日消外会誌　29（4）：878～883，1996年

特集5

大腸癌肝転移の機序と対策―遺伝子治療をめざして―

横浜市立大学第2外科，Hitachi Chemical Research Center，Irvine CA[1]，日立化成工業株式会社[2]

石川　孝　市川　靖史　籾山　信義　池　秀之
山口　茂樹　舛井　秀宣　南湖　正男　山岡　博之
三橋　将人[1]　秋田谷龍男[2]　嶋田　紘

マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-2,7,9のmRNA発現を，大腸癌手術標本を用いて観察した．その結果，MMP-7（マトリライシン）mRNAは，癌組織にのみ特異的に強く発現し，その発現量は大腸癌の進展度に伴い増加し，肝転移巣においても非常に強く発現していた．そこで，マトリライシンmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計，合成し，大腸癌の浸潤，増殖に及ぼす影響を検討した．アンチセンスオリゴはマトリライシン産生直腸癌細胞株CaR-1のマトリライシンmRNA発現を特異的に抑え，濃度依存性にその浸潤および増殖能を抑制した．以上の臨床および基礎データから，マトリライシンは大腸癌の浸潤，転移に関わるものと考えられ，現在，マトリライシンmRNAのアンチセンスオリゴを肝動注投与することにより，微小肝転移の増殖抑制および肝内への浸潤抑制の可能性について検討している．

Key words： matrilysin，antisense oligonucleotide，colorectal cancer

緒　言

分子生物学的手法により癌転移の機序が解明され，転移に関わる様々な因子が明らかになってきた．これらの転移関連因子は，診断においては，従来のTNM分類に遺伝子解析による悪性度を加えたTNMG（gene）として利用されつつあり，治療においては，転移抑制剤の対象として注目されている．

今回，細胞外マトリックスの分解能を有するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の中で最も大腸癌の浸潤，転移に関与すると思われるMMP-2,7,9[1)2)]の発現を，大腸癌手術標本を用いて観察した．さらに，癌細胞に高発現するMMP-7（マトリライシン）に注目し，マトリライシンmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴ）を合成し，大腸癌の浸潤，増殖に及ぼす影響について基礎的な検討を行った．

材料および方法

1．大腸癌手術標本におけるMMP-2,7,9mRNA発現

教室における大腸癌28例（肝転移合併8例）の手術標本を用い，MMP-2,7,9mRNAの発現を観察した．手術標本から腫瘍および非腫瘍部約0.5cm³を採取し，－80°Cに保存した．凍結標本から，フェノール/クロロホルム抽出，エタノール沈殿により核酸を採取し，オリゴ-d（T）を固定化したプラスチックプレート“Gene-Plate®”[3)]（Hitachi Chemical Co.）を用いてmRNAを採取，RT-PCRを行った．MMP-2,7,9，およびβ-actinに対するPCRプライマーは，オリゴ設計用コンピュータソフトウエア，HYBsimulator™[4)]（AGCT, Inc, USA）で作成した．おのおのMMP-2；sense：5′-ACCCATTTACACCTACACCAAG-3′，antisense：5′-GTATACCGCATCAATCTTTTCCG-3′，MMP-7；sense：5′-TCTTTGGCCTACCTATAACTGG-3′，antisense：5′CTAGACTGCTACCATCCGTC-3′，MMP-9；sense：5′-CACCTTCACTCGCGTGTAC-3′，antisense：5′-CATCTGCGTTTCCAAACCGAG-3′，β-actin；sense：5′-CTTCGCGGGCGACGATGC-3′，antisense：5′-CGTACATGGCTGGGGTGTTG-3′，PCR産物は1.2%アガロースゲル電気泳動を行い，エチジウムブロマイド染色し観察した．

2．アンチセンスオリゴを用いた基礎実験

＊第46回日消外会総会シンポ1・消化器癌転移の機序と対策

＜1995年11月15日受理＞別刷請求先：石川　孝
〒236　横浜市金沢区福浦3－9　横浜市立大学医学部第2外科

細胞株；マトリライシン産生性のヒト直腸癌培養細胞株CaR-1を用い，培養は10%の牛胎仔血清を含むDMEM培地で，5%CO_2存在下，37℃で行った．

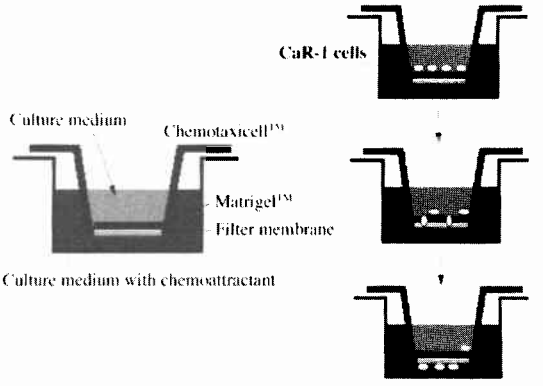
アンチセンスオリゴ（AS）の設計と合成；前述のHYBsimulator™を用いて，マトリライシンmRNA上のAUG開始コドンを含む領域を認識する15塩基のASを設計した．またコントロールオリゴとしては，ASの塩基配列内でアデニンとチミン，グアニンとシトシンの任意の入れ替えを行った．“シャッフル”オリゴ（CL）を設計し，ホスホロサイオエイトオリゴとして合成した．ASのマトリライシンmRNAの発現抑制効果は，RT-PCRで確認した．0.5%血清添加の培養液中で1×10^5cells/mlの濃度に調製したCaR-1に10μMのAS，CLを投与し，24時間37℃でインキュベートした後，RNAを抽出し，RT-PCRを行った．PCRプライマーは，HYBsimulator™を用いて，ASの標的領域を挟む位置に設計した．

細胞増殖抑制試験；無血清培養中で1×10^5cells/mlの濃度に調製したCaR-1に，それぞれ2,5,10μMのAS，CLを投与し，24時間37℃でインキュベートした後，細胞を維持するため，血清濃度を10%として，その後72時間まで細胞増殖を観察した．細胞数のカウントは，トリパンブルー染色後，顕微鏡下で行った．

浸潤抑制試験；8μmのpore sizeをもつケモタキセル（クラボウ）のフィルター上に，10μgのマトリジェル（BecktonDickinson）をコーティングして風乾後，24穴のculture plate（Costar）にセットした．1×10^5 cells/mlの濃度に調製したCaR-1の細胞浮遊液をそれぞれ200μlずつケモタキセルのwell（上層）内にseedし，24穴のculture plate側（下層）には，NIH3T3 cellのconditioning mediumを各600μl加えた．37℃のインキュベーター内で48時間培養後，上層に存在する浸潤していない細胞を綿棒で取り除いた．ケモタキセルからフィルターをはずし，メタノール固定後，下層へ浸潤した細胞をギムザ染色し，顕微鏡下で細胞数をカウントした（**Fig. 1**）．

Fig. 1 Chemoinvasion assay

CaR-1 cells（1×10^5）were seeded onto Matrigel-coated filter containing 8μm size pores in Chemotaxicell. Cells, which had completely invaded the Matrigel-coated filters, were collected, stained, and visually counted. The percentage of invading cells was calculated by dividing the number of cells which had invaded the filter by the number of cells in the upper well.



結　果

1．大腸癌手術標本におけるMMR-2,7,9mRNA発現

マトリライシンmRNAを示す420bpのPCR産物は，癌組織でのみ認められ，非癌部正常大腸粘膜では全く観察されなかった．さらに，マトリライシンmRNAの発現を，Dukes'分類で分けて比較したところ，それぞれ下段のβ-actin mRNAがすべての標本で，ほぼ同程度の発現を示し，マトリライシンmRNAは，大腸癌の進行度が進むに従って高発現していた（**Fig. 2**）．さらに，肝転移巣においてもマトリライシンmRNAは，大腸癌原発巣と同等かそれ以上に強く発現していた（**Fig. 3**）．それに対して，MMP-9mRNAは，癌部組織に強く発現する傾向があるが，一部非腫瘍部正常組織にも認められ，MMP-2に関しては，非腫瘍部でも癌部と同様に発現していた（**Fig. 4**）．

2．アンチセンスオリゴを用いた基礎実験

1）マトリライシンmRNA発現抑制

AS処理によってマトリライシンmRNAの発現は有意に抑制された．一方，標的mRNAに結合しないと考えられるCL処理では，マトリライシンmRNAの発現量に変化は認められなかった．また，対照として観察したβ-actin mRNAの発現に対しては，AS，CLともに影響を与えなかった（**Fig. 5**）．

2）細胞増殖抑制

AS処理群では血清添加後72時間まで細胞増殖は有意に抑制され，さらにその効果は濃度依存的であった．一方，CL処理群では，細胞増殖の抑制効果は認められなかった（**Fig. 6**）．

3）マトリジェル浸潤抑制

AS投与によりCaR-1マトリジェル浸潤能は，対照群の約50%に抑制された．一方，CLの投与は，CaR-1

Fig. 2 Expression of matrilysin mRNA in colorectal cancers.
mRNA was isolated from biopsy specimen of normal colon mucosa (N), or cancer (T) from the same patients, utilizing GenePlate® technique (described in "Methods") and analyzed matrilysin mRNA expression.
The lane at the right-side end demonstrates the 100bp DNA laddder used as a ethidium bromide-stainable marker for agarose gel electrophoresis. The three bright bands indicate 100, 600, and 1,500bp respectively.
Matrilysin mRNA expression was detected in all cancers examined, but not in normal mucosa surrounding cancers. The level of expression increased with the progress of Dukes' stages from A to C.

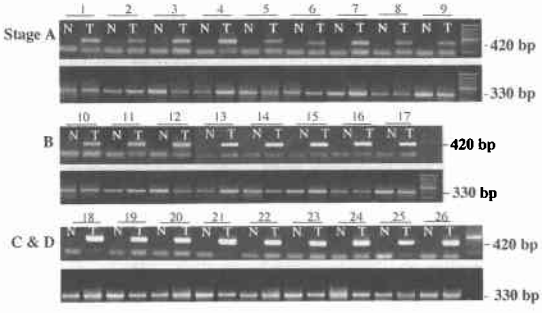
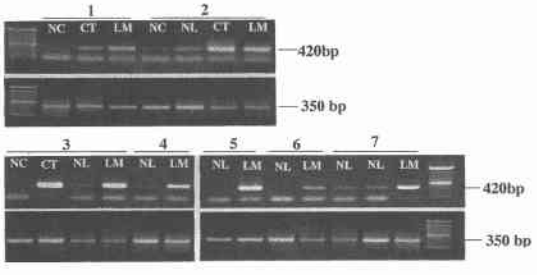


Fig. 3 Expression of matrilysin mRNA in colorectal cancer cases with liver metastases.
NC, CT, NL or LM represents normal colorectal mucosa, cancer, normal liver or liver metastasis respectively.
Liver metastatic tumors expressed the high level of matrilysin mRNA, which seemed to be higher than primary tumors, althougth this system was not quantitative absolutely.



の浸潤能に影響を与えなかった（**Fig. 7, 8**）.

考　察

癌細胞が周囲組織に浸潤していくためには，バリアーとなる基底膜や結合組織を局部的に破壊する必要があり，このような細胞外マトリックス分解活性をもつプロテアーゼは，癌の転移能を決定する重要な因子である．その中で，マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP) のひとつであるマトリライシンは広範な基質特異性を有し，組織基底膜の主要構成成分であるIV型コラーゲンに対する強い分解能を示すとともに，フィ

Fig. 4 Expression of MMP-2,7,9 mRNA in colorectal cancers.
The representative 4 out of 28 colorectal cancer cases examined were shown.
Matrilysin mRNA expression was expressed in cancers, but not in normal mucosa, while MMP-2 mRNA expression was found in normal tissue as well as cancers. MMP-9 mRNA was detected in most cancers and some normal mucosa.

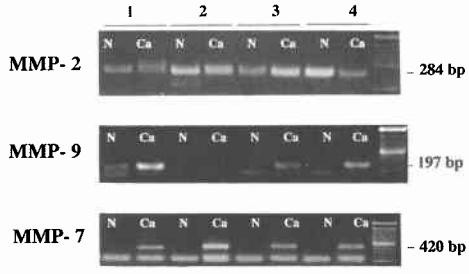
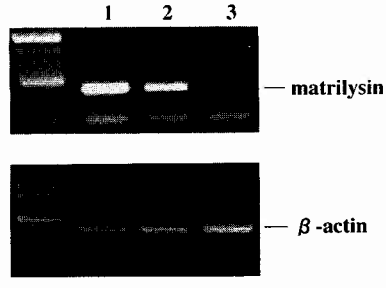


Fig. 5 PCR products amplified with matrilysin primers 24h after treatment.
Lane 1,2, and 3 represent no treatment, control and matrilysin antisense oligonucleotides treatment. Matrilysin mRNA expression has gone at lane 3 while control oligonucleotides did not affect it's expression, indicating that antisense we designed specifically inhibited translation of matrilysin mRNA.



lane 1; no-oligo
2; CL -1 10μM
3; AS -1 10μM

Fig.6 ^{3}H-thymidine uptake of CaR-1 after oligonucleotide treatment.
Uptake was markedly reduced by matrilysin antisense oligonucleotide treatment dose-dependently, while control oligonucleotide did not affect the cell proliferation.

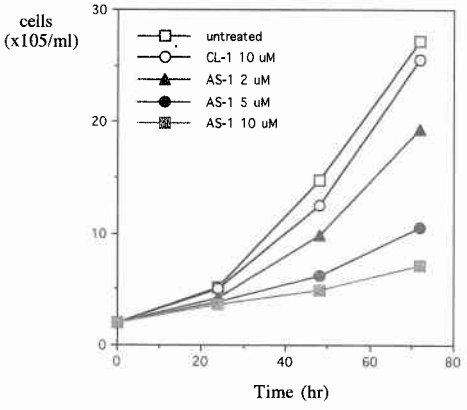
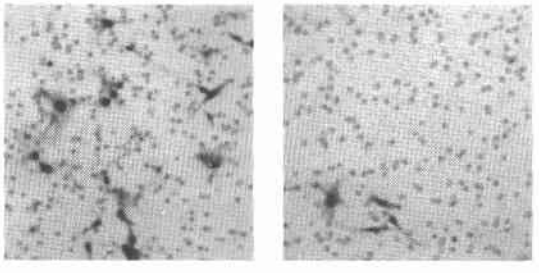


Fig. 7 CaR-1 cells invaded Matrigel-coated filter. Gimusa-stained invading cells were shown. It is clear that matrilysin antisense oligonucletide-treated cells became less invasive.

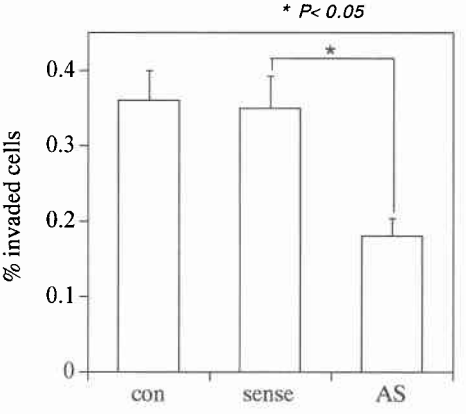


Control oligo **Antisense oilgo**

ブロネクチンやラミニンなどの糖蛋白をも分解することから癌の浸潤，転移に重要な役割を演じていると考えられる．大腸癌手術標本を用いた今回の結果で，マトリライシン mRNA は，癌部で強く発現していた．さらにその発現量が大腸癌の進展に伴い増加すること，大腸癌肝転移巣においても非常に高いマトリライシン発現が観察されることから，マトリライシンは大腸癌の肝転移に関わると考えられた．同様の結果が，森ら[2]によりノーザン法を用いた実験で報告されている．

マトリライシン同様，IV型コラーゲン分解能を有する MMP-2,9，すなわちゼラチナーゼ A，B も癌の浸潤，転移に関わる酸素として注目されているが，マトリライシンが大腸癌において，癌細胞に特異的な発現を示すのに対し，ゼラチナーゼ A，B は癌周囲の非癌部組織にも発現が認められた．このことから，癌の悪性度診断や転移に対する治療には，癌特異的に発現するマトリライシンが，より適当なターゲットであると考えられる．

Fig. 8 Matrigel invasion assay of CaR-1 after oligonucleotide treatment.
Lane 1,2 and 3 represent no treaoment, control and matrilysin antisense oligonucleotides treatment. The percentage of invading cells was significantly reduced by matrilysin antisense oligonucleotide treatment.



アンチセンスオリゴによる遺伝子発現抑制は，標的遺伝子の特異的な配列に基づき，それに相補的なオリゴヌクレオミドを設計することにより，任意の遺伝子を対象とすることができ，非常に簡便である．今回，マトリライシンの大腸癌細胞の転移，浸潤能におよぼす影響を観察するために，マトリライシン mRNA に対するアンチセンスオリゴを設計した．

アンチセンスオリゴを用いた遺伝子発現抑制では，特異的な塩基配列の設計が重要であるが，その特異性は，実際に合成し，使用してみなければわからないのが現状であった．しかし，HYBsimulator™を用いた解析では，コンピューター上でハイブリダイゼーションのシュミレーションを行うことにより，他の遺伝子のクロスハイブリダイゼーションや標的遺伝子のとる2次構造の可能性を定量化し，最適な塩基配列を選択することが可能である．私たちはこれまでに，癌遺伝子 c-jun, c-fos, c-myc に対する100個以上のアンチセンスオリゴを設計して，その活性をスクリーニングし，HYBsimulator™を用いたオリゴ設計の有用性を示し

てきた[5]．

今回，設計したマトリライシン mRNA に対するアンチセンスオリゴは，CaR-1細胞におけるマトリライシン mRNA の発現を抑制し，さらにその細胞増殖および浸潤能を有意に抑制した．アンチセンスオリゴによる遺伝子発現抑制の作用機序は未だ不明な点があるが，アンチセンスオリゴと同じ長さ，同じ GC 含有率を持つシャッフルオリゴではマトリライシン mRNA の発現を抑制せず，さらにその細胞増殖および浸潤能にも影響しなかったことから，アンチセンスオリゴの活性は塩基配列の相補性に従った特異的な作用であるといえる．

マトリライシンと大腸癌の浸潤能については，Matrisian ら[6]が逆の結果を示している．Matrisian らは，私たちが使用した mRNA に対するアンチセンスオリゴではなく，アンチセンス RNA を用いてマトリライシンの発現を抑制した．その結果，アンチセンス RNA は大腸癌細胞の浸潤には影響せず，腫瘍の発生を抑制したとして，マトリライシンは大腸癌の浸潤，転移ではなく，大腸腺腫から癌への癌化の早期に関わるプロテアーゼであると結論している．使用した細胞株およびアンチセンスの違いによるとも考えられるが，私たちは，*in vitro* の実験結果およびマトリライシンが大腸癌の進行に伴い，その mRNA 量が増加し，肝転移巣で非常に強く発現している臨床研究の結果を考え合わせて，マトリライシンは大腸癌の浸潤に関与すると考えている．

細胞が増殖する際，周囲結合組織の分解は重要なステップで，プロテアーゼの関与は必須であり，MMP の発現はサイトカインや成長因子によりコントロールされている．今回の細胞増殖抑制実験の結果から，私たちは大腸癌が産生するマトリライシンが，直接大腸癌細胞の増殖も促進すると考えている．

教室の大腸癌肝転移に関する CEA ダブリングタイムによる肝転移発生の時間学的な検討[7]から，肝転移したほとんどの症例は，大腸癌原発切除時にすでに，転移巣としての生着可能な大きさである100μm^3以上の微小転移が肝に存在していたと推測された．この結果をもとに，進行大腸癌および肝転移切除症例に対して，5FU を中心とした肝動注を予防的に施行しているが，肝動注施行群で有意に再発率は低くその効果が臨床的に確認されている[8]．

現在，教室では，マトリライシン mRNA のアンチセンスオリゴを肺動注投与することにより，微小肝転移の増殖抑制および肝内への浸潤抑制の可能性について検討している．さらに，アンチセンスオリゴは，オリゴ自身には細胞毒性がないため，標的遺伝子に特異性が高い塩基配列を決定し，非特異的な遺伝子の発現の抑制をなくすことにより，投与量の制限なく使用できる．実際に臨床でアンチセンスオリゴを使うためには，ドラッグデリバリーをはじめとした多くの解決すべき問題がある．しかし，アメリカではすでにエイズや白血病などの血液疾患では，いくつかの遺伝子に対するアンチセンスオリゴの臨床治験が始まっている．私たちは，適切な遺伝子の mRNA に対する特異性の高いアンチセンスオリゴは最も安全な将来の遺伝子治療になりうると考えている．

文　献

1) Yoshimoto M, Ito F, Yamamoto H et al: Expression of MMP-7 (PUMP-1) in human colorectal cancers. Int J Cancer **54**：614—618, 1993
2) Mori M, Barnard GF, Mimori K et al: Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. Cancer **75**：1516—1519, 1995
3) Mitsuhashi M, Keller C, Akitaya T: Gene manipulation on plastic plates. Nature **357**：519—520, 1992
4) Mitsuhashi M, Cooper A, Ogura M et al: Oligonucleotides probe design-a new approach. Nature **367**：759, 1994
5) Momiyama N, Hyndman D, Kumagai H et al: Strategy of optimal sequence determination for antisense phosphorothioate oligonucleotide drugs. Proc Am Assoc Cancer Res **36**：412, 1995
6) Witty PW, MucDnnell S, Newell KJ et al: Modulation of Matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenecity in vivo. Cancer Res **54**：4805—4812, 1994
7) 藤井正一：CEA ダブリングタイムからみた大腸癌肝転移の発育．横浜医　**44**：627—635, 1994
8) Shimada H, Nanko M, Fujii S et al: Treatment strategies for hepatic metastasis from colorectal cancer. J Hep Bil Panc Surg **2**：116—121, 1995

Strategy for the Possible Microscopic Liver Metastasis of Colorectal Cancer
—For the Future Gene Therapy for Colorectal Cancer—

Takashi Ishikawa, Yasushi Ichikawa, Nobuyoshi Momiyama, Hideyuki Ike,
Shigeki Yamaguchi, Hidenobu Masui, Masao Nanko, Hiroyuki Yamaoka,
Masato Mitsuhashi[1], Tatsuo Akitaya[2] and Hiroshi Shimada
Second Department of Surgery, Yokohama City University, School of Medicine
[1]Hitachi Chemical Research Center, Irvine, CA, USA
[2]Hitachi Chemical Company

Messenger RNA expression of matrix metalloproteinase (MMP) 2, 7, 9 was examined in surgical specimens of colorectal cancers. Only MMP-7, matrilysin, mRNA was limitedly expressed in cancer, but not in surrounding tissue. Its expression was associated with progression of colorectal tumors with the maximum in liver metastatic tumors. Antisense oligonucleotides for matrilysin suppressed matrilysin mRNA expression in a matrilysin-producing rectal cancer cell line, CaR-1, resulting in inhibition of cell proliferation and the invasiveness of this cell line dose dependently. We conclude that matrilysin is a promising candidate as a new clinical diagnostic and prognostic marker of colorectal cancers as well as antisense oligonucleotide therapy.

Reprint requests: Takashi Ishikawa Second Department of Surgery, Yokohama City University, School of Medicine
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 236