日消外会誌　30（4）：910～914，1997年

特集6

c-*met* アンチセンスDNAによるヒト胃癌細胞の増殖・浸潤抑制の検討

金沢大学医学部第2外科
加治　正英　米村　豊　廣野　靖夫　津川浩一郎
伏田　幸夫　藤村　隆　三輪　晃一　宮崎　逸夫

標的mRNAに選択的に結合するDNAを用いて遺伝子発現をブロックする方法がアンチセンス法である．今回，癌の進展に関与するc-*met*遺伝子に対して，胃癌培養細胞における発現異常と，アンチセンスDNAによる培養細胞の増殖および浸潤抑制について検討した．c-*met*遺伝子の発現をNorthern blotにて解析したところ，c-*met* mRNAレベルはMKN-45＞TMK-1＞MKN-28の順に高かった．MKN-45細胞の増殖は10μMアンチセンスDNAの存在下で90％以上抑制された．マトリゲル中へのTMK-1細胞浸潤は，c-*met*アンチセンスDNA存在下で濃度依存性に低下した．以上の結果から，c-*met*に対するアンチセンスDNAが胃癌の進展阻止のための有効な治療手段となる可能性も考えられた．

Key words： c-*met*，antisense DNA，gastric cancer

はじめに

c-*met*遺伝子は，当初MNNG処理ヒト骨肉腫細胞で見い出された非*ras*型transforming遺伝子で[1]，その後肝細胞増殖因子（HGF）受容体をcodeすることが見出された[2]．c-*met*産物すなわちHGF受容体は，tyrosine kinase受容体ファミリーに属する．HGFが細胞運動性を調節するscatter factorと同一の因子であることも明らかにされた[3]．我々は先に，高度進行胃癌では高頻度でc-*met*遺伝子の過剰発現が認められることを報告した[4]．今回，培養胃癌細胞におけるc-*met*遺伝子の発現を解析するとともに，c-*met* mRNAに選択的に結合するアンチセンスDNA[5]を用いて胃癌細胞の増殖，浸潤におけるc-*met*の機能的役割を検討したので報告する．

対象と方法

1．培養細胞株

ヒト胃癌培養細胞株MKN-45，MKN-28（Japanese Cancer Research Resource Bank），TMK-1（広島大学，田原教授より分与）を用いた．いずれの細胞株もRPMI 1640にペニシリン100U/ml，ストレプトマイシン100μg/mlおよび10％fetal bovine serum（FBS）（Cell Culture Laboratories）を加えた培地にて培養した．培養はいずれも37℃，5％CO_2下で行った．

2．アンチセンスDNAの合成

c-*met* mRNAの開始コドンを含む5′領域に相補的な16塩基のホスホロチオエート型アンチセンスDNAと，コントロールとしてセンスDNAをDNA合成装置モデル392を用いて合成し，AQUAPORE RP-300カラム（Applied Biosystems）を用いた逆相分配高速液体クロマトグラフィーにて精製した．c-*met*アンチセンスDNAの塩基配列は5′-GCG GGG GCC TTC ATTA-3′，センスDNA配列は5′TAA TGA AGG CCC CCG C-3′とした．

3．Northern blot analysis

Poly（A）$^+$RNAをホルムアルデヒド加1.0％agarose gel上で電気泳動しHybond N$^+$nylon membrane（Amersham）に転写した．met-D[6]をprobeとしてhybridization[7]後，－80℃でautoradiographyを行った．

4．Western blot analysis

培養細胞の培地に種々の濃度のアンチセンスDNAおよび対照のセンスDNAを投与し，48時間培養した．

＊第48回日消外会総会シンポ1・消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開

＜1996年12月11日受理＞別刷請求先：加治　正英
〒920　金沢市宝町13－1　金沢大学医学部第2外科

PBSにて洗浄した後，細胞溶解液[8]を加え直ちに超音波破砕した．遠心後，上清を採取し，Bradford法[9]で蛋白定量した．10μg相当の抽出蛋白を7.5%SDS-PAGEにて電気泳動し，nitrocellulose membrane (Amersham) にsemi-dry transfer法で転写した．membraneをC-28抗体(Santa Cruz)と反応させた後，horseradish peroxidase標識2次抗体を結合させ，ECL(Amersham) による発光を検出した．

5. Invasion assay

高浸潤性株であるTMK-1細胞を用い，Albiniら[10]の方法を改良したinvasion assayを行った．すなわち孔径8μmのinvasion chamber(Bectom Dickinson)の上面を10μgのMatrigel(Becton Dickinson)でコートし，0.1%bovine serum albumin(BSA) を含むRPMI 1640培地にて細胞浮遊液を調製後，1 chamber当たり2×10^5個の細胞を播いた．細胞播種と同時にアンチセンス，センスDNAを種々の濃度で加えた．ヒト線維芽細胞MRC-5に24時間接触させた0.1%BSA加RPMI 1640培地をchemoattractant溶液としてchamber下段に置いた．37°C, 5%CO_2下で8時間培養後，chamber filter下面に遊走した細胞をHE染色し，1検体当たり最小20視野ずつ200倍にて鏡検し細胞数を計測した．

6. 腹膜播種モデル作製[11]

1×10^7個のMKN-45細胞浮遊液をヌードマウス皮下に移植した．皮下腫瘍が直径1cmになった時点で腫瘍を採取し，細切後，腫瘍片100mgを腹腔内へ注入した．6～8週後に腹水を採取・遠心分離し，1×10^7個の細胞浮遊液をヌードマウスの腹腔内に継代した．7代目以降より100%に腹水を伴う腹膜播種が形成されるようになり，この7代目以降の腹膜高度転移株をMKN-45-Pとした．

結　果

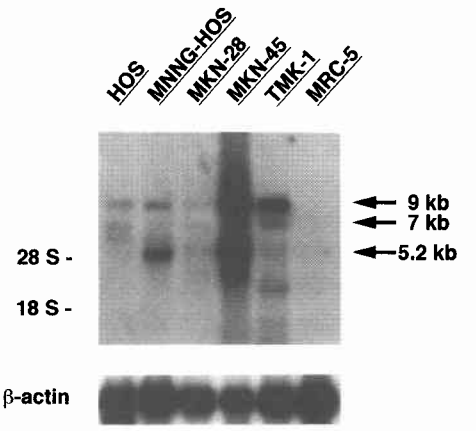
1. 胃癌培養細胞におけるc-*met* mRNAの発現

胃癌培養細胞MKN-28, MKN-45, TMK-1よりmRNAを抽出し，*met*-D probeを用いたNorthern法にて検討したところ，c-*met* mRNAレベルはMKN-45>TMK-1>MKN-28の順に高かった(**Fig. 1**)．この結果は，Western法で検出した*MET*蛋白量比と相関していた[12]．

2. c-*met*アンチセンスDNAの細胞増殖抑制効果

オリゴヌクレオチド投与後の生細胞数では，アンチセンスDNA投与群では，濃度依存的に細胞増殖が抑制されており，48時間後では10μMの濃度で約90%以上増殖抑制効果がみられた．これに対し，センスDNA投与群では，ほとんど細胞増殖抑制効果はみられなかった．c-*met*アンチセンスDNAにより実際c-*met*蛋白の発現が抑制されているかどうかをWestern法にて検討したところ，c-*met*アンチセンスDNAの濃度に依存して*MET*蛋白含量が低下していたが，センスDNA投与群では*MET*蛋白量は非投与群と同等であった(**Fig. 2**)．

Fig. 1 Northern blot analysis of c-*met* expression in gastric carcinoma cell lines[16], Human osteogenic sarcoma cell lines, HOS and MNNG-HOS, and MRC-5 fibroblast cell line were employed as positive and negative controls, respectively.



3. c-*met*アンチセンスDNAによる細胞浸潤抑制効果

次に，Matrigelを用いて*in vitro*の浸潤モデルを作製し，癌細胞の浸潤能におよぼすアンチセンスDNAの効果を調べた．高浸潤能をもつTMK-1細胞は，c-*met*アンチセンスDNA存在下で細胞数の変動は認められなかったが，浸潤モデルにおいては濃度依存的に有意の浸潤抑制が認められた(**Fig. 3**)．

4. 腹膜播種ヌードマウスに対する効果

アンチセンスDNAで1時間処理した高転移性MKN-45-P細胞と生食水処理したMKN-45-P細胞をそれぞれヌードマウスの腹腔内に移植し生存期間を比較した．その結果，生食処理群では全例腹膜播種を形成し70日以内に死亡したのに対し，アンチセンス処理した群では生存期間の延長が観察された．(**Fig. 4**)．

考　察

アンチセンス法は標的mRNA配列に選択的に結合

Fig. 2 Time course of c-*met* antisense-induced inhibition of MKN-45 cell growth[16]. Five hundred μl of 4×10^4cells/ml, suspension was inoculated in a 24-well clusterdish. After 24h, the medium was changed to fresh medium containing antisense or sense DNA. Viable cell number was determined at the indicated time points. Values are expressed as the mean of triplicate cultures; bars, SD. ○, Culture without oligonucleotides; ■, with 10μM sense control; ●, with 5μM antisense oligomers; ■, with 10μM antisense oligomers. B: Antisense c-*met* DNA-induced decrease in *MET* proteins. Lane 1, culture without oligomers; lanes 2 and 3, with 5μM and 10μM antisense oligomers, respectively; lane 4, with 10 μM sense oligomers.

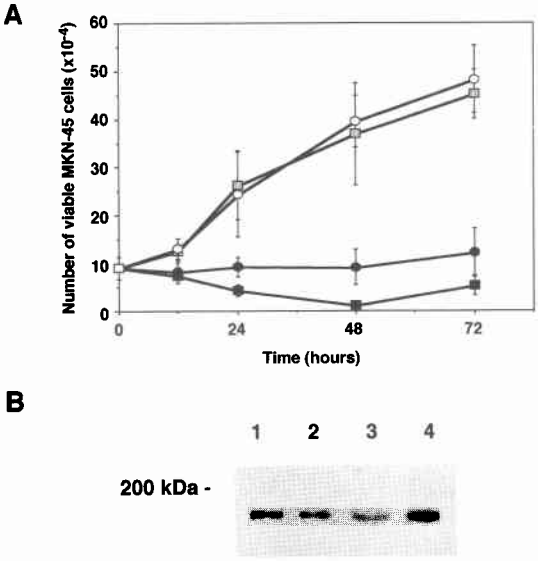


Fig. 3 Inhibition of TMK-1 cell invasion by c-*met* antisense DNA[16]. Values are related to those obtained without oligomers and are expressed as the mean±SD of triplicate experiments. □, Culture without oligomers; ■, with antisense oligomers; ■, with sense oligomers.

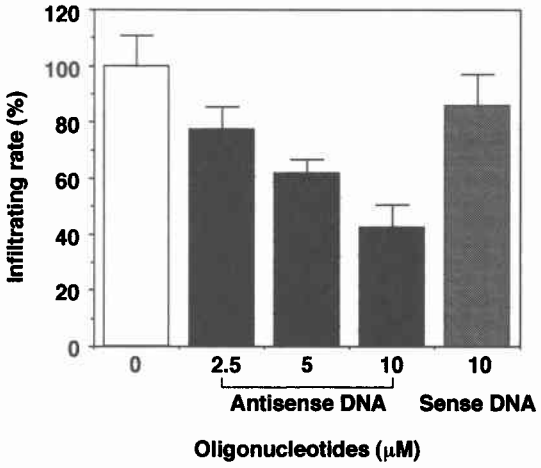
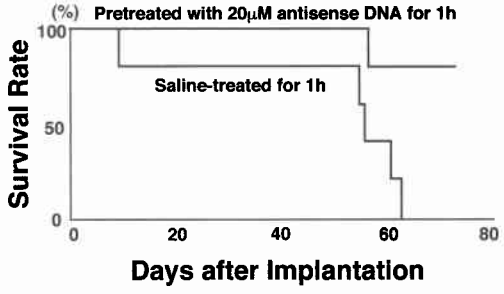


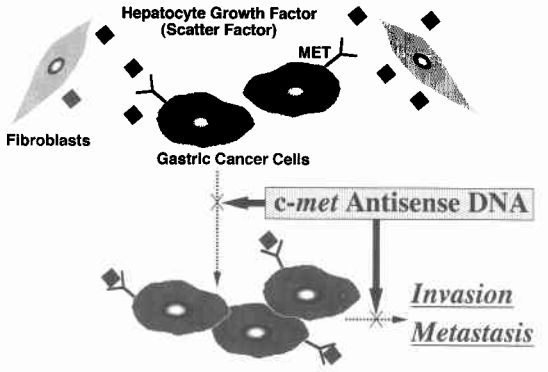
Fig. 4 Survival curves of MKN-45-P cell-implanted mice. Cells were pretreated with 20μM antisense DNA or vehicle alone (saline) for 1hour.



するオリゴヌクレオチドあるいはその修飾体を用いて，当該遺伝子の発現を主として翻訳の段階でブロックする方法である[5]．そのメカニズムとしては，第1に，アンチセンスオリゴヌクレオチドが mRNA に対合するとリボソームによるタンパク合成の開始/伸長反応が阻害されること[13]，第2に，形成された DNA-RNA 二重鎖がリボヌクレアーゼ H の基質となって mRNA が酵素的に分解されることが推定されている[14]．アンチセンス効果発現のうえで重要なポイントのひとつは安定性の問題である．天然型の DNA，RNA 分子は酵素的分解を受けやすいことから，アンチセンス分子にはヌクレアーゼに対して抵抗性が高いという属性が求められる．このため，リン酸基，糖部分あるいは3′，5′末端に化学修飾を施した誘導体が多く用いられている．ヌクレオシド間のホスホジエステル基の酸素原子のひとつを－S に置換したホスホロチオエート型，$-CH_3$に置換したメチルホスホエート型が代表的な高安定性誘導体である[15]．

今回我々は，c-*met* mRNA に相補的な16塩基のホスホロチオエート型を設計，合成し，その効果を検討したところ，当該アンチセンス標品は胃癌培養細胞の増殖のみならず浸潤能も抑制することが見出された．c-*met* アンチセンス DNA 存在下では *MET* 蛋白の発現が濃度依存的に抑制され，コントロールであるセンス DNA 存在下では胃癌培養細胞の増殖のみならず浸

Fig. 5 Roles of the *HGF-MET* system in gastric cancer progression and antisense as an alternative therapy.



潤能も変化しなかったことより，上記アンチセンス効果は標的mRNAに特異的であり，c-*met*遺伝子産物が胃癌細胞の増殖および運動能に機能的に関係しているものと結論された．

しかし，c-*met*アンチセンスDNAは胃癌培養細胞株により異なる作用を示した．すなわち，c-*met*アンチセンスはMKN-45細胞の増殖を抑制したが，TMK-1細胞の増殖には影響を及ぼさなかった．一方，TMK-1細胞の運動能は，同一のアンチセンスDNAにより顕著に抑制された．これは，これらの細胞種に対する以下のHGF作用と一致している．HGFは，MKN-45細胞のDNA合成を促進するが，TMK-1細胞のDNA合成には変化を及ぼさず，一方，HGF刺激でTMK-1細胞の運動性は亢進する[16]．c-*met*アンチセンス効果とHGF応答における上記の多様性の原因としては，まず，c-*met* mRNAレベルの差が考えられる．また，*MET*レセプター後のシグナル経路が2つの細胞株間で異なっている可能性も考えられる．ヒト血管内皮細胞[17]，ヒト悪性黒色腫細胞[18]では，HGFによって増殖と運動の両者が誘導されるが，肝細胞[19]では増殖のみ，MDCK細胞[20]では運動のみがHGFで促進されることが報告されている．高石ら[21)22]は，*MET*につづく細胞内シグナル伝達経路として*Ras*を介する経路と，*Rho*を介する経路という2つの経路の存在を示し，前者が増殖に後者が運動に関係する可能性を提唱している．

今回，我々は胃癌培養細胞におけるc-*met*遺伝子の発現をアンチセンスDNAにより制御することで，胃癌細胞の増殖能および浸潤能を抑制しうることを示した．手術や抗癌剤に加えて，このようながん遺伝子をターゲットとしたアンチセンス療法(**Fig. 5**)がヒト胃癌の治療手段のひとつとなる可能性も考えられた．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました金沢大学医学部第2生化学教室の山本　博教授に深謝いたしますとともに，御指導，御協力いただきました金沢大学医学部がん研究所化学療法部の佐々木琢磨教授，遠藤良夫助手に深く感謝いたします．

文　献

1) Cooper CS, Park M, Blair DG et al: Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. Nature **311**: 29—33, 1984
2) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL et al: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-*met* proto-oncogene product. Science **251**: 802—804, 1991
3) Stoker M, Gherardi E, Perryman M et al: Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. Nature **327**: 239—242, 1987
4) Kaji M, Yonemura Y, Fujimura T et al: Participation of c-*met* in the progression of gastric cancer. Edited by Passaro Jr. E. Collegium internationale chirurgiae digestivae. 14th world congress. Monduzzi editore, Italy, 1994, p211—215
5) 加治正英，山本　博：癌の遺伝子治療．宮崎逸夫，米村　豊編．進行胃癌に対する治療戦略．ソフトサイエンス社，東京，1995，p11—15
6) Park M, Dean M, Cooper CS et al: Mechanism of *met* oncogene activation. Cell **45**: 895—904, 1986
7) Yamagishi S, Hsu CC, Ymamoto H et al: Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. Biochem Biophys Res Commun **191**: 840—846, 1993
8) Rong S, Jeffers M, Resau JH et al: *MET* exression and sarcoma tumorigenecity. Cancer Res **53**: 5455—5360, 1993
9) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248—254, 1976
10) Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK et al: A rapid in vivo assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. Cancer Res **47**: 3239—3245, 1987
11) 米村　豊：腹膜播種形成の超微形態学的検討．米村　豊編．腹膜播種．へるす出版，東京，1996，p3—33

12) 加治正英ほか：腹膜播種形成に関係する遺伝子群．米村　豊編．腹膜播種．へるす出版，東京，1996，p34—70
13) Haeuptle MT, Frank R, Dobberstein B: Translation arrest by oligodeoxynucleotides complementary to mRNA coding sequences yields polypeptides of predetermined length. Nucleic Acids Res **14**：1427—1448，1986
14) Pramod D, Ilana L, Michael K et al: Selective elimination of *mRNAs in vitro*: Complementary oligonucleotides promote RNA degradation by an RNase H-like activity. Proc Natl Acad Sci USA **84**：7896—7900，1987
15) Sarin PS, Agrawal S, Civeira MP et al: Inhibition of acquired immunodeficiency syndrome virus by oligodeoxynucleoside methlphosphonates. Proc Natl Acad Sci USA **85**：7448—7451，1988
16) Kaji M, Yonemura Y, Yamamoto H et al: Anti-c-*met* oligonucleotides inhibit proliferation or invasiveness of gastric cancer cells. Cancer Gene Ther **3**：393—404，1996
17) Bussolino VF, Di Renzo MF, Ziche M et al: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. J Cell Biol **119**：629—641，1992
18) Matsumoto K, Hashimoto K, Yoshikawa K et al: Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. Exp Cell Res **196**：114—120，1991
19) Gherardi E, Stoker M: Hepatocyte growth factor-scatter factor: mitogen, motogen, and *met*. Cancer Cells **31**：227—232，1991
20) Uehara Y, Kitamura N: Expression of a human hepatocyte growth factor/scatter factor cDNA in MDCK epithelial cells influences cell morphology, motility, and anchorage-independent growth. J Cell Biol **117**：889—894，1992
21) Nishiyama T, Sasaki T, Takaishi K et al: *ras* p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and *rho* p21 is involved in hepatocyte growth factor- and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. Mol Cell Biol **14**：2447—2456，1994
22) Takaishi K, Sasaki T, Kato M et al: Involvement of *Rho* p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. Oncogene **9**：273—279，1994

c-*met* Antisense Oligonucleotides Inhibit Proliferation or Invasiveness of Gastric Cancer Cells

Masahide Kaji, Yonemura Yutaka, Yasuo Hirono, Kouichirou Tsugawa, Sachio Fushida, Takashi Fujimura, Kouichi Miwa and Itsuo Miyazaki
Second Department of Surgery, Kanazawa University School of Medicine

We first screened for c-*met* expression in human gastric cancer cell lines, MKN-28, MKN-45 and TMK-1, by Northern blot analysis. The rank order of c-*met* mRNA abundance in these cell lines was MKN-45>TMK-1>MKN-28. Next, to test whether the growth and invasion of gastric cancer cells depend on c-*met*, we prepared phosphorothioate-type antisense oligonucleotides that were complementary to human c-*met* mRNA. We conducted experiments to determine whether blocking expression of the c-*met* gene with the antisense molecules affected either the proliferative or the invasive phenotype of the cancer cells. The growth of MKN-45 cells was markedly inhibited by the antisense c-*met* oligonucleotides, in a dose-dependent manner, but not by sense controls. The antisense oligonucleotides also effectively inhibited the migration of TMK-1 cells. These results indicate that c-*met* gene products may be causally related to the proliferation or invasion of gastric cancer cells, and that antisense c-*met* DNA has therapeutic potential in that it may facilitate circumventing the progression of gastric cancers.

Reprint requests: Masahide Kaji Second Department of Surgey, Kanazawa University School of Medicine
13-1 Takara-machi, Kanazawa, 920 JAPAN