BD Biosciences 社、Franklin Lakes, NJ)、100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン添加の Dulbecco's Modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) (Sigma Aldrich 社、St. Louis, MO, USA) 培地にて、径 1 mm 以下に細粒化し、シャーレ上で 5% CO<sub>2</sub> 湿潤インキュベーターにて 37°C で培養

A



B

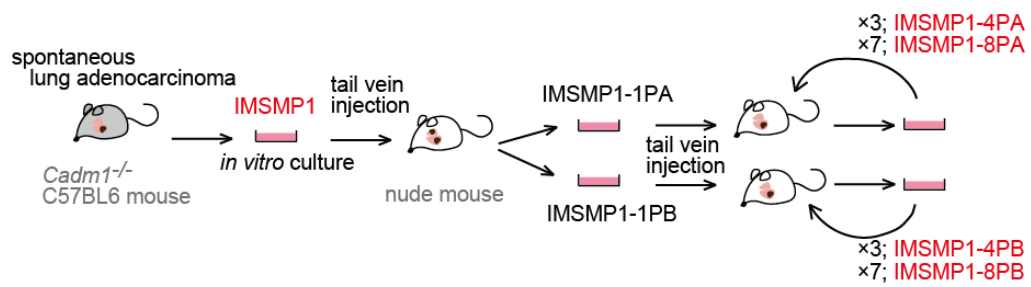


図3 マウス肺腺がん細胞株 IMSMP1 および高転移性亜株

A. *Cadm1*<sup>-/-</sup> マウスに自然発生した肺腺がんより樹立された IMSMP1 細胞株。 B. IMSMP1 細胞の高転移性亜株作成の模式図。IMSMP1 細胞の実験的肺転移を行い、それぞれ独立した転移巣より IMSMP1-1PA、IMSMP1-1PB を作成した。さらに両細胞株を用いて独立に実験的肺転移を繰り返し行うことにより、IMSMP1-4PA および IMSMP1-8PB を作成した。

した。2 日程度でシャーレ底面に細胞が接着してくるので、培地を週に 2 回程度交換し、培養を続けた。線維芽細胞が増殖した場合は、適宜 0.025%トリプシン/EDTA 溶液 (Invitrogen 社) 処理をして、線維芽細胞を優先的に剥離することにより除去した。マウスが衰弱するまでの期間は、親株 IMSMP1、IMSMP1-1P、IMSMP1-2P、IMSMP1-3P を尾静脈に注射後、それぞれ 34 日、27 日、21 日、14 日と、徐々に短縮していた。

## 細胞培養

IMSMP1、IMSMP1-4PA、IMSMP1-4PB (以下 4PA、4PB)、8PA、8PB およびそれぞれ遺伝子の安定発現株の培養に関しては、DMEM (1.0g/L Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (nacalai 社、京都、日本) に 10% FBS、100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用いた。レトロウイルスパッケージング細胞 Plat E の培養においては、DMEM (4.5 g/L Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (nacalai 社) に 10% FBS、100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン、1 µg/mL puromycin、10 µg/mL blasticidin を添加した培地を用いた<sup>32</sup>。

## 抗体

ウエスタンブロッティングに用いた抗体は、以下に示すとおり入手した。

Anti-HA ラットモノクローナル抗体 (3F10) は Roche 社 (Basel, Switzerland)、

Anti-Actin マウスモノクローナル抗体 (C-2) は Santa Cruz 社 (Santa Cruz, CA、

USA) より購入した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次

抗体は、goat-Anti-Rat IgG-HRP (Millipore 社、Billerica, MA, USA)、goat-Anti-Mouse

IgG-HRP (Millipore 社) を用いた。肺組織の染色には、一次抗体に Anti-CD31

ラットポリクローナル抗体 (BD Pharmingen 社)、二次抗体に Alexa Fluor® 568

Goat Anti-Rat IgG (H+L) (Invitrogen 社) を用いた。

## 実験的肺転移

培養中の細胞株を PBS で一回洗浄し、0.025%トリプシン/ EDTA 溶液により

剥離させた後、10% FBS 添加 DMEM を加えてトリプシンの反応を停止させた。

1,000 rpm で3分間遠心することにより細胞を一度沈殿させ、PBS に再懸濁させ

た。セルストレーナー (BD 社) を通して単細胞のみを抽出し、 $1.0 \times 10^6$  個/ mL

に細胞数を調製した。30 ゲージの針を用いて  $2.0 \times 10^5$  個/ 200  $\mu$ L をヌードマウス

の尾静脈に注射した。3週間後に解剖し、肺表面に形成された転移巣の数をカウ



ントした。腫瘍細胞の肺組織内への血行性定着測定では、 $5.0 \times 10^5$  個/ 200  $\mu\text{L}$  の 4PB/vector 細胞および 4PB/STC2-HA 細胞をヌードマウスの尾静脈に注射した。尾静脈注射後 1 時間および 24 時間後に、マウスを安楽死させ、肺を摘出して、4% Paraformaldehyde/ 0.3% triton X-100/ PBS を 30 分間浸透させて固定した。5mm 角ブロックに切断し、PBS で 30 分間 $\times$ 5 回洗浄し、10% goat serum/ PBS により 4°C で一晩ブロッキングした。一次抗体は抗 CD31 抗体を PBS で 1:100 に希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS で 30 分間 $\times$ 5 回洗浄し、二次抗体を PBS で 1:300 に希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS で 30 分間 $\times$ 5 回洗浄し、共焦点顕微鏡 (Nikon 社) により観察した。10 倍の倍率の対物レンズを用いて、ブロック 1 つ当たり 3 視野、マウス 1 匹当たり 3 ブロックとして撮影し、EGFP 発現細胞をカウントした。

### がん細胞の皮下移植

4PB/vector 細胞および 4PB/STC2-HA 細胞を PBS で一回洗浄し、0.025% トリプシン/ EDTA 溶液により剥離させた後、10% FBS 添加 DMEM を加えてトリプシンの反応を停止させた。1,000 rpm で 3 分間遠心することにより細胞を一度沈殿させ、PBS に再懸濁し、細胞数を  $5.0 \times 10^6$  個/ mL に調製した。30 ゲージの針を

用いて  $1.0 \times 10^6$  個/ 200  $\mu\text{L}$  をヌードマウスの背部の左右に 2 ヶ所ずつ皮下注射した。腫瘍径は 3 日ごとに測定し、容積は以下の計算式で算出した：(腫瘍容積) = (長径)  $\times$  (短径)<sup>2</sup>  $\times$  1/2。

### 軟寒天培地コロニーフォーメーションアッセイ

培養中の細胞株を PBS で一回洗浄し、0.025% トリプシン/ EDTA 溶液により剥離させた後、10% FBS 添加培地を加えてトリプシンの反応を停止させ、 $1.0 \times 10^5$  個/ mL に細胞数を調製した。0.33% Noble Agar (BD 社、214220) 入り培地 3 mL に  $1.0 \times 10^4$  個/ 100  $\mu\text{L}$  で細胞を懸濁し、0.5% Noble Agar 入り培地 2 mL を敷いた 6 cm dish に重層した。その後、室温で 30 分放置してゲルを固めた後、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。15 日後、顕微鏡下にて、形成された 50  $\mu\text{m}$  以上のコロニーの数をカウントした。

### 創傷治癒アッセイ

6 cm dish に  $5.0 \times 10^5$  個細胞をまき、80-90% コンフルエントになるよう単層培養し、2 日後に 200  $\mu\text{L}$  チップで 3 箇所に傷をつけ、顕微鏡 (BZ-8000、Keyence 社、大阪、日本) にて 1 創傷当たり 1 枚写真を撮影した。さらに 8 時間後と 16 時間

後に同じ箇所を撮影した。それぞれの写真中の傷の間隙の最短の幅を計測し、細胞の移動した距離および速度を算出した。

## マイクロアレイ解析

培養中の細胞をPBSで2回洗浄した後、セルスクレーパーで回収し、RNeasy mini kit (50) (QIAGEN 社、Germantown、MD、USA)により全RNAを精製した。One-Color Spike-Mix (Agilent 社、Santa Clara、CA、USA)により、一色法でmRNAをラベル化した。マイクロアレイには、SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8×60K (Agilent 社)を用いた。階層的クラスタリングの作成にはCluster 3.0を用い、画像の出力にはJava TreeViewを用いた。

## RNAの抽出および半定量的 RT-PCR、リアルタイム RT-PCR

培養中の細胞をPBSで2回洗浄した後、セルスクレーパーで回収し、RNeasy mini kit (50)により全RNAを精製した。Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche 社)を用い、Oligo dT primerにより逆転写反応を行い、cDNAを作成した。作成したcDNAは蒸留水で10倍希釈して用いた。半定量的PCRは、DNAポリメラーゼにKOD FX (TOYOBO 社、大阪、日本)を用いて、変性98°C 10秒、

アニール 55-60°C 20 秒、伸長 68°C 15 秒の反応条件にて行った。PCR 産物に 10×Loading Dye (0.02% Bromophenol blue, 0.02% Xylene cyanol FF, 0.2% Orange G, 50% Glycerol, 1% SDS) を加え、2%アガロース/ TBE のゲルにて泳動した。リアルタイム PCR は、*Nes*、*Prom1*、*Cd44*、*Tnf* に関しては、LightCycler TaqMan Master (Roche 社) を用いて Light Cycler (Roche 社) により行い、 $\Delta\Delta C_t$  法により発現量の相対値を算出した。その他の遺伝子に関しては、SYBR Green PCR Master Mix (applied biosystems 社) を用いて ABI 7300 real-time PCR system (applied biosystems 社) によりリアルタイム PCR を行い、 $\Delta\Delta C_t$  法により発現量の相対を算出した。PCR に用いたプライマーは表 2 に示した。

## レンチウイルス発現ベクターの作製

転移関連遺伝子のアミノ酸全長の C 末端に HA タグを付加した発現ベクターを作成するため、終止コドンの直上に HA 配列 (5' TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT 3') を挿入し、*PODNL1* (+1 / +1,536)、*CHRNA1* (+1 / +1,446)、*VLDLR* (+1 / +2,619)、*STC2* (+1 / +1,506)、*CHCHD10* (+1 / +447)、*PVRL3* (+1 / +1,647) を PCR で増幅した。ベクターには、レトロウイルスの pMX-IRES-GFP を用いた<sup>33</sup>。*PODNL1* は *EcoRI*-*HpaI* 間、*CHRNA1* お

表 2 RT-PCR に使用したプライマー

遺伝子	sense	antisense	PCR 産物 (bp)
<i>Actb</i>	5' -CTAAGGCCAACCGTGAAAAG- 3'	5' -ACCAGAGGCATACAGGGACA- 3'	104
<i>Arap3</i>	5' -GTGTTCCGCACAGAGAGTGA- 3'	5' -AAACACCTTGGCCTTGTGTC- 3'	161
<i>Aspm</i>	5' -GCTTCATCACCTGCTCACCTAC- 3'	5' -GTAGATACCGCTCCGCTTTCAG- 3'	126
<i>Atf5</i>	5' -TGGGCTGGCTCGTAGACTAT- 3'	5' -GAGAGCTGTGAAGTCCACCC- 3'	167
<i>Cd44</i>	5' -CCAACACCTCCCCTACTATGA- 3'	5' -TATACTCGCCCTTCTTGCTG- 3'	159
<i>Chchd10</i>	5' -GTGCCTTCAGTGGGGGAAAT- 3'	5' -CACAGGGTTAGGTCGCTCTG- 3'	154
<i>Chrna1</i>	5' -CCCTGAGGTGAAAAGCGCCA- 3'	5' -TGGCTATGGCTGGGACAGAGGT- 3'	250
<i>Cldn2</i>	5' -GCCCAGGCCATGATGGTGACG- 3'	5' -GTCAGGAACCAGCGGCGAGT- 3'	225
<i>Gapdh</i>	5' -CCACTCTTCCACCTTCGATG- 3'	5' -GGAGGGAGATGCTCAGTGTG- 3'	225
<i>Gramd1b</i>	5' -GCTCCAGGAAAGGTTACCCC- 3'	5' -TCCTCTTCTCGTCGCTCTCA- 3'	206
<i>Hspb1</i>	5' -ATCACTGGCAAGCACGAAGA- 3'	5' -GGCCTCGAAAGTAACCGGAA- 3'	204
<i>Hspb2</i>	5' -GACCCGATTGTTTCCGGTCT- 3'	5' -ACTGCCGAGTACGAATTTGC- 3'	513/231
<i>Iqgap3</i>	5' -CCTGGAACAGCTGACTTCAG- 3'	5' -CCACACAGCCTGGAGCATA- 3'	285
<i>Melk</i>	5' -TACCCGCTCACCAACCCGT- 3'	5' -AACGGCACCTCCTCTCGGGG- 3'	144
<i>Mrc1</i>	5' -TTGTGGTGAGCTGAAAGGTG- 3'	5' -GTGGATTGTCTTGTGGAGCA- 3'	137
<i>Mybl2</i>	5' -TCAAGAAGGTCCGCAAGTCT- 3'	5' -TGAGCAGGCTGTTACCCTCT- 3'	159
<i>Nes</i>	5' -GGAACCCAGAGACTGTGGAA- 3'	5' -CACATCCTCCCACCTCTGTT- 3'	434
<i>Nptx1</i>	5' -ATCCTCTGCCCTGGCTTAGA- 3'	5' -GCGGATTAGATTTGCGGCTG- 3'	246
<i>Podnl1</i>	5' -GCCTTTGAGTCCCTCAACCA- 3'	5' -GTACACAGACCGGAGTGCAG- 3'	171
<i>Ppbp</i>	5' -GCCTGCCCACTTCATAACCTC- 3'	5' -GGGTCCAGGCACGTTTTTTG- 3'	251
<i>Prom1</i>	5' -GCATTGGCATCTTCTATGGTT- 3'	5' -CGCCTTGTCTTGGTAGTGT- 3'	206
<i>Pvrl3</i>	5' -GGCAAAGCACAACTTTCCTC- 3'	5' -ACATTCTTCCCCACACTGC- 3'	179
<i>Rsl</i>	5' -CAGCAGCCAGTGGTTACAGA- 3'	5' -GACCCGATTGTTCCGGTCT- 3'	172
<i>Skor1</i>	5' -CACGACGCCCTGCACCACTT- 3'	5' -CCGCCACTGCAGCGGGTATT- 3'	162
<i>Stc2</i>	5' -TTCGATGCCAGGAAAAGTC- 3'	5' -TCTCCACAATCACACCGACG- 3'	193
<i>Tnf</i>	5' -TCTTCTCATTCTGCTTGTGG- 3'	5' -GGTCTGGGCCATAGAAGTGA- 3'	128
<i>Trim47</i>	5' -ATGGGCTACAGAAACTCGGC- 3'	5' -ACTCCGGGTAGTTGATGGGA- 3'	207
<i>Uhrfl</i>	5' -CTTCCAAGACAGGCAAAAAGC- 3'	5' -CCTCTTTCACCTTGCTCAGG- 3'	213
<i>Vldlr</i>	5' -TGACGCAGACTGTTACAGACC- 3'	5' -GTTCGAGAAGGGCAGTTGAC- 3'	189
<i>Zfp579</i>	5' -AGGTAGCGAGGTGGATCTGT- 3'	5' -CAGTGCCAACTCTGCCCTTA- 3'	250

よび *VLDLR*、*STC2*、*CHCHD10*、*PVRL3* は *EcoRI*-*NotI* 間に挿入した。

### 遺伝子の安定発現細胞株の作成

Opti-MEM 150  $\mu$ L (Invitrogen 社、Carlsbad, CA, USA) と Lipofectamine LTX 6  $\mu$ L (Invitrogen 社) の混合液 (A) と、Opto-MEM 150  $\mu$ L と PLUS reagent 3  $\mu$ L (Invitrogen 社) とレンチウイルス発現ベクター3  $\mu$ g の混合液 (B) を混ぜ合わせ、5 分間室温にてインキュベートした。培地を 10% FBS、100 units/mL ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン入りの DMEM (4.5 g/L Glucose) 2 mL に置換した Plat E 細胞に A と B の混合液を添加し、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。48 時間後、培養上清を回収し、0.22  $\mu$ m $\phi$  フィルター (Millipore 社) を通し、前日に 6 cm dish にまいておいた IMSMP1、4PB、8PA の培養上清と置換した。48 時間後、10 cm dish に継代し、細胞が 80-90%コンフルエントまで増えた時点で、FACS Aria (BD 社) により GFP 陽性画分をソートした。

### ウェスタンブロッティング

培養中の細胞をPBSで2回洗浄した後、PBSを添加し氷上にてセルスクレーパーで回収し1,000 rpmで3分間遠心にて細胞を沈殿させた後、上清を捨ててTriton

lysis buffer (50 mM tris (pH7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、200  $\mu$ M AEBSF、10  $\mu$ M leupeptin、1  $\mu$ M pepstatin A、1  $\mu$ M DTT) を加え、ピペッティングをし、4°Cで30分間ローテーションして溶解した。その後、4°Cに冷却した遠心機にて12,000 rpmで10分間遠心し、上清を回収した。上清の2  $\mu$ Lを158  $\mu$ Lの蒸留水で希釈し、Protein assay reagent (Bio-Rad 社、Hercules、CA、USA) 40  $\mu$ Lと混合し、MODEL 680 microplate reader (Bio-Rad 社) にて525nm波長の吸光度の検出を行い、タンパク質の濃度を算出した。上清に蒸留水と4 $\times$ SDS sample buffer (0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)、40% glycerol、8% SDS、20%  $\beta$ ME、0.2% BPB) を加えて1  $\mu$ g/ $\mu$ Lに揃え、95°Cで5分間煮沸し、氷上で10分間静置することで、ウエスタンブロッティング用の試料を得た。また、培養上清は70-80%コンフルエントまで培養した細胞の培地をEMEM (100 units/mL ペニシリンおよび100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン) に置換してさらに2日間培養した後、500  $\mu$ Lを回収し、amicon ultra-0.5 centrifugal filter devicesの10K devices (Millipore 社) を利用して約10 kDa以上のタンパク質を濃縮し、4 $\times$ SDS sample bufferを加えて、95°Cで5分間煮沸し、氷上で10分間静置することで、ウエスタンブロッティング用の試料とした。 SDS-PAGEゲル電気泳動は、10% acrylamide: bis Separating gelを用い、各ウェルに10  $\mu$ gの全細胞可溶化試料もしくは10 $\mu$ Lの培養上清試料を注入し、

SDS-PAGE electrode buffer (25 mM Tris、0.2 M Glycine、0.1% SDS) にて定電流 20-40 mAで行った。ブロッティングにはセミドライ方式を用い、あらかじめメタノール、続いてTransfer buffer (50 mM Tris、40 mM Glycine、20% メタノール、0.1% SDS) に浸したPVDF膜へトランスブロットSDセル (Bio-Rad社) にて定電流110 mAで60分間ブロッティングした。次にPVDF膜を3%スキムミルク/PBS-T に浸してブロッキングを行った。PBS-Tで一度洗浄し、一次抗体は Can Get immunoreaction enhancer solution (TOYOBO 社) のSolution 1を用いて1: 1000に希釈し、4°Cで一晩反応させた。PBS-Tで3回洗浄した後、二次抗体としてそれぞれの動物種のHRP標識抗体を、同じく CanGet SignalのSolution 2で1: 1000に希釈して加え、室温で1時間反応させた。再度PBS-Tで3回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社、Buckinghamshire、England) もしくはAmersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare 社) と反応させ、LAS-4000 mini (GE Healthcare 社) にて検出を行った。

### 増殖、血清飢餓アッセイ

生細胞の密度の測定には、CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を用い、MODEL 680 microplate reader にて 490 nm 波長の検



出を行った。培養中の細胞株を PBS により一回洗浄し、0.025%トリプシン/EDTA 溶液により剥離させた後、10% FBS 添加培地にてトリプシンの反応を停止させ、 $5.0 \times 10^3$  個/ mL および  $2.0 \times 10^4$  個/ mL に細胞数を調製した。増殖アッセイに関しては  $5.0 \times 10^2$  個/ 100  $\mu$ L/ well で 96-well plate にまき、直後に 0 時間として測定を行い、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。その後、24、72、120 時間後に測定を行った。血清飢餓培養に関しては  $2.0 \times 10^3$  個/ 100  $\mu$ L/ well で 96-well plate にまき、直後に 0 時間として測定を行い、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。12 時間後、培地を 0.2% FBS 添加培地 100  $\mu$ L に置換した。さらに 12、60、108 時間後にも測定を行った。各時点での測定には培地のみの well も用意し、全て 3 well ずつの測定値の平均値を結果として用いた。

## 統計学的解析

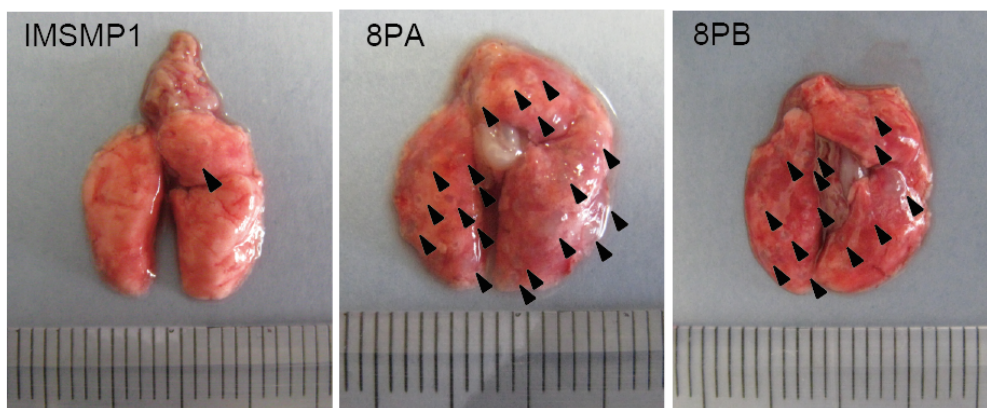
実験的肺転移における転移能の解析には、Mann-Whitney U test を用いた。qRT-PCR による mRNA 発現量の解析には、 $\Delta\Delta$ Ct 法により得られた値の log<sub>2</sub> 比を用いて One-sample t-test を行った。その他の解析には、Student's t-test を用いた。全ての解析において  $p < 0.05$  の場合、有意差ありと判定した。

## 結果

### 繰り返し転移細胞株の転移能、細胞特性の解析

独立した4回、8回転移株である4PA、4PB、8PA、8PBの転移能が、親株と比較して亢進しているかどうかを検討するために、それぞれの細胞をヌードマウスの尾静脈に $2.0 \times 10^5$ 細胞移植し、3週間後に解剖および肺に形成された転移巣の数を測定した(図4)。肺表面に形成された転移巣の数は、4PA(n=6、肺転移数156、107、99、44、23、3個)、4PB(n=6、肺転移数109、60、53、41、36、25個)および8PA(n=6、肺転移数356、313、179、174、13、6個)において、親株(n=6、肺転移数37、23、8、6、2、0個)と比較して有意に上昇していた(それぞれ $p = 0.045$ 、 $0.010$ 、 $0.045$ )。8PB(n=6、肺転移数337、103、39、15、5、1個)においては有意差を認めなかったが、転移巣数が上昇しているという傾向が見られた( $p = 0.262$ )。したがって、繰り返し転移株では転移能が亢進していることが示された。さらに、転移能の亢進した8PAの細胞の組織学的形質が、親株から変化しているかどうかについて調べるため、IMSMP1および8PAをヌードマウスの皮下に注射し、形成された腫瘍の組織像を観察した(図5)。IMSMP1は腺管構造を維持し、核異型度の低い高分化型の病理像を示している一方、8PAは核異型度の高い低分化型の病理像を示し、組織学的に悪性度が高

A



B

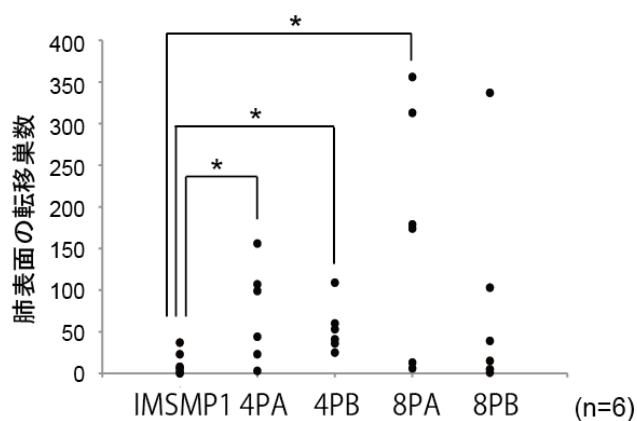
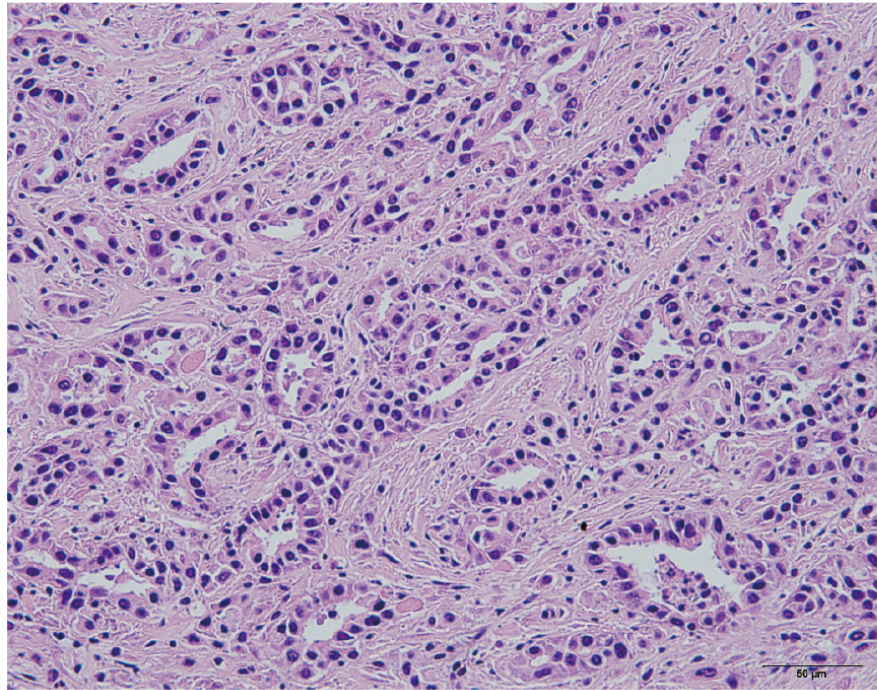


図4 IMSMP1 細胞および繰り返し転移亜株の病理および転移能の解析  
IMSMP1 細胞および繰り返し転移亜株を用いた実験的肺転移。A. 細胞をヌードマウスの尾静脈に注射して3週後の肺組織。表面に多数の転移巣が認められる。1 目盛 =1mm。B. 繰り返し転移株の肺への転移巣形成能は、IMSMP1 細胞と比較して有意に高い。(\*,  $P < 0.05$ )

IMSMP1



8PA

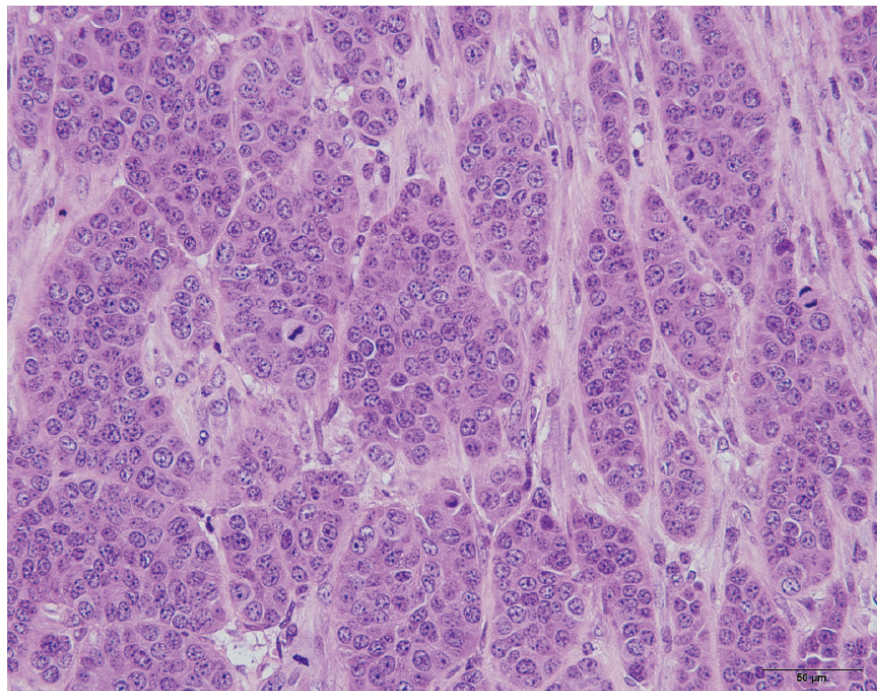


図5 IMSMP1細胞および繰り返し転移亜株の病理  
IMSMP1細胞および8PA細胞をヌードマウスへの皮下移植により形成された腫瘍の病理像。IMSMP1細胞が腺管構造をもつ高分化型の腺がんを形成しているのに対し、8PA細胞は核異型度の高い低分化腺がんを形成した。

いことが示された。

本研究で用いる実験的肺転移系は、がん細胞をマウスの尾静脈に直接注入し、肺に転移巣を形成させているため、転移の多段階過程における血管内浸潤後、つまり血中移動、血管内皮への接着、血管外遊走、転移巣形成の段階を反映していると考えられる。そこで、繰り返し転移株の転移能亢進が、転移のどの段階に関わっているかを調べるために、*in vitro* での検討を行った。まず、繰り返し転移株の増殖能が亢進しているかどうかを調べるため、軟寒天コロニーフォーメーションアッセイを行った (図 6A)。0.33% Noble agar 入りの培地で  $1.0 \times 10^4$  を 15 日間培養し、顕微鏡で形成されたコロニー数をカウントしたところ、4PA では  $168 \pm 97$  個、8PA では  $100 \pm 34$  個、8PB では  $389 \pm 154$  個となり、親株の  $57 \pm 15$  個と比較し、有意に強いコロニー形成能を示した (それぞれ  $p = 0.036, 0.033, 0.001$ )。さらに、8PB は 4PB の  $141 \pm 113$  個との比較においても、コロニー形成能の亢進を示した ( $p = 0.020$ )。次に、繰り返し転移株の遊走能が上昇しているかどうかを調べるために、創傷治癒アッセイを行った (図 6B)。80%-90% confluence まで単層培養した細胞にピペットチップの先端で傷をつけ、その間隙の閉じる速度を測定した。結果、親株が  $0.55 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{分}$  であるのに対し、4PA では  $0.53 \pm 0.23 \mu\text{m}/\text{分}$ 、4PB では  $0.47 \pm 0.25 \mu\text{m}/\text{分}$ 、8PA では  $0.46 \pm 0.20 \mu\text{m}/\text{分}$ 、

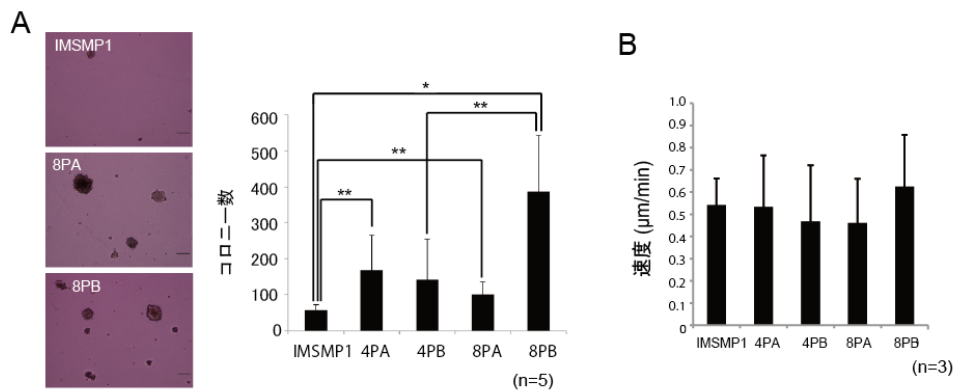


図6 IMSMP1 細胞および繰り返し転移亜株の *in vitro* における特性の解析

A. 軟寒天コロニーフォーメーションアッセイ。  $1.0 \times 10^4$  の細胞を、0.33% の軟寒天培地中で培養し、15 日後に形成されたコロニーの数をカウントした。繰り返し転移株では、IMSMP1 細胞と比較してコロニー形成能が有意に高い。(\*,  $P < 0.01$ . \*\*,  $P < 0.05$ ) B. 創傷治癒アッセイ。単層培養した細胞に傷を作り、その間隙の埋まる速度を測定した。IMSMP1 細胞と繰り返し転移株の遊走能に有意な差は見られなかった。



8PB では  $0.62 \pm 0.23 \mu\text{m}/\text{分}$  となり、統計学的有意差は認められなかった（それぞれ  $p = 0.918, 0.470, 0.374, 0.450$ ）。以上の結果より、IMSMP1 の繰り返し転移株は、実験的肺転移により悪性度が増し、転移能が亢進していることが示された。また繰り返し転移株の転移能亢進に寄与する細胞特性の1つとして、足場非依存的増殖の増強やアノキス回避能の亢進が関わることが示唆された。

## 高転移細胞株およびその親株の遺伝子発現プロファイルの比較による、新規転移関連遺伝子の探索

高転移能を示す繰り返し転移株と親株の遺伝子発現プロファイルとを比較することにより、転移に関わる新規遺伝子を同定するため、これらの細胞株から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現データは標準化を行い、転移促進候補遺伝子の探索のため、1) 4PA、4PB、8PA、8PB の発現量がそれぞれ IMSMP1 よりも大きく、2) 8PA と 8PB の平均発現量が IMSMP1 の 10 倍以上であり、3) 8PA と 8PB の平均シグナル強度が 1,000 以上であるという条件により、遺伝子の絞り込みを行ったところ、228 遺伝子が得られた（図 7A and B）。また、転移抑制候補遺伝子探索のため、1) 4PA、4PB、8PA、8PB の発現量がそれぞれ IMSMP1 よりも小さく、2) IMSMP1 に対する 8PA の値が

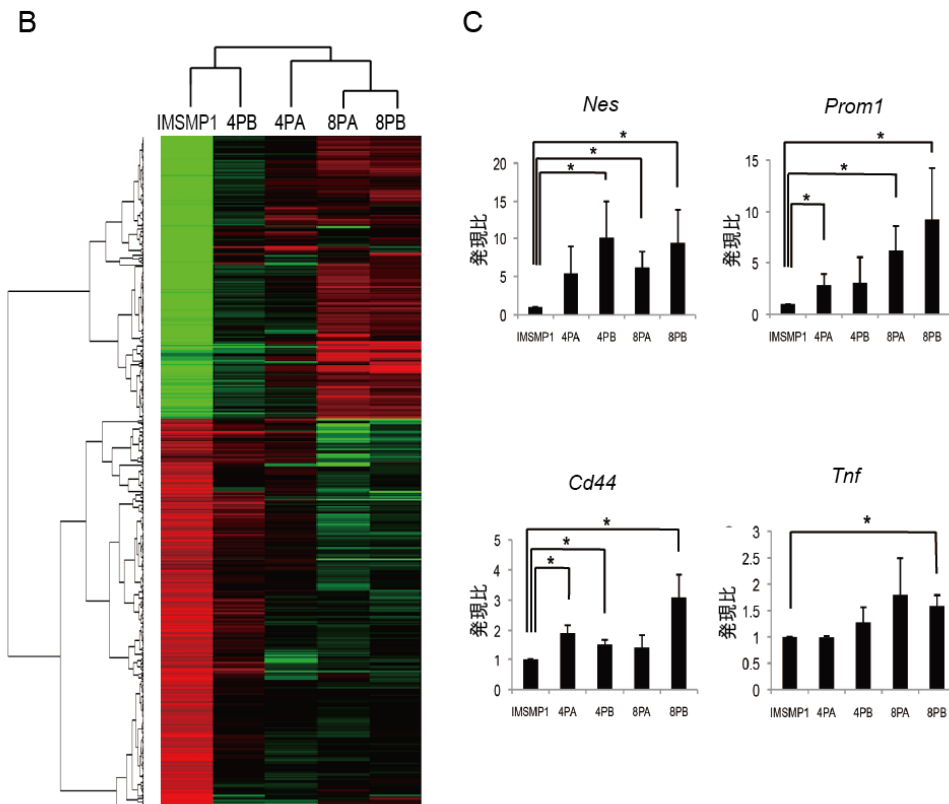
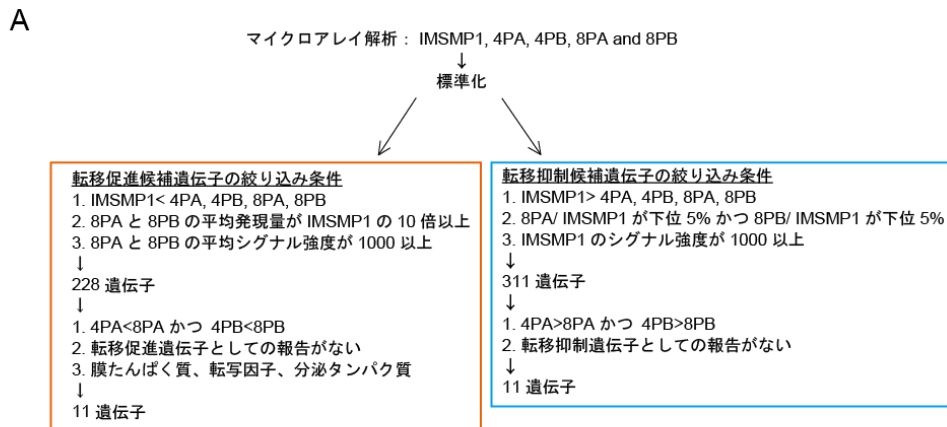


図7 マイクロアレイによる遺伝子発現解析

A. マイクロアレイ解析による転移関連候補遺伝子の絞り込みのフローチャート。B. 階層的クラスタリング。C. マイクロアレイ解析より選出した遺伝子(表3)に関して、リアルタイム RT-PCR により発現量の測定を行った。幹細胞マーカー遺伝子や既知の転移促進遺伝子の発現が、IMSMP1 細胞と比較して、繰り返し転移亜株において高いことが示された (\*,  $P < 0.05$ )。



下位 5%かつ IMSMP1 に対する 8PB の値が下位 5%であり、3) IMSMP1 の値が 1,000 以上であるという条件により絞り込みを行ったところ、311 遺伝子が得られた。転移促進候補遺伝子である 228 遺伝子には、既知の転移促進遺伝子 (*Cldn2*、*Tnf*) に加え、幹細胞マーカー遺伝子 (*Nes*、*Prom1*、*Cd44*)、細胞周期進行を促進する遺伝子 (*Ccna2*、*Ccnb1*、*Cdc6*、*Ccnb2*) が含まれていた (表 3)。また、これらの遺伝子発現についてリアルタイム RT-PCR により定量を行ったところ、*Nes*、*Prom1*、*Cd44*、*Tnf* の発現が、親株と比較して繰り返し転移株で有意に高いという結果が得られた (図 7C)。マイクロアレイ解析およびその後のリアルタイム RT-PCR により、繰り返し転移株で親株と比較して有意に発現が高い遺伝子として、既知の転移促進遺伝子や幹細胞マーカー遺伝子を得られたことから、このスクリーニング系が新規転移関連遺伝子の探索に適切であると考えられた。

### 新規転移促進遺伝子の探索

繰り返し転移株で発現の高い 228 候補遺伝子のうち、1) 4PA<8PA かつ 4PB<8PB で段階的な発現増加が見られ、2) まだ転移促進遺伝子としての報告のない遺伝子であり、かつ 3) 膜タンパク質や転写因子、キナーゼなどの抗体医薬や各

表 3 マイクロアレイ解析により、繰り返し転移亜株において高発現が見られた既知の転移促進遺伝子または幹細胞マーカー

遺伝子	相対的变化	
	4P*/IMSMP1	8P**/IMSMP1
Stem cell marker		
Nes (nestin)	70.8	190.0
Prom1 (CD133)	5.0	43.8
CD44 (CD44 antigen)	7.0	12.9
Cell cycle		
Ccna2 (cyclin A2)	84.1	287.2
Ccnb1 (cyclin B1)	69.9	163.4
Cdc6 (cell division cycle 6)	28.1	130.4
Ccnb2 (cyclin B2)	43.3	92.1
Metastasis Promoting factors		
Cldn2 (claudin2)	9.7	110.7
Tnf (tumor necrosis factor)	6.5	44.3

\* 4P: 4PA と 4PB の平均値

\*\* 8P: 8PA と 8PB の平均値

種阻害剤による介入が可能と考えられる分子として、11 遺伝子を新規転移促進候補遺伝子として同定した (図 7A、表 4)。これらの遺伝子の発現を調べるため半定量的 RT-PCR を行ったところ *Podnl1* (*Podocan-like 1*)、*Chrna1* (*Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1*)、*Aspm* (*Abnormal spindle homolog, microcephaly associated*)、*Arap3* (*ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 3*) の発現が繰り返し転移株で高いという結果が得られた (図 8A)。さらにこの 4 遺伝子の発現を定量するためリアルタイム PCR を行ったところ、*Podnl1* の発現が、親株と比較して平均値で 4PA は 10 倍、8PA は 8 倍と有意に高く (それぞれ  $p = 0.0498$ 、 $0.046$ )、また有意差は認めないものの 4PB では 6 倍、8PB では 15 倍の高発現が見られた (それぞれ  $p = 0.075$ 、 $0.062$ ) (図 8B)。また、*Chrna1* の発現は、親株と比較して平均値で 4PA は 17 倍、4PB は 10 倍、8PA は 19 倍、8PB は 40 倍と有意に高かった (それぞれ  $p = 0.008$ 、 $0.015$ 、 $0.006$ 、 $0.006$ )。 *Aspm* および *Arap3* に関しては、細胞株間に有意な発現の差は認められなかった。

次に、*Podnl1* および *Chrna1* が転移促進遺伝子としての機能をもつかどうかを検討するため、レトロウイルスの系によりこれらの遺伝子を恒常的に発現する細胞株を作成した (図 9A)。ここで、発現させる遺伝子はヒト由来の配列を用い、細胞株は IMSMP1 とし、IMSMP1/PODNL1-HA および IMSMP1/CHRNA1-HA

表 4 マイクロアレイ解析により、繰り返し転移亜株において高発現が見られ、転移促進候補遺伝子として選出した遺伝子

遺伝子	相対的变化	
	4P*/IMSMP1	8P**/IMSMP1
Iqgap3 (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 3)	36.50	165.24
Mrc1 (Mannose Receptor, C Type 1)	109.90	130.69
Ppbp (Pro-Platelet Basic Protein )	29.24	121.10
Podnl1 (podocan-like 1)	21.26	79.89
Uhrf1 (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1)	20.82	76.64
Chrna1 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1)	14.96	60.30
Melk (maternal embryonic leucine zipper kinase)	7.84	59.30
Aspm (abnormal spindle homolog, microcephaly associated )	20.11	57.68
Arap3 (ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 3)	16.56	37.53
Mybl2 (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2)	5.62	30.48
Nptx1 (Neuronal Pentraxin I)	7.48	10.29

\* 4P: 4PA と 4PB の平均値

\*\* 8P: 8PA と 8PB の平均値

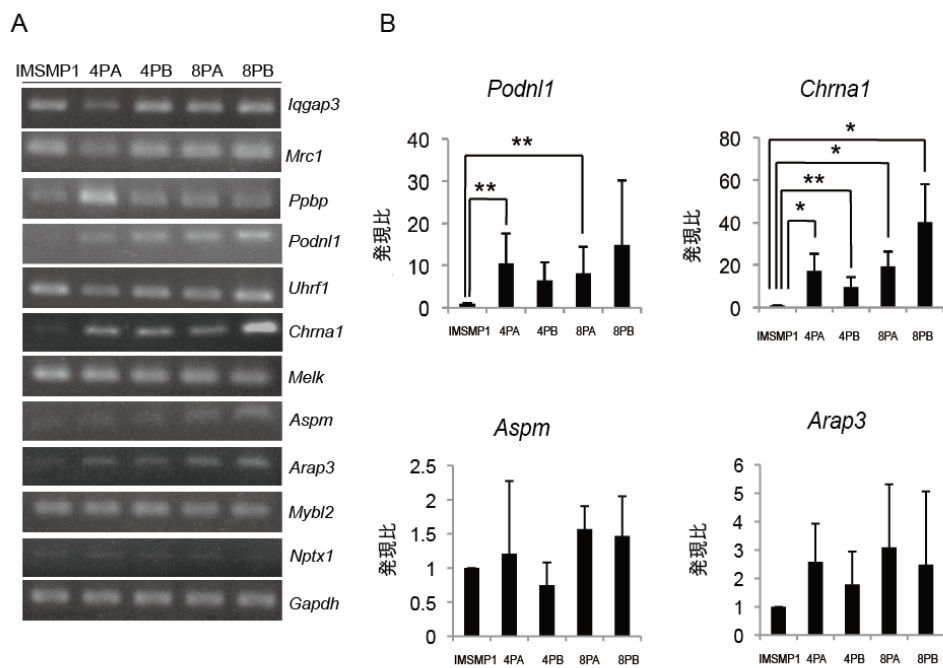


図 8 マイクロアレイ解析により転移促進候補遺伝子として選出した遺伝子の発現量測定

A. 繰り返し転移亜株において発現の高い遺伝子を、転移促進候補遺伝子として選出し、半定量的 RT-PCR により発現量の測定を行ったところ、*Podnl1*、*Chrna1*、*Aspm*、*Arap3* の発現が繰り返し転移株で高いことが示された。B. 半定量的 RT-PCR により、繰り返し転移株で発現の高かった遺伝子に関して、リアルタイム RT-PCR により発現の定量を行ったところ、*Podnl1* および *Chrna1* の発現が繰り返し転移株で高かった (\*,  $P < 0.01$ . \*\*,  $P < 0.05$ )。

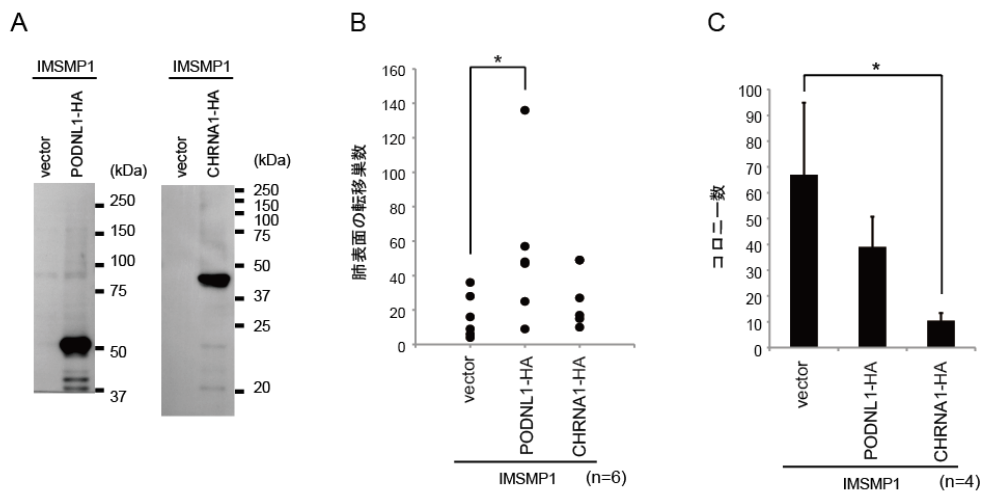


図9 転移促進候補遺伝子の転移能およびコロニー形成能への影響

A. IMSMPI 細胞の PODNL1-HA (56 kDa) 安定発現株および CHRNA1-HA (55 kDa) 安定発現株の $\alpha$ -HA 抗体によるウエスタンブロッティング。B. 安定発現株を用いた実験的肺転移。 $2.0 \times 10^5$  細胞 / 200  $\mu$ l PBS をヌードマウスの尾静脈に移植し、3 週間後に肺表面に形成された転移巣の数をカウントした。C. 軟寒天コロニーフォーメーションアッセイ。 $1.0 \times 10^4$  細胞を 0.33% の軟寒天培地中で培養し、15 日後に形成されたコロニーの数をカウントした (\*,  $P < 0.05$ )。

と命名した。まず、IMSMP1/PODNL1-HA、IMSMP1/CHRNA1-HA および陰性コントロールとして IMSMP1/vector をヌードマウスの尾静脈に  $2.0 \times 10^5$  細胞それぞれ注射し、3 週間後に解剖および肺に形成される転移巣の数を測定した (図 9B)。

結果、IMSMP1/vector (n=6、肺転移数 36、28、16、9、6、4 個) と比較し、IMSMP1/CHRNA1-HA (n=6、肺転移数 49、49、27、17、15、10 個) に転移能の亢進は見られなかったが ( $p = 0.199$ )、IMSMP1/PODNL1-HA (n=6、肺転移数 136、57、48、47、25、9 個) においては有意に肺への転移能が亢進された ( $p = 0.045$ )。

さらに、これらの細胞を用いて軟寒天培地コロニーフォーメーションアッセイを行い、足場非依存的増殖能への影響を検討した。その結果、IMSMP1/PODNL1-HA では  $39 \pm 12$  個のコロニーが形成されたのに対し、IMSMP1/vector では  $67 \pm 28$  個であり有意な変化は認められなかったが ( $p = 0.072$ )、IMSMP1/CHRNA1-HA 細胞では  $10 \pm 3$  個のみしか形成されず、コントロールと比較して有意なコロニー形成能低下が見られた ( $p = 0.010$ ) (図 9C)。以上の結果より、PODNL1 が転移能の促進に働くということが示唆された。

CHRNA1 単独の発現はヌードマウスへの 4PB 細胞の尾静脈注入による肺転移巣数には影響を及ぼさなかったが、軟寒天培地中でのコロニー形成を抑制したことから、*in vitro* での細胞生存能を負に制御している可能性が考えられる。した

がって、CHRNA1 の転移促進能は明らかでなく、CHRNA1 の発現上昇は、転移とは関係のない遺伝子発現変化である可能性も考えられる。

### 新規転移抑制遺伝子の探索

繰り返し転移株で発現の低い 311 遺伝子のうち、1) 4PA> 8PA かつ 4PB> 8PB で段階的な発現減少が見られ、2) まだ転移抑制遺伝子として報告のない 11 遺伝子を新規転移抑制候補遺伝子として同定した (図 7A、表 5)。これらの遺伝子の発現を調べるため半定量的 RT-PCR を行ったところ *Vldlr* (*Very low density lipoprotein receptor*)、*Stc2* (*Stanniocalcin 2*)、*Chchd10* (*Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10*)、*Hspb2* (*heat shock 27kDa protein 2*)、*Pvrl3* (*Poliovirus receptor-related 3*) の発現が繰り返し転移株で低いという結果が得られた (図 10A)。さらに、これらの 5 遺伝子の発現を定量するためリアルタイム PCR を行ったところ、*Vldlr* の発現が、親株と比較して平均値で 8PB は 0.06 倍と有意に低く ( $p = 0.007$ )、また有意差は認めなかったものの 8PA では 14%と発現の低い傾向が得られた ( $p = 0.061$ ) (図 10B)。*Stc2* に関しては、親株と比較して平均値で 4PA は 0.06 倍、4PB は 0.05 倍、8PA は 0.02 倍、8PB は 0.008 倍と有意に低かった (それぞれ  $p = 0.004$ 、 $0.007$ 、 $0.007$ 、 $0.005$ )。



表 5 マイクロアレイ解析により、繰り返し転移亜株において発現低下が見られ、転移抑制候補遺伝子として選出した遺伝子

遺伝子	相対的变化	
	4P*/IMSMP1	8P**/IMSMP1
Vldlr (very low density lipoprotein receptor)	0.011	0.001
Stc2 (stanniocalcin 2)	0.483	0.029
Atf5 (Activating Transcription Factor 5)	0.233	0.048
Chchd10 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10)	0.436	0.080
Trim47 (Tripartite Motif Containing 47)	0.107	0.082
Hspb1 (Heat Shock 27kDa Protein 1)	0.172	0.120
Zfp579 (Zinc Finger Protein 579)	0.238	0.166
Gramd1b (GRAM Domain Containing 1B)	0.493	0.179
Rs1 (Retinoschisin 1)	0.247	0.186
Hspb2 (heat shock 27kDa protein 2)	0.532	0.257
Pvr13 (poliovirus receptor-related 3)	0.555	0.332

\* 4P: 4PA と 4PB の平均値

\*\* 8P: 8PA と 8PB の平均値

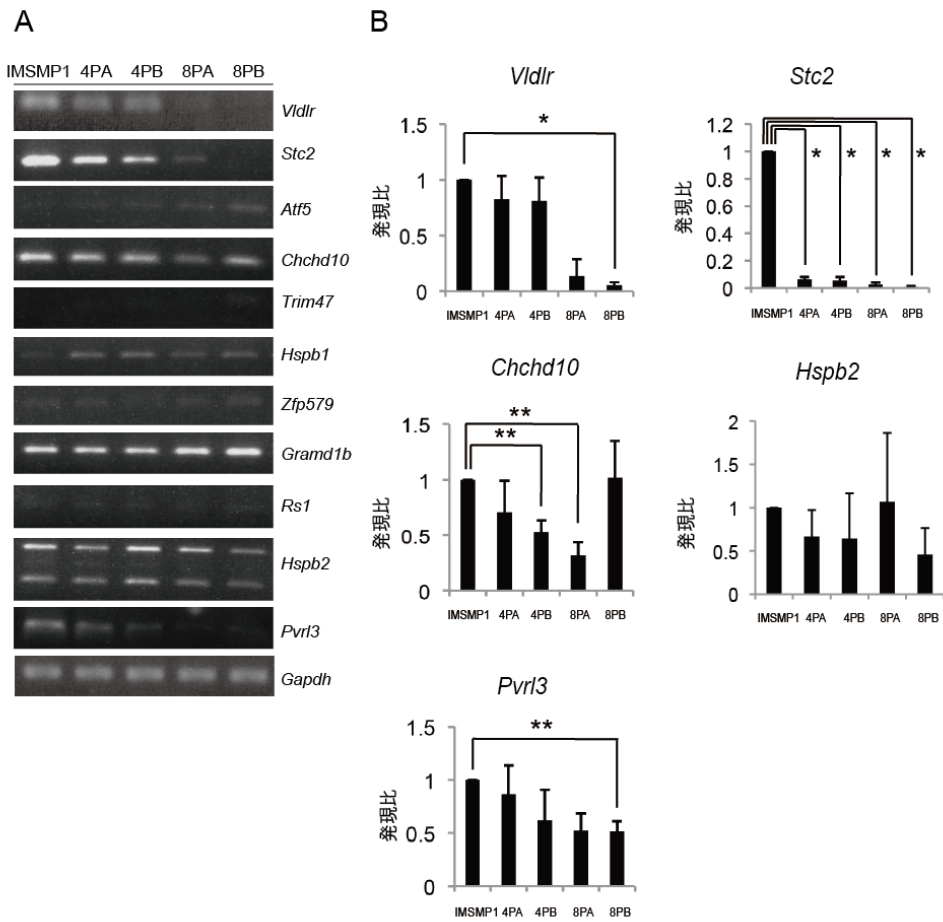


図 10 マイクロアレイ解析により転移抑制候補遺伝子として選出した遺伝子の発現量測定

A. 繰り返し転移亜株において発現の低い遺伝子を、転移抑制候補遺伝子として選出し、半定量的 RT-PCR により発現量の測定を行ったところ、*Vldlr*、*Stc2*、*Chchd10*、*Hspb2*、*Pvr13* の発現が繰り返し転移株で低いことが示された。B. 半定量的 RT-PCR により、繰り返し転移株で発現の低下していた遺伝子に関して、リアルタイム RT-PCR により発現の定量を行ったところ、*Vldlr*、*Stc2*、*Chchd10*、*Pvr13* の発現が繰り返し転移株で低かった (\*,  $P < 0.01$ . \*\*,  $P < 0.05$ )。

さらに、*Chchd10* に関しては平均値で 4PB は 0.54 倍、8PA は 0.32 倍、*Pvrl3* に関しては 8PB で 0.52 倍と、親株と比較して有意に発現が低かった（それぞれ  $p = 0.034$ 、 $0.042$ 、 $0.022$ ）。*Hspb2* に関しては、細胞株間で発現の差は認められなかった。

次に、*Vldlr*、*Stc2*、*Chchd10* および *Pvrl3* が転移抑制遺伝子としての機能を有するかどうかを調べるために、これらの遺伝子を恒常的に発現する細胞株を作成した（図 11A）。発現させる遺伝子はヒト由来の配列を用いた。また、STC2 に関しては、有意にその発現が低く、実験的肺転移において安定した転移能の亢進が見られた 4PB に過剰発現させ、4PB/STC2-HA とした。一方で、VLDLR、CHCHD10 および PVRL3 に関しては、有意に発現が低い 8PA に過剰発現させ、それぞれ 8PA/VLDLR-HA、8PA/CHCHD10-HA および 8PA/PVRL3-HA とした。まず、4PB/STC2-HA および陰性コントロールとして 4PB/vector をヌードマウスの尾静脈に  $2.0 \times 10^5$  細胞それぞれ注射し、3 週間後に解剖および肺に形成される転移巣の数を測定した（図 11B）。その結果、4PB/STC2-HA ( $n=6$ 、肺転移数 149、50、21、6、4、3) では 4PB/vector ( $n=6$ 、肺転移数 175、95、74、72、56、51) と比較して有意に肺への転移巣形成が少なかった ( $p = 0.037$ )。さらに、これらの細胞を用いて軟寒天培地コロニーフォーメーションアッセイを行い、足場非

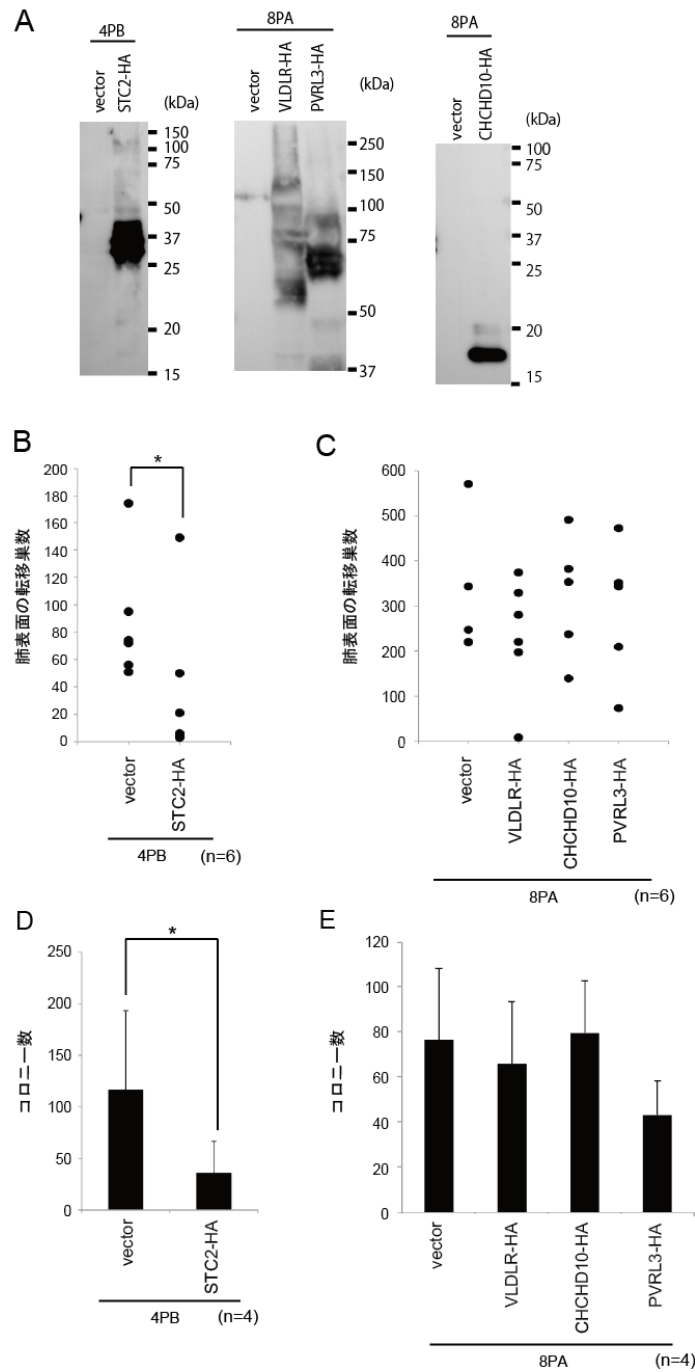


図 11 転移抑制候補遺伝子の転移能およびコロニー形成能への影響  
 A. 4PB 細胞の STC2-HA (33 kDa) 安定発現株および 8PA 細胞の VLDLR-HA (143-161 kDa)、CHCHD10-HA (14 kDa)、PVRL3-HA (83 kDa) 安定発現株の  $\alpha$ -HA 抗体によるウエスタンブロッティング。B and C. 安定発現株を用いた実験的肺転移。  $2.0 \times 10^5$  細胞 / 200  $\mu$ l PBS をヌードマウスの尾静脈に移植し、3 週間後に肺表面に形成された転移巣の数をカウントした。D and E. 軟寒天コロニーフォーメーションアッセイ。  $1.0 \times 10^4$  細胞を 0.33% の軟寒天培地中で培養し、15 日後に形成されたコロニーの数をカウントした (\*,  $P < 0.05$ )。

依存的増殖能への影響を検討した。その結果、4PB/vector では形成されたコロニー数が  $117 \pm 76$  個であったのに対し、4PB/STC2-HA では  $36 \pm 30$  個であり、有意にコロニー形成能が低下した (図 11D)。一方で、実験的肺転移において、8PA/VLDLR-HA (n=6、肺転移数 374、329、280、220、197、8)、8PA/CHCHD10-HA (n=6、肺転移数 491、382、353、271、237、139) および 8PA/PVRL3-HA (n=6、肺転移数 472、351、343、210、209、73) に関しては、ネガティブコントロールの 8PA/vector (n=5、肺転移数 571、343、247、220、219) との間に有意な肺への転移巣形成能の差は認められなかった (それぞれ  $p = 0.522$ 、 $0.715$ 、 $0.522$ ) (図 11C)。また、軟寒天培地コロニーフォーメーションアッセイにおいても、形成されたコロニー数は 8PA/VLDLR-HA では  $66 \pm 27$  個、8PA/CHCHD10-HA では  $79 \pm 23$  個、8PA/PVRL3-HA では  $43 \pm 15$  個であり 8PA/vector の  $77 \pm 31$  個との間に、有意な差は認められなかった (それぞれ  $p = 0.467$ 、 $0.561$ 、 $0.084$ ) (図 11E)。以上の結果より、STC2 が肺腺がん細胞の転移能の抑制に働くことが示された。

## STC2 の機能解析

STC2 は、硬骨魚のカルシウム輸送調節因子として同定された STC (Stanniocalcin) のホモログである STC1 (Stanniocalcin 1) と 30%のアミノ酸相

同性をもつ遺伝子であり、分泌型の糖タンパク質ホルモンである<sup>34-36</sup> (図 12A)。

哺乳類においてはほとんどの組織で発現が見られる<sup>37,38</sup>。しかしながら、STC2 の受容体は未だ同定されておらず、下流のシグナル経路についても報告が少ない。一方で、最近の研究により STC2 は小胞体に局在し、カルシウムイオンの細胞内への流入抑制に細胞内で機能することも報告されている<sup>39</sup>。そこでまず、STC2 の 4PB への過剰発現により軟寒天培地中でのコロニー形成が抑制されたことから、STC2 が自己分泌 (autocrine) タンパク質として機能し、足場非依存的増殖を抑制しているのかどうかを検討することとした。そこでまず、4PB/STC2-HA が STC2-HA を細胞外へ分泌しているかどうか調べるため、4PB/vector および 4PB/STC1-HA の培養上清を濃縮し、抗 HA 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、上清培地中の STC2-HA の存在が検出された (図 12B)。さらに、外因的に STC2 刺激を行うことで細胞のコロニー形成能が抑制されるかどうかを検討するため、4PB/vector および 4PB/STC2-HA の培養上清により作成した軟寒天培地に 4PB 細胞を埋め込み、軟寒天コロニーフォーメーションアッセイを行った (図 12C)。その結果、4PB/vector の培養上清を用いた場合で  $116 \pm 39$  個のコロニーが形成されたのに対し、4PB/STC2-HA の培

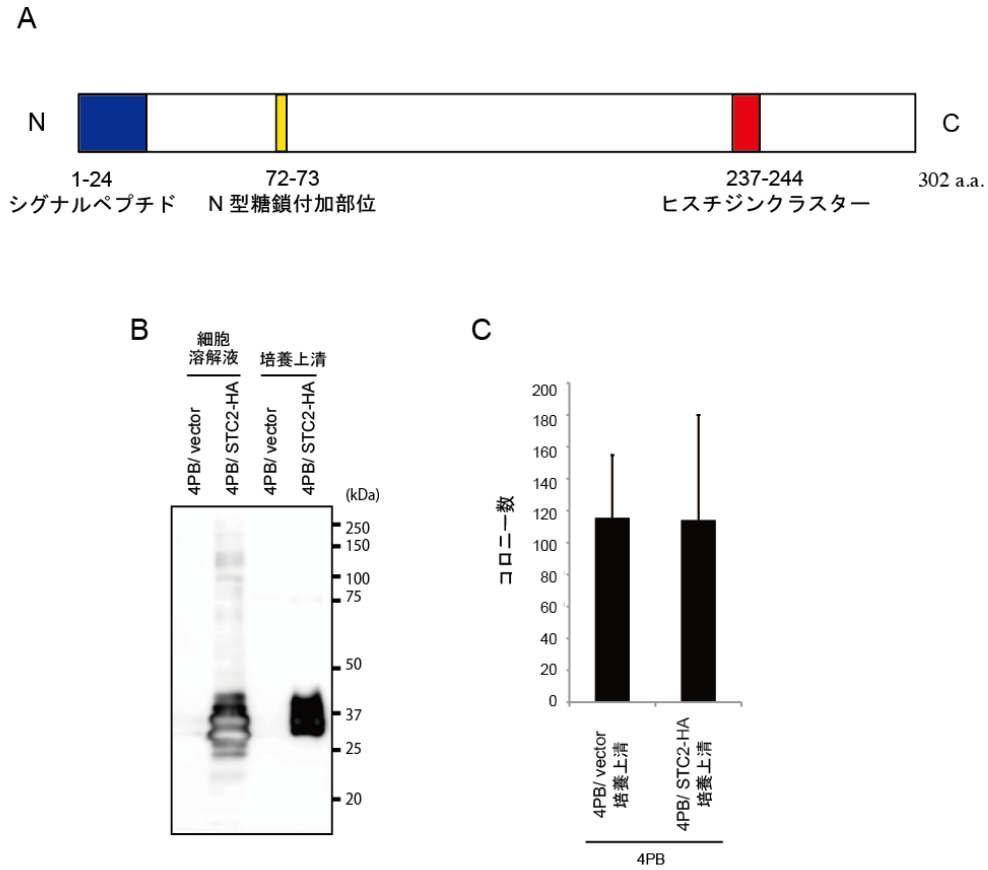


図 12 転移抑制候補遺伝子 STC2 の外因的刺激によるコロニー形成能への影響  
 A. STC2 の構造。STC2 は糖タンパク質ホルモンであり、302 アミノ酸から成る。N 端にシグナルペプチドをもち、小胞体に取り込まれた後に細胞外へ分泌される。B. 4PB/ STC2-HA (33 kDa) の細胞溶解液および培養上清の $\alpha$ -HA 抗体によるウェスタンブロッティング。C. 軟寒天コロニーフォーメーションアッセイ。 $1.0 \times 10^4$  の 4PB 細胞を、4PB/ STC2-HA の培養上清を用いて作成した 0.33% の軟寒天培地中で培養し、15 日後に形成されたコロニーの数をカウントした。STC2 含有培地によるコロニー形成能への影響は見られなかった。

養上清を用いた場合では  $114 \pm 66$  個であり両者に差は見られず ( $p = 0.962$ )、外因的な STC2 刺激によるコロニー形成数への影響は、この実験条件では見られなかった。以上の結果より、STC2 は 4PB のコロニー形成能抑制において、自己分泌タンパク質としての機能というよりはむしろ、細胞内で機能している可能性が考えられる。ただし、今回の実験は 4PB/STC2-HA の培養上清を用いて作成した軟寒天を用いているが、分泌タンパク質の量や安定性は不明であり、さらに継続的に STC2 を添加することによりコロニー形成能が抑制される可能性もあると考えられる。

さらに STC2 の転移抑制因子としての機能を調べるため、4PB/vector および 4PB/STC2-HA を用いて増殖アッセイ、血清飢餓アッセイ、創傷治癒アッセイを行った (図 13)。増殖アッセイおよび血清飢餓アッセイでの細胞数の測定は、CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay を用い、MTS テトラゾリウム化合物が代謝活性のある生細胞の脱水素酵素活性により水溶性ホルマザン産物へと変換され、培養液の吸光度が変化する仕組みを利用し、生細胞数の指標として測定した。まず、増殖アッセイでは、 $5.0 \times 10^2$  細胞を 96-well plate にまき、0、24、72、120 時間後の吸光度を測定した。その結果、4PB/vector と 4PB/STC2-HA の増殖速度に差は見られなかった。また、血清飢餓アッセイでは、



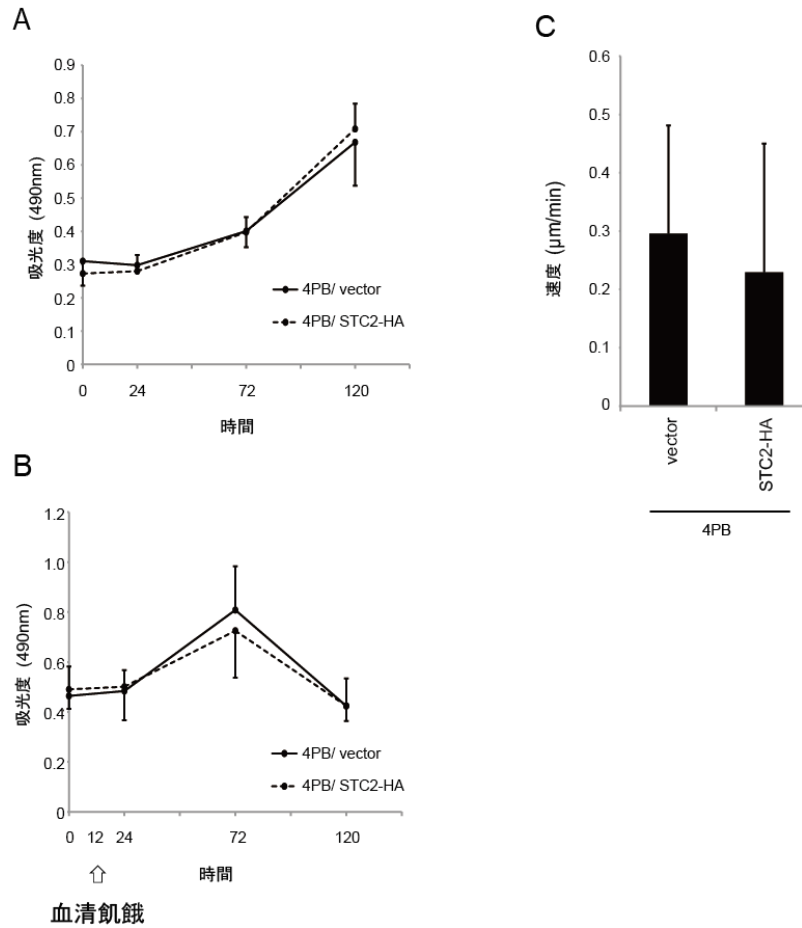


図 13 転移抑制候補遺伝子 STC2 の細胞の増殖能、血清飢餓状態における生存能および遊走能への影響

A. 4PB/ STC2-HA の増殖アッセイ。96-well plate に  $5.0 \times 10^2$  の細胞をまき、経時的に生細胞の測定を行った。B. 4PB/ STC2-HA の血清飢餓アッセイ。96-well plate に  $2.0 \times 10^3$  の細胞をまき、12 時間後に 0.2% FBP 含有の培地に置換し、経時的に生細胞の測定を行った。C. 4PB/ STC2-HA の創傷治癒アッセイ。4PB/ STC2-HA と 4PB/ vector との間に細胞の増殖能、血清飢餓状態における生存能および遊走能の差は見られなかった。

2.0×10<sup>3</sup> 細胞を 96-well plate に播種し、0 時間を測定し、12 時間後に培地を 0.2% FBS 含有培地に置換し、さらに 24、72、120 時間後の吸光度を測定した。結果、4PB/vector と 4PB/STC2-HA の吸光度に差は見られなかった。次に、創傷治癒アッセイを行い、細胞遊走能について比較を行ったが、4PB/vector では 0.30 ± 0.19 μm であるのに対し、4PB/STC2-HA では 0.23 ± 0.22 μm であり、両細胞間に有意差は認められなかった ( $p = 0.300$ )。以上の結果より、STC2 は、二次元培養下における増殖能や血清飢餓状態での増殖および細胞死、また細胞遊走能には直接関与せず、足場非依存的増殖のみ抑制することから、多段階転移の過程においては転移巣形成を抑制している可能性が考えられた。

そこで、さらに STC2 の転移巣形成の段階への関与を検討するため、ヌードマウスに 4PB/STC2-HA およびコントロール細胞を皮下移植し、形成される腫瘍の体積を 3 日ごとに 3 週間後まで計測し、生体内でのがん細胞増殖を抑制するかどうかを調べた (図 14)。その結果、移植後 6 日目の計測では、4PB/STC2-HA は 44.9 ± 12.0 mm<sup>3</sup> であり、4PB/vector の 74.4 ± 25.9 mm<sup>3</sup> と比較して有意に腫瘍体積が小さかった ( $p = 0.030$ )。さらに移植後 21 日目の段階においても、4PB/STC2-HA は 366.9 ± 88.6 mm<sup>3</sup> であり、4PB/vector の 493.7 ± 105.9 mm<sup>3</sup> と比較して有意に腫瘍体積が小さかった ( $p = 0.048$ )。したがって、STC2 は生体内での

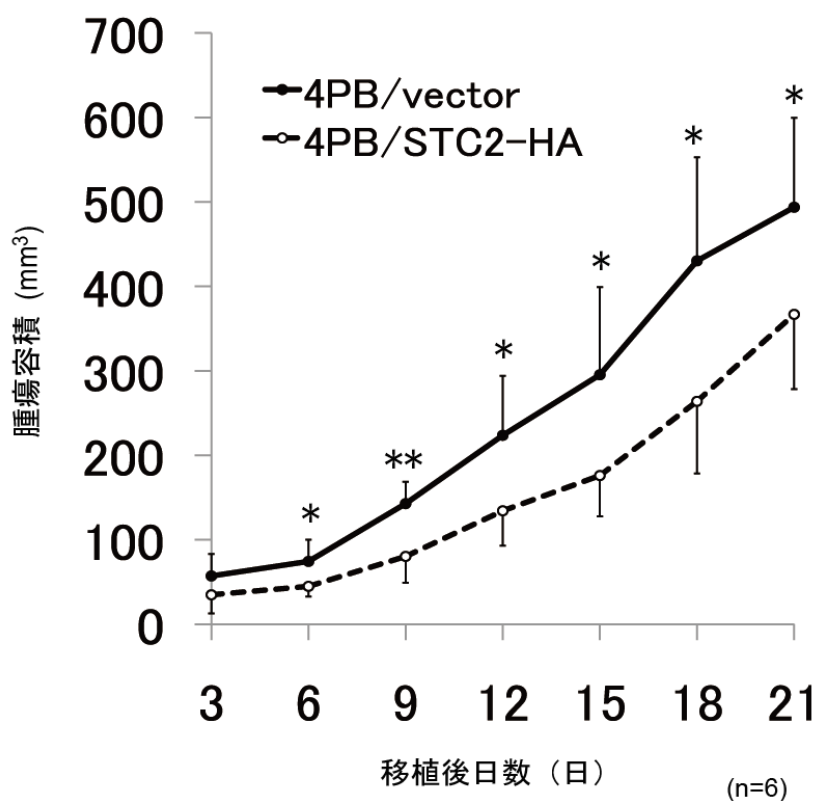


図 14 STC2 安定発現細胞株の皮下移植による造腫瘍能  
 4PB/STC2-HA ( $5.0 \times 10^6$  細胞 / 200  $\mu$ l PBS) および 4PB/vector をヌードマウスの背部に皮下注射した。3 日ごとに腫瘍径を測定し、腫瘍容積を算出した。(腫瘍容積) = (長径)  $\times$  (短径)  $\times$  1/2。(\*,  $P < 0.05$ . \*\*,  $P < 0.01$ )。

細胞増殖を抑制することが示され、細胞の造腫瘍能を抑制することが考えられる。

次に、がん細胞が血中を移動し、肺に定着する段階に STC2 が関与するかどうかを検討するため、4PB/STC2-HA および 4PB/vector をヌードマウスの尾静脈に注入し、1 時間後と 24 時間後に肺を摘出して肺に存在する細胞数をカウントした (図 15)。その結果、一視野当たりの細胞数の中央値が、1 時間後では 4PB/vector は 40 個、4PB/STC2-HA は 35 個、24 時間後では 4PB/vector は 7 個、4PB/STC2-HA は 6 個であり、肺に存在する細胞数に有意な差は認められなかった ( $p = 0.65$ 、 $p = 0.077$ )。したがって、多段階転移における血中移動や血管内定着への STC2 の関与は否定的であった。

以上の結果より、STC2 は多段階転移における後半のステップを抑制しており、そのメカニズムの 1 つとして転移先臓器における造腫瘍能の抑制が推測される。

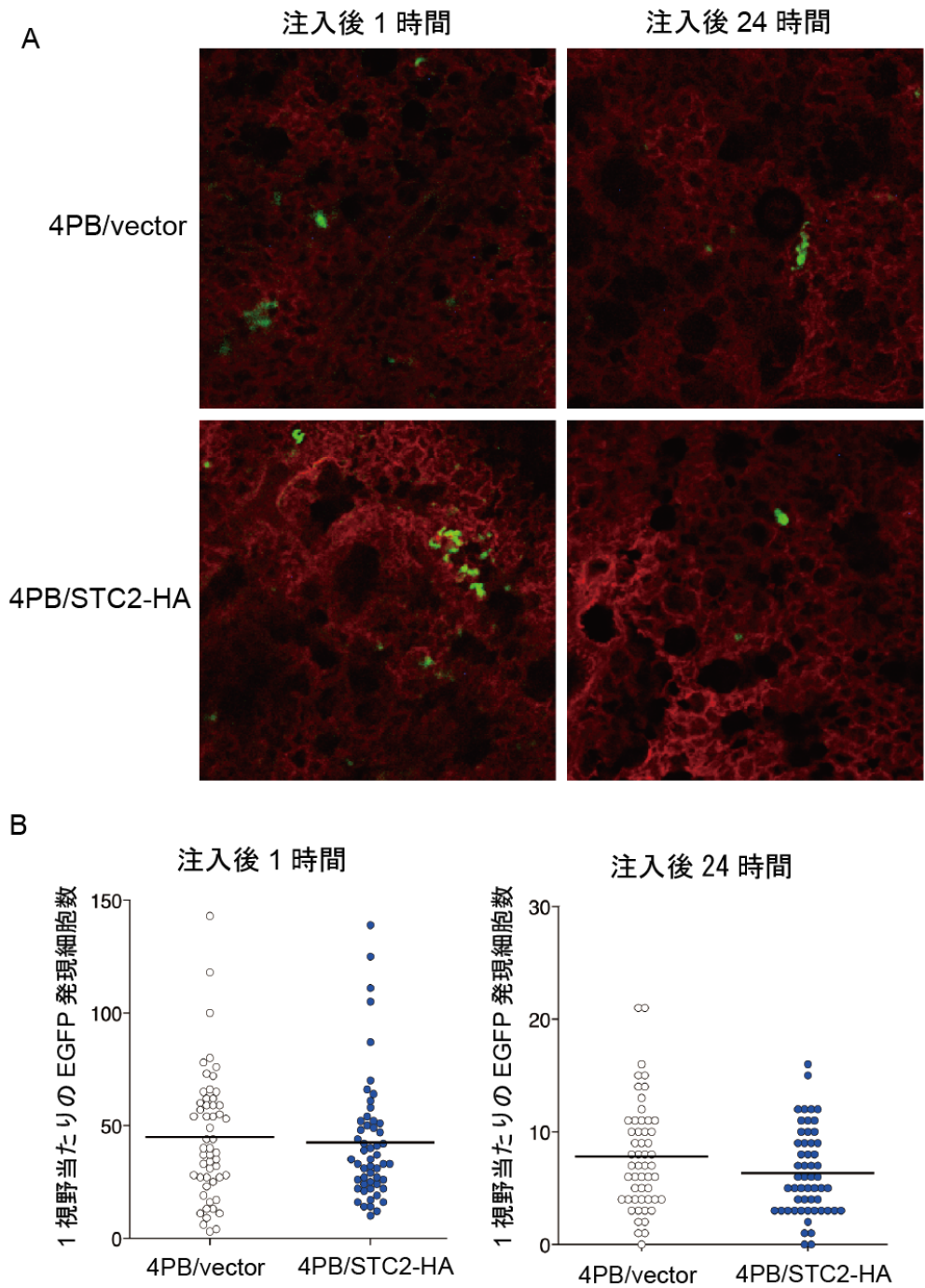


図 15 STC2 安定発現株の尾静脈注入後の肺における細胞数  
 4PB/STC2-HA ( $5.0 \times 10^5$  細胞 / 200  $\mu$ l PBS) および 4PB/vector をヌードマウスの尾静脈に注射した。1 時間後と 24 時間後に肺を摘出し、CD31 (血管内皮細胞 : 赤) を染色し、EGFP 陽性細胞を顕微鏡を用いてカウントした。

## 考察

本研究では、転移に関連する新規遺伝子の同定と機能解析を目的に、実験的肺転移系を用いてマウス肺腺がん細胞株から高転移性の亜株を作成し、それらの細胞株間の遺伝子発現パターンおよび転移能や細胞特性の比較を行った。前述のように、繰り返し転移系により高転移性の亜株を作成し、転移のメカニズムを解析するという手法は、これまでに Fidler のマウスメラノーマ細胞株 B16 に加え、ヒトメラノーマ細胞株 A375 やヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231、ヒト膀胱がん細胞株 KK-47 などの報告があるが<sup>3,24,25,27</sup>、本研究では独自に樹立したマウス肺腺がん細胞 IMSMP1 を用いたことで、肺腺がんにおける新規転移関連遺伝子の同定を試みた。ヌードマウスへの尾静脈注入により形成された肺転移巣から独立した 2 系列の細胞株を作成した点、4 回転移株および 8 回転移株を用い、マイクロアレイ解析により段階的な遺伝子変化を指標として遺伝子を抽出している点で、以前の方法に改善を加えた。実際に幹細胞マーカーである *Nes*、*Cd44*、*Cd133 (Prom1)*、ならびに既にごん転移を促進すると報告されている *Tnf* および *Cldn2* などの遺伝子が、転移促進候補遺伝子として抽出された遺伝子群に含まれており、この実験系が転移関連遺伝子群の探索に相応しいものであることを示している。また、それぞれのがん種により転移先臓器特異性があるこ

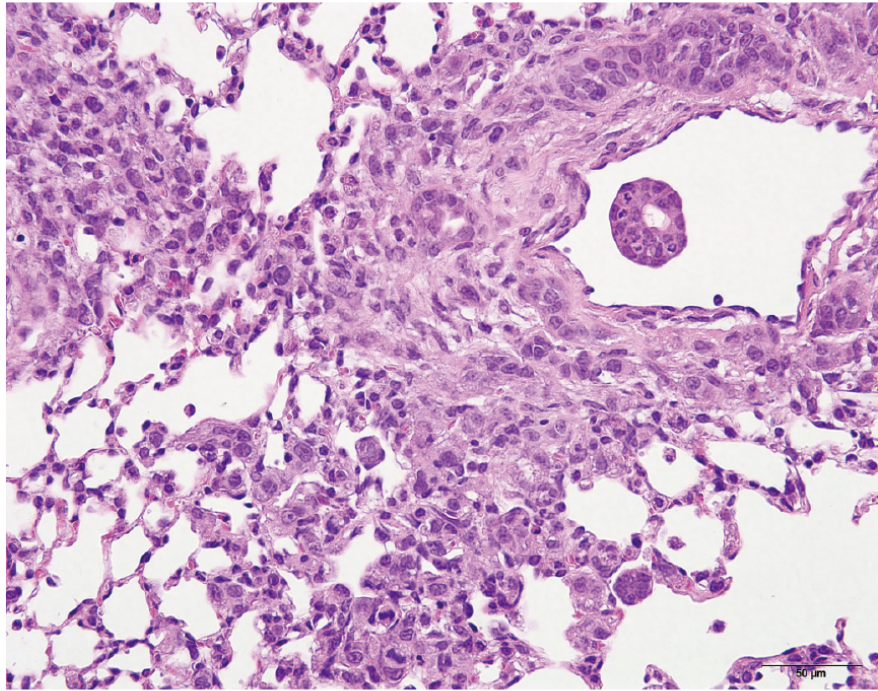
とが知られているが、肺腺がんの最も転移しやすい臓器は血行性転移による肺（対側肺あるいは同側他葉）である（表 1）。このことから、本実験系は、肺がんの血行性転移機構の解析に用いるのに有意義であると考えられる。しかしながら本実験系では、マウスの尾静脈に直接がん細胞を注入している点において自然転移とは異なり、多段階転移における血中移動以降を反映していることに注意が必要である。また、宿主のマウスとして T 細胞機能が欠如した BALB/cAJcl-nu/nu を用いているため、がん細胞の血中移動に対する免疫応答も正常の状態とは異なる。さらに、肺の転移巣から培養に戻した細胞株を用いて遺伝子発現解析を行っているため、線維芽細胞や正常肺組織の除外が可能であるという利点のある一方、細胞の遺伝子発現が生体内とは異なることが予想される。

マウス肺腺がん細胞株 IMSMP1 から実験的肺転移系により作成した繰り返し転移株は、親株と比較して肺表面への転移巣形成数が有意に上昇した（図 4）。また、マウスへの 8PA の皮下移植により形成された腫瘍は、IMSMP1 由来の腫瘍と比較して核異型度が増し、腺管構造を失った低分化型の病理像を示した（図 5）。これらの結果から、繰り返し転移株は親株と比較して悪性度が増し、転移能が亢進していることが示唆された。高転移細胞株が得られた過程の可能性と

しては以下の2つが考えられる。第一は、IMSMP1が肺転移を繰り返すことにより、集団としての細胞の転移能が増強されたという可能性である。第二は、本来不均一な細胞集団であるIMSMP1細胞株の中に転移能の異なる細胞が混在しており、その中でより転移能の高い細胞のみが肺に転移巣を形成したという可能性、つまり特定の細胞が選択を受けて高転移細胞株が得られたという可能性である。しかし、親株IMSMP1と8PA細胞の実験的肺転移により形成された肺の転移巣の比較を行ったところ、これらの腫瘍はいずれも未分化な病理像を示し、組織学的に大きな差異は認められなかった(図16)。この結果は、繰り返し実験的肺転移によって細胞の悪性度が変化しなかったのではなく、IMSMP1細胞株の中に高転移性で組織学的悪性度の高い腫瘍を形成し得る細胞が存在しており、一回目の実験的肺転移で既に組織学的悪性度の高い細胞が選択され、二回目以後の尾静脈注入による転移性の変化については形態的には区別がつかなかったと解釈できる。また、繰り返し転移株作成の過程では、IMSMP1( $1.0 \times 10^6$ 細胞)をマウスの尾静脈に移植し、マウスが衰弱し解剖するまでに27日要したのに対し、4回転移株を樹立する際には14日でマウスが衰弱した。このことから繰り返し実験的肺転移により、細胞株の性質が段階的に変化したことが考えられる。



IMSMP1



8PA

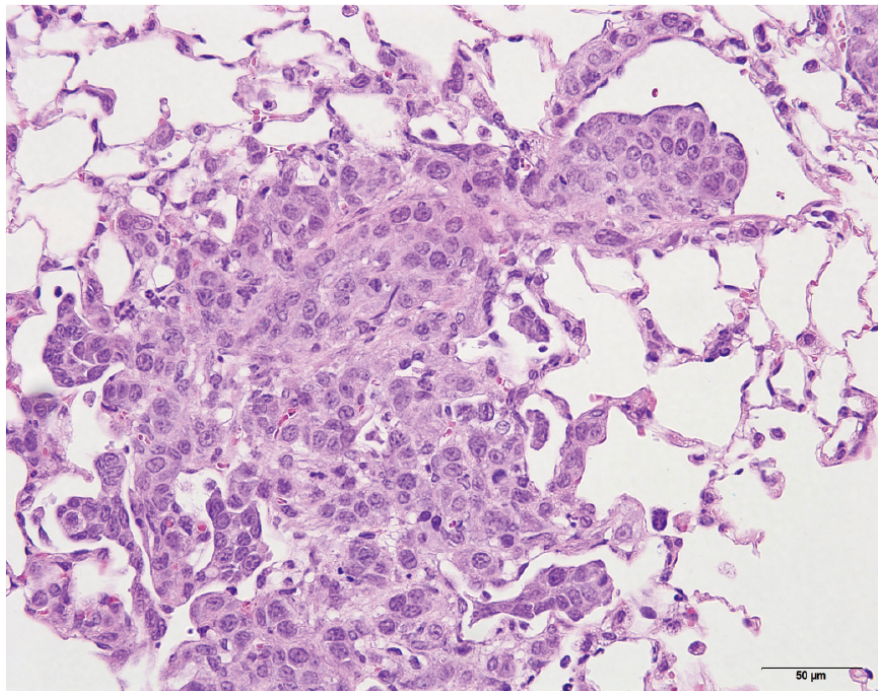


図 16 IMSMP1 細胞および繰り返し転移亜株の病理  
IMSMP1 細胞および 8PA 細胞のヌードマウスへの尾静脈移植により肺に形成された  
転移巣の病理像。IMSMP1 と 8PA は共に核異型度の高い未分化腺がんを形成した。

さらに、繰り返し転移株の転移能亢進にどのような細胞特性の変化が関わっているか調べたところ、軟寒天培地中におけるコロニー形成能の増強が見られた (図 6A)。軟寒天コロニーフォーメーションアッセイは、細胞の足場非依存かつ単細胞状態での生存能および増殖能を反映していると考えられる。したがって、繰り返し転移株では、血中移動における生存能や、微小環境が整っていない転移先臓器での生存能および増殖能が、親株と比較して高いことが推察された。一方で、創傷治癒アッセイでは、親株と繰り返し転移株との間に細胞遊走能の差は認められなかった (図 6B)。今回の実験的肺転移系は転移における血中移動以降の過程を検討しているため、この創傷治癒アッセイは、血管外遊出から臓器内部への遊走能を検討していることに相当すると考えられる。繰り返し転移株の転移能亢進に関与する細胞特性を明らかにするためには、血管内皮細胞への接着能、血管外遊出能、血管形成能など他の要因についても検討する必要がある。

培養中の IMSMP1、4PA、4PB、8PA、8PB より抽出した mRNA のマイクロアレイ解析では、転移促進候補遺伝子として 228 遺伝子が抽出され、その中には既知の転移促進遺伝子 *Tnf* や *Cldn2* などに加え、幹細胞マーカーをコードする *Nes*、*Prom1* (*Cd133*)、*Cd44* が含まれていた (表 3)。*Prom1* (*Cd133*) および *Cd44*

は肺がんを含むさまざまながん種において、幹細胞性に関与し悪性度と相関しているということが報告されている<sup>40,41</sup>。*Nes*は主に神経幹細胞に発現しており、神経膠腫や髄芽腫、黒色腫、骨肉腫などのがん幹細胞マーカーとして用いられている。また、*Nes*は非小細胞肺がんでは発現が低い傾向があるのに対し、神経内分泌細胞がんである小細胞肺がんでは比較的高発現が認められるという報告もあり<sup>42</sup>、肺腺がんにおける*Nes*の機能解析も転移メカニズム解明への今後の課題と考えられる。これらの遺伝子群については、今後、ヒト肺がんの原発巣、転移巣における発現の変化を免疫組織染色などにより明らかにしていく予定である。

以下、転移抑制候補遺伝子として得られた **STC2** について述べる。**STC2** は 302 アミノ酸から成り N 端側にシグナルペプチドをもち<sup>43</sup>、翻訳後小胞体内へ取り込まれると糖鎖付加修飾を受けて細胞外へ分泌される (図 12A)<sup>44</sup>。また、C 端側には金属との結合を担うヒスチジンクラスターを有する<sup>43</sup>。**STC2** トランスジェニックマウスは筋および骨が萎縮する表現型を示すことから、**STC2** は筋形成および骨形成を抑制する機能があると考えられている<sup>45,46</sup>。

**STC2** は多くのがんで高発現が認められており、肝がん、食道扁平上皮がん、胃がん、腎がんにおいては **STC2** の発現量と患者の生存率とが逆相関するという

報告もあり、一般的にはがんおよびその悪性を促す因子として考えられている<sup>47-50</sup>。一方で、乳がんにおける STC2 の高発現は良好な予後と関連しているという報告<sup>51</sup>もあり、がん種により機能が異なることも考えられる。肺がんでの STC2 の高発現や予後との関連は未だ報告されていない。これまでの報告により、STC2 は小胞体ストレスや低酸素ストレスにより、転写因子である PERK-ATF4 や HIF-1 により発現誘導され、アポトーシスを抑制することが報告されている<sup>52,53</sup>。細胞内カルシウム濃度が上昇するとアポトーシスが誘導されることが知られているが、STC2 は小胞体膜上に局在する STIM1 と結合することにより、容量依存的なカルシウム流入 (SOCE; Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry) を抑制し、アポトーシスを抑制している<sup>39,54</sup>。また、STC2 を安定発現させた卵巣がん細胞株は自身の浸潤能のみでなく、共培養した血管内皮細胞株 HUVEC の浸潤能を誘導することが示され、血管新生への寄与が示唆されている<sup>55</sup>。STC2 のこれらの機能はがんの悪性の促進に関与していると考えられるが、乳がんおよび神経芽細胞腫において細胞増殖を抑制するという報告もある<sup>56,57</sup>。特に、乳がん細胞株では、エストロゲンもしくはレチノイン酸刺激により STC2 の発現上昇が見られること、また STC2 の安定発現株では血清飢餓状態での生存率や細胞遊走能が低下することが示されている。以上のことから、STC2 は細胞種および刺激依存的に

機能が異なるということが示唆される。

本研究では、STC2は肺腺がんにおいて、実験的肺転移能、軟寒天培地中でのコロニー形成能およびマウスへの皮下移植による腫瘍増殖能を抑制することが示された（図 11B and D、図 14）。このことから、肺腺がんにおいて STC2 は足場非依存的増殖やアポトーシス抑制、造腫瘍性抑制に働くと考えられる。したがって、STC2 は多段階転移における転移巣形成の段階での生存および増殖の抑制に働くことが示唆される。また、STC2 が分泌タンパク質としてこれらの機能を示しているのであれば、STC2 ペプチドを注射することなどにより外因的に作用させることにより転移を抑えることができる可能性がある。もしくは、STC2 が細胞内で機能しているのであれば、エストロゲンやレチノイン酸刺激などにより発現を上昇させることで転移を抑制することができる可能性がある。

## 結論

本研究において、我々の研究室で独自に樹立したマウス肺腺がん細胞株 IMSMP1 を用いて *in vivo* セレクションを行い、高転移性細胞株を樹立することができた。またこの高転移性株とその親株の遺伝子発現プロファイル解析により、新規転移促進候補遺伝子として 11 遺伝子、新規転移抑制候補遺伝子として 11 遺伝子を同定した。また、それらの遺伝子の中で、*PODNL1* が転移促進能、*STC2* が転移抑制性能を持つことを示した。今後、これらの分子の機能解析や臨床検体における分子発現の意義を明らかにすることにより、がん転移の新規バイオマーカーもしくは治療薬の開発に貢献することが期待される。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導御鞭撻を賜りました指導教員である東京大学大学院医学系研究科人癌病因遺伝子分野の村上善則教授に深謝申し上げます。また、伊東剛助教には多大なご支援と貴重なご助言をいただきましたことを心よりお礼申し上げます。本研究の遂行にお力添えいただきました松原大祐講師、坂本毅治助教、櫻井美佳助教、永田政義博士、川合剛人博士、増田智子氏、市原博美氏、顔暁珮氏、田淵拓也氏に感謝申し上げます。遺伝子安定発現細胞株を作成するにあたり、レトロウイルス発現ベクターおよびそのパッケージング細胞をご提供いただきました北村俊雄教授に感謝申し上げます。そして、日々の研究において様々な面で御指導御協力いただいた、東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の皆様には感謝いたします。

## 引用文献

- 1 厚生労働省. 人口動態統計年報 主要統計表. (2010).
- 2 がん研究振興財団, 公. がんの統計'13. (2013).
- 3 Fidler, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* **242**, 148-149 (1973).
- 4 Poste, G. & Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283**, 139-146 (1980).
- 5 Luzzi, K. J. *et al.* Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* **153**, 865-873, doi:10.1016/s0002-9440(10)65628-3 (1998).
- 6 Sugino, T. *et al.* An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model. *Am J Pathol* **160**, 1973-1980, doi:10.1016/s0002-9440(10)61147-9 (2002).
- 7 Setsu, N., Yoshida, A., Takahashi, F., Chuman, H. & Kushima, R. Histological analysis suggests an invasion-independent metastatic mechanism in alveolar soft part sarcoma. *Hum Pathol* **45**, 137-142, doi:10.1016/j.humpath.2013.07.045



- (2014).
- 8 Miyazono, K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 314-323 (2009).
- 9 Hugo, H. *et al.* Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* **213**, 374-383, doi:10.1002/jcp.21223 (2007).
- 10 Clarke, M. F. *et al.* in *Cancer Res* Vol. 66 9339-9344 (2006).
- 11 Vermeulen, L. *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* **12**, 468-476, doi:10.1038/ncb2048 (2010).
- 12 Janssen, A. & Medema, R. H. Mitosis as an anti-cancer target. *Oncogene* **30**, 2799-2809, doi:10.1038/onc.2011.30 (2011).
- 13 Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715, doi:10.1016/j.cell.2008.03.027 (2008).
- 14 Santisteban, M. *et al.* Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in

- vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res* **69**, 2887-2895,  
doi:10.1158/0008-5472.can-08-3343 (2009).
- 15 Tohru Harada, M. K., Masuo Ujita, Yuji Saito, Makoto Odaka, Shuji Sato,  
Tadashi Akiba. Analysis of metastasis in primary lung cancer (second report).  
*Tokyo Jikeikai Medical Journal* **121**, 223-240 (2006).
- 16 江川新一ら. 膵癌登録報告 2007. 105-123 (膵臓, 2008).
- 17 Paget, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER  
OF THE BREAST. *The Lancet* **133**, 571-573,  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0) (1889).
- 18 Hattori, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1  
stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and  
hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **193**, 1005-1014 (2001).
- 19 Hattori, K. *et al.* Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by  
recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat*  
*Med* **8**, 841-849, doi:10.1038/nm740 (2002).
- 20 Bautch, V. L. in *Nature* Vol. 468 770-771 (2010).
- 21 Wang, R. *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium.

- Nature* **468**, 829-833, doi:10.1038/nature09624 (2010).
- 22 Ricci-Vitiani, L. *et al.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**, 824-828, doi:10.1038/nature09557 (2010).
- 23 Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338-345, doi:10.1038/nature12625 (2013).
- 24 Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S. & Hynes, R. O. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**, 532-535, doi:10.1038/35020106 (2000).
- 25 Minn, A. J. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518-524, doi:10.1038/nature03799 (2005).
- 26 Morales, M. *et al.* RARRES3 suppresses breast cancer lung metastasis by regulating adhesion and differentiation. *EMBO Mol Med* **6**, 865-881, doi:10.15252/emmm.201303675 (2014).
- 27 Sugiyama, N. *et al.* In vivo selection of high-metastatic subline of bladder cancer cell and its characterization. *Oncol Res* **20**, 289-295 (2013).

- 28 Sutoh Yoneyama, M. *et al.* Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis. *Eur J Cell Biol* **93**, 157-169, doi:10.1016/j.ejcb.2014.03.002 (2014).
- 29 永田政義. 腎がんおよび肺癌における *CADM* ファミリー 細胞接着分子群の意義に関する研究 (東京大学大学院 医学系研究科, 2009).
- 30 Murakami, Y. Functional cloning of a tumor suppressor gene, TSLC1, in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* **21**, 6936-6948, doi:10.1038/sj.onc.1205825 (2002).
- 31 Uchino, K. *et al.* Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* **98**, 1002-1007, doi:10.1002/cncr.11599 (2003).
- 32 Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**, 1063-1066, doi:10.1038/sj.gt.3301206 (2000).
- 33 Kitamura, T. *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* **31**, 1007-1014 (2003).
- 34 Wagner, G. F., Hampong, M., Park, C. M. & Copp, D. H. Purification,

- characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius. *Gen Comp Endocrinol* **63**, 481-491 (1986).
- 35 Ishibashi, K. *et al.* Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2). *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 252-258, doi:10.1006/bbrc.1998.9300 (1998).
- 36 Chang, A. C. & Reddel, R. R. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2. *Mol Cell Endocrinol* **141**, 95-99 (1998).
- 37 DiMattia, G. E., Varghese, R. & Wagner, G. F. Molecular cloning and characterization of stanniocalcin-related protein. *Mol Cell Endocrinol* **146**, 137-140 (1998).
- 38 Shin, J. & Sohn, Y. C. cDNA cloning of Japanese flounder stanniocalcin 2 and its mRNA expression in a variety of tissues. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **153**, 24-29, doi:10.1016/j.cbpa.2008.11.014 (2009).
- 39 Zeiger, W. *et al.* Stanniocalcin 2 is a negative modulator of store-operated calcium entry. *Mol Cell Biol* **31**, 3710-3722, doi:10.1128/mcb.05140-11 (2011).
- 40 Eramo, A. *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* **15**, 504-514, doi:10.1038/sj.cdd.4402283

(2008).

- 41 Leung, E. L. *et al.* Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One* **5**, e14062, doi:10.1371/journal.pone.0014062 (2010).
- 42 Takakuwa, O. *et al.* Involvement of intermediate filament nestin in cell growth of small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **81**, 174-179, doi:10.1016/j.lungcan.2013.04.022 (2013).
- 43 Luo, C. W., Pisarska, M. D. & Hsueh, A. J. Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary. *Endocrinology* **146**, 469-476, doi:10.1210/en.2004-1197 (2005).
- 44 Jellinek, D. A. *et al.* Stanniocalcin 1 and 2 are secreted as phosphoproteins from human fibrosarcoma cells. *Biochem J* **350 Pt 2**, 453-461 (2000).
- 45 Gagliardi, A. D., Kuo, E. Y., Raulic, S., Wagner, G. F. & DiMattia, G. E. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E92-105, doi:10.1152/ajpendo.00268.2004 (2005).

- 46 Johnston, J. *et al.* Human stanniocalcin-1 or -2 expressed in mice reduces bone size and severely inhibits cranial intramembranous bone growth. *Transgenic Res* **19**, 1017-1039, doi:10.1007/s11248-010-9376-7 (2010).
- 47 Ieta, K. *et al.* Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* **125**, 926-931, doi:10.1002/ijc.24453 (2009).
- 48 Kita, Y. *et al.* STC2: a predictive marker for lymph node metastasis in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* **18**, 261-272, doi:10.1245/s10434-010-1271-1 (2011).
- 49 Yokobori, T. *et al.* Clinical significance of stanniocalcin 2 as a prognostic marker in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **17**, 2601-2607, doi:10.1245/s10434-010-1086-0 (2010).
- 50 Meyer, H. A. *et al.* Identification of stanniocalcin 2 as prognostic marker in renal cell carcinoma. *Eur Urol* **55**, 669-678, doi:10.1016/j.eururo.2008.04.001 (2009).
- 51 Yamamura, J. *et al.* mRNA expression level of estrogen-inducible gene, alpha 1-antichymotrypsin, is a predictor of early tumor recurrence in patients with

- invasive breast cancers. *Cancer Sci* **95**, 887-892 (2004).
- 52 Ito, D. *et al.* Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties. *Mol Cell Biol* **24**, 9456-9469, doi:10.1128/mcb.24.21.9456-9469.2004 (2004).
- 53 Law, A. Y. *et al.* Epigenetic and HIF-1 regulation of stanniocalcin-2 expression in human cancer cells. *Exp Cell Res* **314**, 1823-1830, doi:10.1016/j.yexcr.2008.03.001 (2008).
- 54 Cahalan, M. D. STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol* **11**, 669-677, doi:10.1038/ncb0609-669 (2009).
- 55 Law, A. Y. & Wong, C. K. Stanniocalcin-2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasiveness in hypoxic human ovarian cancer cells. *Exp Cell Res* **316**, 3425-3434, doi:10.1016/j.yexcr.2010.06.026 (2010).
- 56 Raulic, S., Ramos-Valdes, Y. & DiMattia, G. E. Stanniocalcin 2 expression is regulated by hormone signalling and negatively affects breast cancer cell viability in vitro. *J Endocrinol* **197**, 517-529, doi:10.1677/joe-08-0043 (2008).
- 57 Volland, S., Kugler, W., Schweigerer, L., Wilting, J. & Becker, J. Stanniocalcin 2 promotes invasion and is associated with metastatic stages in neuroblastoma.



*Int J Cancer* **125**, 2049-2057, doi:10.1002/ijc.24564 (2009).