

〔原 著〕

Manganese superoxide dismutase遺伝子による  
マウス退縮型癌細胞の悪性化進展の抑制

中井 一元

北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：有末 眞教授)

Suppression of tumor progression of murine regressor tumor cells  
by transfection with manganese superoxide dismutase gene

Kazumoto NAKAI

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School  
of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

(Chief : Prof. Makoto Arisue)

**Abstract**

QR-32 cells are unable to grow in normal C57BL/6 mice when injected s. c. ( $1 \times 10^5$  cells), whereas they grow lethal and are converted to malignant tumor after co-implantation with a foreign body, i. e., gelatin sponge, through mediation of the foreign-body-induced inflammation. Rat manganese superoxide dismutase (MnSOD) cDNA was transfected into a clonal mouse fibrosarcoma cell line, QR-32, to examine suppressive effects of such antioxidative enzyme on inflammatory-cell-mediated tumor progression. MnSOD overexpressing clones (QR-32SOD-23 and 24) were analyzed for their ability to convert the phenotype to malignant tumors in comparison to control vector-transfected cells (QR-32 neo) and wild type QR-32 cells. QR-32SOD-23 cells and QR-32SOD-24 cells had 2.2 and 1.8-fold increases in MnSOD activity, respectively, as compared to QR-32 neo cells. A similar increase was observed in MnSOD immunoreactive protein level by Western blotting using rat MnSOD specific antibody. The effect of MnSOD overexpression on the cell phenotype was determined by co-implantation of the tumor cells with gelatin sponge into C57BL/6 mice. Both QR-32 cells and QR-32 neo cells which had been co-implanted with gelatin sponge grew progressively in seven out of ten animals.

第56回日本癌学会総会 (1997年9月26日)

受付：平成10年3月30日

On the other hand, both QR-32SOD-23 cells and QR-32SOD-24 cells grew progressively in two out of ten animals ( $p < 0.05$ ). All of the cell lines established from the tumor which had arisen in mice were converted to malignant ones. These results suggest that inflammatory-cell-mediated tumor progression of QR-32 cells is accelerated by active oxygen species and that such tumor progression is prevented by the induction of antioxidative enzyme MnSOD in tumor cells.

**Key words :** Tumor progression, Oxygen radical, Antioxidative enzymes, Inflammation, Gene transfection

## 緒 言

近年、癌治療技術の進歩に伴い口腔癌の治療成績も向上してきているが、未だ癌細胞の有する造腫瘍性、浸潤・転移能などの悪性形質に起因する再発、転移により制御不能となる場合も少なくないのが現状である。癌細胞の悪性形質は、必ずしも発癌当初より備わっているわけではなく、主に発癌後の増殖過程において周囲の微小環境との関わり、特に炎症局所において高頻度、長時間持続放出される活性酸素の影響などによって、遺伝子変化が蓄積し獲得されているらしいことが種々の臓器の癌で証明されて来ている<sup>1-3)</sup>。また、口腔癌でも同様の現象が生じている可能性が明らかにされつつあることから<sup>4)</sup>、癌細胞の悪性形質獲得の機序解明およびその抑制は口腔癌の研究、治療において重要な今日的課題と考えられる。

活性酸素は、本来生体における生理的代謝や各種生化学的反応を行う上で必要不可欠なものであるが、その量的なバランスが崩れた場合には、逆に生体を構成する蛋白質、脂質および核酸などに障害をもたらす様々な疾患を誘発する<sup>5),6)</sup>ことも知られている。

細胞にはmanganese superoxide dismutase (MnSOD), copper and zinc superoxide dismutase (Cu, ZnSOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT)などの抗酸化酵素が存

在し活性酸素障害から自らを防御する機構が備わっており<sup>7)</sup>、両者間の調節が図られ生体の恒常性が保たれている。従来、これら活性酸素が発癌や癌細胞の悪性化進展に関与する証明は、主として疫学的考察や*in vitro*における抗酸化物質、抗酸化酵素を用いた検討<sup>8-11)</sup>によりなされ、生体内における活性酸素および抗酸化酵素と発癌、悪性化進展との関係を明らかにした研究は少ないのが現状である。また、これらの研究は癌細胞に作用する活性酸素の影響を検討したものが多く、癌細胞側の活性酸素抵抗能、すなわち癌細胞内の抗酸化酵素誘導能の程度と、活性酸素が介在する悪性化進展との関係を検討した研究はない。

岡田らは、C57BL/6マウスの線維肉腫BMT-11 cl-9をmutagenであるquercetinで処理して得られたQR癌細胞<sup>12)</sup>を用い癌細胞の悪性化進展を再現する動物実験モデルを確立した。すなわち、QR癌細胞を同系正常マウスに単独皮下移植すると自然退縮し腫瘍を形成しないが、ゼラチンスポンジ等の異物と共に皮下移植すると腫瘍を形成する。増殖してきた腫瘍から樹立した培養癌細胞株を新たなマウスに皮下あるいは尾静脈内移植を行うと、もとのQR癌細胞には見られない強い増殖性および肺転移能を示すという悪性化進展モデルを確立した<sup>13,14)</sup>。この悪性化進展を促進する要因として、異物に集積する炎症細胞の産生する活性酸素が関与してい

るらしいことを *in vitro*, *in vivo* の実験で推察している<sup>15-17)</sup>。また、数系の Q R 癌細胞クローンをを用いた実験では、細胞内の抗酸化酵素のうち特に MnSOD の蛋白量と悪性化進展を起こす頻度が逆相関することが示されている。すなわち、MnSOD 量の少ない QR-32 クローン癌細胞は比較的容易に悪性化進展を獲得するが、逆に MnSOD 量の多い QR-29 クローン癌細胞では悪性化進展に対して抵抗性であることが示されている<sup>18)</sup>。

そこで、活性酸素が Q R 癌細胞の悪性化進展の要因であること、および癌細胞内の抗酸化酵素の悪性化進展過程における役割を明らかにするために MnSOD 遺伝子を QR-32 癌細胞に導入し過剰発現させ、これがゼラチンスポンジとの同時皮下移植によって起こる悪性化進展に及ぼす影響を検討した。

## 材料と方法

### 1. 動物

S L C (浜松) より購入し、S P F 環境で飼育した 7~10 週令のメス C57BL/6 マウスを用いた。

### 2. 細胞

C57BL/6 マウスの 3-Methylcholanthrene 誘発線維肉腫 BMT-11 の培養クローン 9 を quercetin (55 $\mu$ M, 48 時間) 処理後、再クローニングして樹立した QR-32 癌細胞および QR-29 癌細胞を用いた。これら Q R 癌細胞は造腫瘍性が低く、同系マウスに  $2 \times 10^5$  皮下移植した場合全例自然退縮するが、放射線照射や免疫を抑制したマウスでは致死的増殖を示す<sup>12,19)</sup>。

### 3. 培養条件

Q R 癌細胞は 10% ウシ胎仔血清 (56°C, 30 分にて不活化), L-glutamine (292.3mg/l) を含む Eagle's minimum essential medium (MEM)

培地にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air 条件下で培養維持した。

### 4. *in vitro* における細胞の増殖性

癌細胞を 10cm 培養シャーレ 1 枚あたり  $1 \times 10^5$  個に調整し上記培養条件で培養した。培養開始より 5 日間、経日的に 1 シャーレあたりの細胞数を算定し細胞の増殖性を観察した。

### 5. 癌細胞の移植と観察

エーテル麻酔下にマウス背部皮下に 10 $\times$ 5 $\times$ 3 mm のゼラチンスポンジ (山之内製薬, 東京) を皮下移入し、このゼラチンスポンジ内に癌細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を移植した。その後経時的に皮下腫瘍の増殖を観察した。

### 6. 培養株の樹立と悪性化進展の判定

癌細胞とゼラチンスポンジを同時皮下移植して 21 日目に、増殖してきた腫瘍を無菌的に摘出し、無血清 MEM 培地内で細切した。癌細胞をガーゼで濾過した後、赤血球を 170mM Tris-NH<sub>4</sub>Cl pH7.2 処理にて溶解した。無血清 MEM 培地にて 3 回洗浄後の癌細胞を  $5 \times 10^5$  から  $1 \times 10^6$  個/ml に調整し上記培養条件で培養した。

培養株樹立後 10~14 日間培養した後、新たなマウスに  $2 \times 10^5$  個単独皮下移植し皮下増殖を観察した。また、 $1 \times 10^6$  個尾静脈内移植し 21 日目に移植動物を屠殺し肺転移巣のコロニー数を算定した。悪性化進展の判定は親株 QR-32 癌細胞の皮下増殖能または肺転移能と比較し、どちらか一方でも有意に増強しているものを悪性化進展を起こしたものと判定した。

### 7. MnSOD 発現ベクターの作製

rat MnSOD cDNA は pSP65 の EcoRI site に組み込まれた形で大阪大学谷口直之博士より供与を受け使用した。pSP65 を制限酵素 EcoRI に

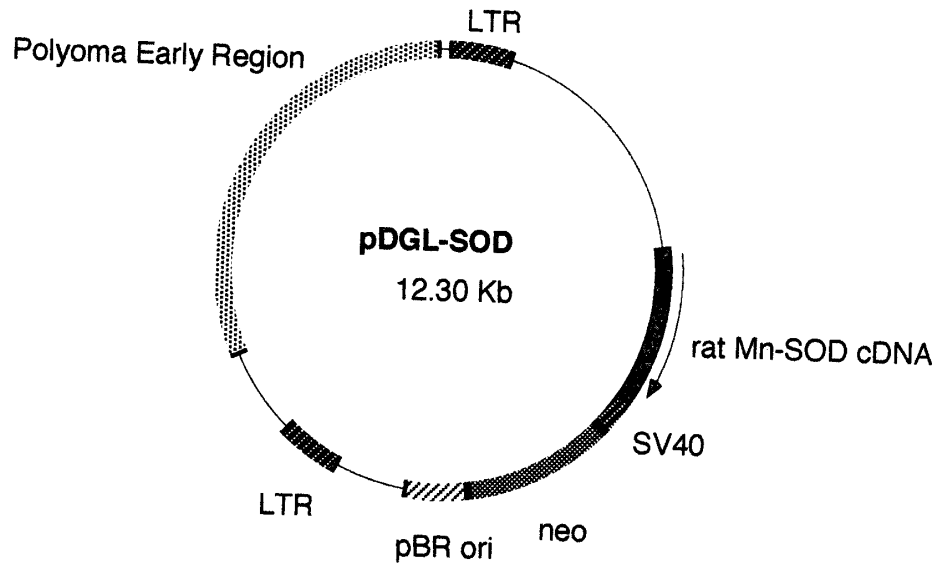


Fig. 1 pDGL-SOD ; rat MnSOD expression vector

て処理しrat MnSOD cDNA fragmentを回収した。得られたrat MnSOD cDNAをmulticloning siteをもつプラスミドpBluescript II ks-のEcoRI siteに組み込んだ。制限酵素Pst I処理によりrat MnSOD cDNAの挿入方向を確認後、pBluescript II ks-よりBam H I, Sal Iにてrat MnSOD cDNA fragmentを切り出し、北海道大学藤田寿一博士より供与を受けた発現ベクターpDGLのBam H I, Sal I siteに挿入し作製した (Fig. 1)。

## 8. 遺伝子の導入

上記方法にて作製したMnSOD発現ベクターおよび発現ベクターのみをlipofectin法<sup>20)</sup>にてQR-32癌細胞に導入後、G418 (800 $\mu$ g/ml) 含有MEM培地にて2週間培養しベクター導入細胞を選択した。その後、limiting dilution法によりsingle cell cloningを行いMnSOD発現ベクター導入クローン癌細胞およびベクターのみの導入クローン癌細胞を得た。

## 9. MnSOD, GPx, Cu, ZnSOD蛋白の検出

培養シャーレより癌細胞を回収しPBSにて

3回洗浄後、癌細胞を $5 \times 10^6$ /mlの濃度となるようSDS loading bufferに溶解、水中にて1分間のsonicationの後、15,000回転、4 $^{\circ}$ C、15分間、遠心し上清を回収し、cell lysateとした。サンプルを95 $^{\circ}$ C、5分間処理にて変性、polyacrylamide gel (stacking gel-4%, separating gel-12%)にて分離した<sup>21)</sup>。分離した蛋白をnitrocellulose membrane (Bio-Rad)に転写後、4 $^{\circ}$ C、通夜、blocking buffer (0.1% Tween20/PBS containing 3% BSA)にてブロッキングした。Tween-PBSにて5回洗浄後、一次抗体<sup>22)</sup> (rabbit anti rat MnSOD IgG, rabbit anti rat Cu, ZnSOD IgG, rabbit anti human GPx IgG)にて処理 (室温、1時間)し、Tween-PBSにて5回洗浄した。その後、室温にて1時間、二次抗体goat anti rabbit IgG peroxidase conjugateにて処理し、enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham, RPN3004, UK.)にて各々の蛋白を検出した。また、この結果をDensitometer (アトー株式会社、東京)にて測定し、定量化した。

## 10. MnSOD活性の測定

0.5~1.0×10<sup>7</sup>個の培養細胞を200μl PBSに懸濁し、凍結融解を5回繰り返した後、3,000回転、4°C、10分間、遠心し上清を回収しサンプルとした。サンプルを5 mM NaCNにて1時間処理し、nitroblue tetrazolium (NBT) 法<sup>23)</sup>にて測定した。サンプルの総蛋白量はLowry法<sup>24)</sup>にて測定した。

## 11. MnSOD遺伝子導入の確認

rat MnSOD遺伝子導入の確認は通法のReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて行った。

培養細胞より TRIzol® Reagent (LIFE TECHNOLOGIES™) を用いTotal RNAを抽出した後、5 μg total RNAより75mM potassium chloride, 50mM Tris-HCl (pH8.3), 3mM magnesium chloride, 10mM dithiothreitol, 0.5mM each dNTP, 2 μg/ml random primer, 1000U MNLV reverse transcriptase (Gibco, MD, USA)を含む総量50μlの反応液にて37°C、1時間保温しcDNAを合成した。この合成されたcDNAを含む反応液5 μl, 50mM potassium chloride, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 2.5mM magnesium chloride, 0.1% Triton X-100, 200mM each dNTP, 1 U Taq polymerase (Gibco BRL, MD, USA), 10mM each specific primerを含む総量50μlの反応液をthermal cyclerにて25 cycle(94°C 1分, 60°C 1分, 72°C 2分) 反応させrat MnSOD cDNA およびmouse β-actin cDNAを増幅した。rat MnSOD primerには5' primer: 5'-ACTG-GGCCCCGCGCCAGTACCC, 3' primer: 5'-CGTTTGATACATAGAAACCGを、mouse β-actin primerには5' primer: 5'-AGGGAAATCGTGCGTGCGTGACAT-CAAA, 3' primer: 5'-ACTCATCGTACT-CCTGCTTGCTGAを用いた。

増幅したrat MnSOD cDNAおよびmouse β-actin cDNAを含む反応液1 μlをgel loading bufferと共に1%アガロースゲルにて電気泳動し、ethidium bromideにて染色した。

## 12. 統計処理

MnSOD活性はStudent t検定を用いた。また、QR癌細胞の悪性化進展の抑制はχ<sup>2</sup>検定を用いた。

## 結 果

### 1. QR癌細胞の悪性化進展と細胞内抗酸化酵素量の測定

本研究に用いたQR-32癌細胞とQR-29癌細胞の悪性化進展の頻度と細胞内抗酸化酵素量の関係を確認するために、QR-32癌細胞およびQR-29癌細胞をゼラチンスポンジと共に同時皮下移植し造腫瘍性を観察するとともに、細胞内のMnSOD蛋白量およびGPx蛋白量を測定した。QR-32癌細胞をゼラチンスポンジと共に同時皮下移植したところ10例中7例(70%)のマウスに腫瘍増殖が認められたが、QR-29癌細胞では10例中1例(10%)のマウスにしか腫瘍増殖は認められなかった(Table 1)。さらに、増殖してきた癌細胞の悪性形質の獲得の有無を観察するためにQR-32癌細胞を移植した7匹(QR32sP), QR-29癌細胞を移植した1匹(QR29sP)より各々培養癌細胞株を樹立し、これを新たな正常マウスに単独皮下移植もしくは尾静脈内移

Table 1 Growth of QR clones in syngeneic C57BL/6 mice after co-implantation with gelatin sponge

Cell lines	Tumorigenicity <sup>a</sup>	
	Taken/used	%
QR-32	7/10	70.0
QR-29	1/10*	10.0

a. QR-clone cells (1×10<sup>5</sup>) were subcutaneously implanted with gelatin sponge.

\*p<0.05 versus QR-32

**Table 2** Progression of QR clones during *in vivo* growth after co-implantation with gelatin sponge in C57BL/6 mice

Cell lines <sup>a</sup>	Incidence of tumorigenicity		Progression
	Subcutaneous implantation <sup>b</sup> (Died/used)	Intravenous injection <sup>c</sup> (No. of colonies per lung)	
QR-32	0/15	1/16	
QR32sP-1	4/5*	2/5 (1,1)	+
QR32sP-2	4/5*	3/5* (2,2,12)	+
QR32sP-3	3/5*	5/5* (3,4,4,4,15)	+
QR32sP-4	1/5	4/5* (1,1,3,3)	+
QR32sP-5	1/5	5/5* (1,3,5,10,20)	+
QR32sP-6	1/5	3/5* (1,1,3)	+
QR32sP-7	1/5	4/5* (2,6,22,28)	+
QR-29	0/5	0/5	
QR29sP-1	1/5	4/5** (1,1,1,4)	+

a.  $1 \times 10^5$  QR-32 cells were subcutaneously implanted with gelatin sponge. The resultant tumors were cultured separately and named QR32sP-1 to QR32sP-7.  $1 \times 10^5$  QR-29 cells were subcutaneously implanted with gelatin sponge. The resultant tumor was cultured separately and named QR29sP-1.

b. Normal mice were subcutaneously implanted with  $2 \times 10^5$  QRsP cells or QR clone cells.

c. Normal mice were intravenously injected with  $1 \times 10^6$  QRsP cells or QR clone cells. twenty one days later, the mice were killed and the metastatic nodules on the surface of lung were counted. Each value represents the number of colonies per mouse.

\*;  $p < 0.05$  versus QR-32\*;  $p < 0.05$  versus QR-29

植した。親株QR-32癌細胞の皮下および肺転移能に比べて7系のQR32sPうち3系(QR32sP-1, 2, 3)で皮下増殖の有意な増強が見られ、QR32sP-1以外の6系では肺転移能の有意な増強が観察された。また、QR29sP-1は、肺転移能の有意な増強を獲得していた。すなわち、QR-32癌細胞、QR-29癌細胞ともにゼラチンスポンジと皮下移植すると、腫瘍の出現頻度はQR-29癌細胞で有意に低いが ( $p < 0.05$ ), 増殖してきた癌細胞は全例悪性化進展を獲得していることが分かった (Table 2)。

QR-32およびQR-29癌細胞内のMnSODおよびGPx量をWestern Blotting法にて測定したところ、QR-29癌細胞のMnSOD量はQR-32癌細胞に比較して1.8倍、またGPx量は3倍であった (Table 3)。

以上の結果より、QR癌細胞内の抗酸化酵素

**Table 3** Relative amounts of MnSOD and GPx in QR clones

Cell lines	Relative amounts of protein <sup>a</sup>	
	MnSOD	GPx
QR-32	1.0	1.0
QR-29	1.8	3.0

a. Amounts of MnSOD and GPx protein were estimated by Western blotting with antibody to each protein.

量と悪性化進展の出現頻度に逆相関のあることが確認された。

## 2. MnSOD発現ベクター導入クローン癌細胞

MnSOD発現ベクターをlipofectin法にてQR-32癌細胞に導入し、G418 ( $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 含有MEM培地にて2週間培養後、limiting dilutionによりsingle cell cloningを行いMnSOD発癌ベクター導入癌細胞 (QR-32SOD) を48クローン

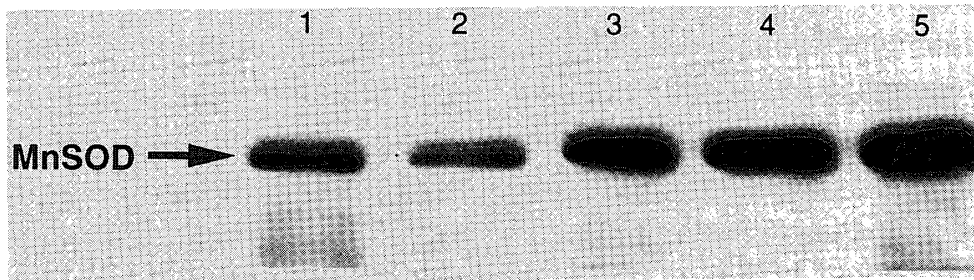


Fig. 2 Western blot analysis of Mn SOD in QR-32 transfectants. Cellular protein were prepared and separated by SDS electrophoresis and immunoblotted by the Western method as described in Materials and Methods. Lane 1 contained wild type QR-32 cells; Lane 2 contained the plasmid control cells QR32neo; Lane 3, 4 contained the MnSOD transfectants QR-32SOD-23, 24; Lane 5 contained QR-29 cells. Each lane was loaded with  $30\mu\text{l}$  of  $5 \times 10^5$  cells/ml cell-lysate.

得た。また、同様にベクターのみの導入クローン癌細胞 (QR-32neo) を得た。

### 3. MnSOD高発現クローン癌細胞の選択

得られた48系のQR-32SODクローンの中からMnSODの高発現クローンをWestern blotting法により選択した。その結果、QR-32SOD-23 およびQR-32SOD-24の2クローンを得た。この2クローンの細胞内MnSOD蛋白発現量は、悪性化進展を起こす頻度の低いQR-29癌細胞のそれとほぼ同程度まで増強されていた (Fig. 2)。

### 4. MnSOD高発現クローン癌細胞におけるMnSOD活性の測定

QR-32癌細胞, QR-32neo癌細胞, QR-32SOD-23癌細胞およびQR-32SOD-24癌細胞のMnSOD活性をNBT法によって測定した。QR-32SOD-23癌細胞およびQR-32SOD-24癌細胞のMnSOD活性はQR-32癌細胞およびQR-32neo癌細胞のそれと比較して約2倍と有意に高い値を示し ( $p < 0.05$ ) MnSODの蛋白量に比例する値を示していた (Fig. 3)。

### 5. MnSOD mRNAの発現

QR-32癌細胞, QR-32neo癌細胞, QR-32SOD-23癌細胞およびQR-32SOD-24癌細胞のMnSOD mRNAの発現をRT-PCR法にて確認した。QR-32癌細胞, QR-32 neo癌細胞にはrat Mn-SOD mRNAの発現は認められなかったが, QR-32SOD-23癌細胞およびQR-32SOD-24癌細胞ではrat MnSOD mRNAの発現が認められた。また, 対照となるmouse  $\beta$ -actin mRNAの発現はいずれの癌細胞も同程度に発現されていた (Fig. 4)。

### 6. *in vitro*における癌細胞の増殖性

QR-32癌細胞, QR-32neo癌細胞, QR-32SOD-23癌細胞およびQR-32SOD-24癌細胞の*in vitro*における癌細胞の増殖性を検討した。その結果, QR-32癌細胞, QR-32neo癌細胞, QR-32SOD-23癌細胞およびQR-32SOD-24癌細胞の*in vitro*における増殖性に有意な差は認められず, 遺伝子導入による増殖性の変化は観察されなかった (Fig. 5)。

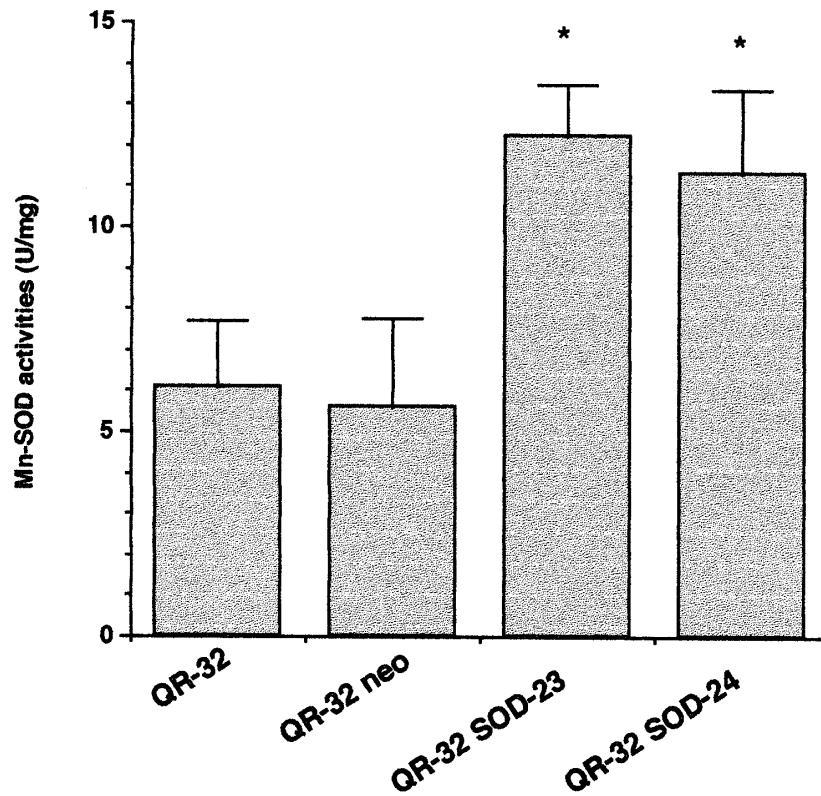


Fig. 3 MnSOD activities in QR-32 transfectants. MnSOD activity was measured by the NBT method described in Materials and Methods.  
\* ;  $p < 0.05$  versus QR-32neo

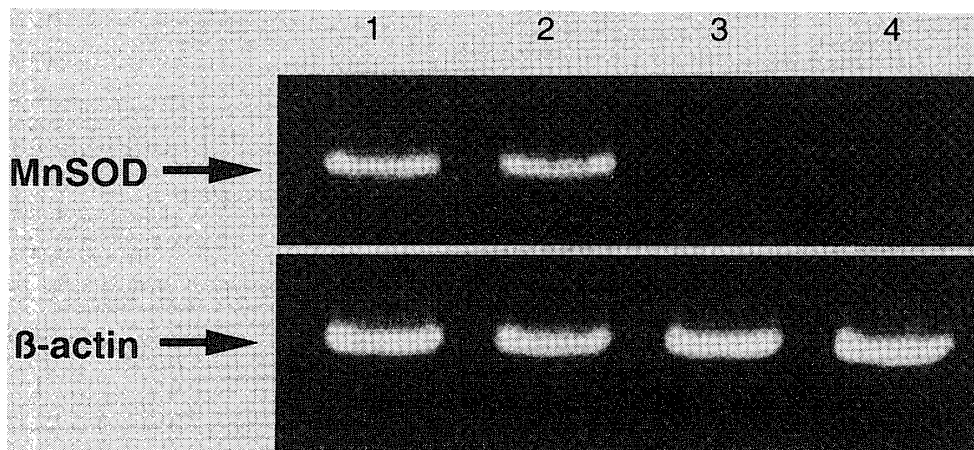


Fig. 4 Detection of rat MnSOD mRNA expression in QR-32 transfectants by RT-PCR assay. RNA preparation and RT-PCR assay were performed as described in Materials and Methods. Lane 1, 2 contained the MnSOD transfectants QR-32SOD-23, 24, respectively; Lane 3 contained wild type QR-32 cells; Lane 4 contained the plasmid control cells, QR-32neo.



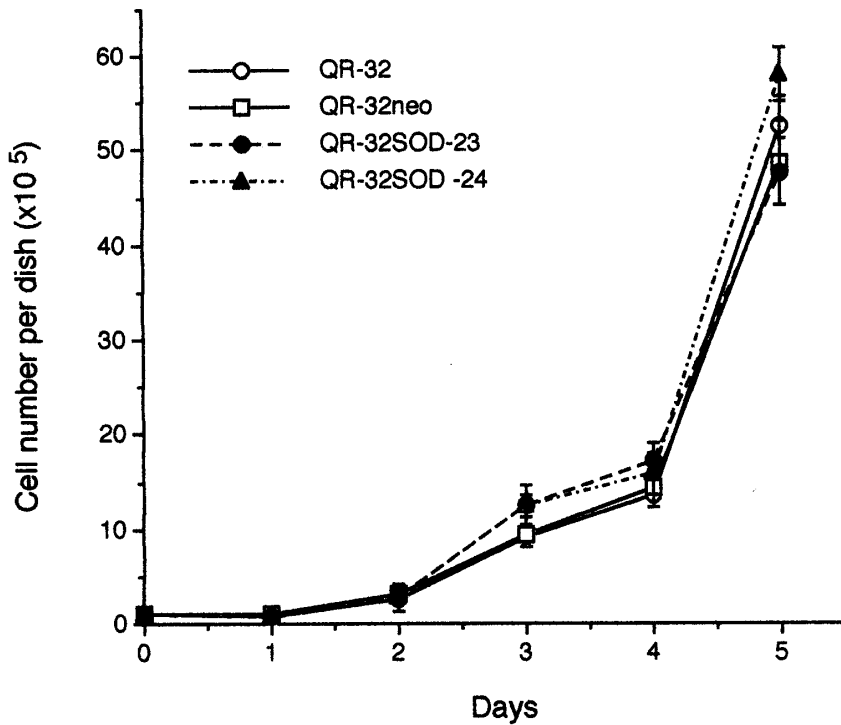


Fig. 5 In vitro growth curves of QR-32 transfectants. QR-32, QR-32neo, QR-32SOD-23 and QR-32SOD-24 cells were plated in 100mm culture dish ( $1 \times 10^5$  per dish) in MEM. Cells were cultured in a 37°C incubator. Cells were trypsinized and resuspended in MEM. Cell number per dish was counted.

7. 癌細胞のゼラチンスポンジとの同時皮下移植による造腫瘍性の検討

QR-32癌細胞, およびQR-32neo癌細胞はゼラチンスポンジとの同時皮下移植によりそれぞれ10例中7例(70%)で腫瘍の増殖を認めたが, MnSOD高発現クローンQR-32SOD-23癌細胞, QR-32SOD-24癌細胞では, それぞれ10例中2例(20%)にしか腫瘍増殖を認めなかった。MnSOD高発現によりゼラチンスポンジとの同時皮下移植で促進される造腫瘍性の獲得が有意に( $p < 0.05$ )抑制されることが示された(Table 4)。

8. 増殖した癌細胞の悪性化進展の検討

QR-32癌細胞, QR-32neo癌細胞, QR-32SOD-23癌細胞およびQR-32SOD-24癌細胞をゼラチンスポンジと同時皮下移植後に増殖してきた腫瘍から培養癌細胞株を樹立し, 正常マウスに

Table 4 Growth of QR-32 transfectants in syngeneic C57BL/6 mice after co-implantation with gelatin sponge

Cell lines	Tumorigenicity <sup>a</sup>	
	Taken/used	%
QR-32	7/10	70.0
QR-32neo	7/10	70.0
QR-32SOD-23	2/10*	20.0
QR-32SOD-24	2/10*	20.0

a. QR-clone cells ( $1 \times 10^5$ ) were subcutaneously implanted with gelatin sponge.

\*;  $p < 0.05$  versus QR-32neo

皮下移植および尾静脈内移植し, 増殖した癌細胞の悪性化進展を検討した。QR-32癌細胞とゼラチンスポンジとの同時皮下移植後に増殖してきた腫瘍から樹立した癌細胞7系は2系(QRsP-1, 7)で皮下増殖の, 6系(QRsP-2, 3, 4, 5, 6, 7)で肺転移能の有意な増強が見られ, 各培養株ごとに皮下増殖能, 肺転移能のいずれか一方が増強されているものを悪性化進展

**Table 5** Progression of QR-32 transfectants during *in vivo* growth after co-implantation with gelatin sponge in C57BL/6 mice

Cell lines <sup>a</sup>	Incidence of tumorigenicity		Progression
	Subcutaneous implantation <sup>b</sup> (Died/used)	Intravenous injection <sup>c</sup> (No. of colonies per lung)	
QR-32	0/15	1/16	—
QRsP-1	3/5*	2/5 (1, 2)	+
QRsP-2	2/5	5/5* (2, 5, 12, 23, > 150)	+
QRsP-3	2/5	4/5* (3, 4, 6, > 150)	+
QRsP-4	1/5	4/5* (3, 8, 10, > 150)	+
QRsP-5	0/5	5/5* (2, 5, 10, 17, > 150)	+
QRsP-6	1/5	3/5* (2, 7, 23)	+
QRsP-7	4/5*	5/5* (24, 42, > 150, > 150, > 150)	+
total	13/35	28/35	7/7
QRneosp-1	4/5*	5/5* (4, 7, 17, 23, > 150)	+
QRneosp-2	0/5	3/5* (5, 22, 43)	+
QRneosp-3	2/5	5/5* (8, 14, 32, > 150, > 150)	+
QRneosp-4	4/5*	1/5 (3)	+
QRneosp-5	2/5	4/5* (8, 44, > 150, > 150)	+
QRneosp-6	2/5	5/5* (3, 4, 16, 34, > 150)	+
QRneosp-7	3/5*	4/5* (14, 25, > 150, > 150)	+
total	17/35	27/35	7/7
QRSOD23sP-1	2/5	4/5* (6, 19, 34, 42)	+
QRSOD23sP-2	0/5	4/5* (8, 26, > 150, > 150)	+
total	2/10	8/10	2/2
QRSOD24sP-1	1/5	3/5* (2, 8, 25)	+
QRSOD24sP-2	2/5	5/5* (16, 17, 28, > 150, > 150)	+
total	3/10	8/10	2/2

a.  $1 \times 10^5$  QR-32, QR-32neo, QR-32SOD-23 and QR-32SOD-24 cells were subcutaneously implanted with gelatin sponge. The resultant tumors were cultured separately.

b. Normal mice were subcutaneously implanted with  $2 \times 10^5$  QRsP cells or QR-32 cells.

c. Normal mice were intravenously injected with  $1 \times 10^6$  QRsP cells or QR-32 cells. 21 days later, the mice were killed and the metastatic nodules on the surface of lung were counted. Each value represents the number of colonies per mouse.

\*;  $p > 0.05$  versus QR32.

と判定すると、樹立した培養株 7 系はすべて悪性化進展を起こしていた。同様に、QR-32neo 癌細胞より樹立した培養株 7 系は 3 系 (QRneosp-1, 4, 7) で皮下増殖の、6 系 (QRneosp-1, 2, 3, 5, 6, 7) で肺転移能の有意な ( $p < 0.05$ ) 増強が見られ、樹立した培養株 7 系は親株 QR-32 癌細胞と同様にすべて悪性化進展を起こしていた。さらに、QR-32SOD-23 癌細胞および QR-32SOD-24 癌細胞より樹立したそれぞれ 2 系づつの培養株ではすべて肺転移能の有意な増強が見られたことから、悪性化進展を獲得した

細胞株と判定した (Table 5)。

以上の結果より、MnSOD 高発現により QR-32 癌細胞のゼラチンスポンジとの同時皮下移植により増殖する腫瘍の頻度は有意に低下するものの、増殖してきた細胞の悪性化の進展は、QR-29 癌細胞の場合と同様に全例で獲得していることが示された。

## 考 察

本研究の結果は、QR 癌細胞をゼラチンスポンジと同時皮下移植することによって起こる癌

細胞の悪性化進展が、癌細胞内に抗酸化酵素 MnSODを遺伝子導入によって過剰に発現させることにより有意に抑制され得ることを示した。このことは、Q R癌細胞の悪性化進展には周囲の環境（炎症）からの活性酸素が深く関与していることと、癌細胞内の抗酸化酵素とのバランスが悪性化進展の獲得に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

癌細胞の悪性化進展とは、発癌後の細胞が増殖の過程で周囲微小環境との関わりによって強い増殖性、浸潤・転移能などの癌細胞特有の悪性形質を獲得していく現象と理解されている。現在、この現象は周囲の微小環境から活性酸素や種々のサイトカインなどの作用により、発癌後の癌細胞に遺伝子変化が重積し、次第にその形質が変化することにより生じる現象であることが分子生物学的に明らかにされて来ている。その中でも、特に活性酸素はその主因となっていることが推察されている。放射線照射、化学発癌物質の投与や重金属化合物投与によって生じる活性酸素がDNAに酸化障害を与えること<sup>25,26)</sup>、さらに活性酸素が10T1/2細胞やJB6細胞に対して発癌プロモーターとして作用すること<sup>27,28)</sup>のほかに、疫学的検討から抗酸化物質であるビタミンEやβ-カロチンが肺癌や大腸癌の発生を抑制すること<sup>29,30)</sup>などからも発癌促進作用のあることが明らかにされつつある。

また一方で、癌細胞内に存在する抗酸化酵素も悪性化進展に重要な役割を果たしていることも示されてきている。たとえば、ヒト大腸癌や肝癌では周囲正常細胞と比べ、癌細胞内のMnSOD発現が低いこと<sup>31,32)</sup>が示されており、抗酸化酵素の発現の低下が発癌および悪性化進展を促進している可能性が推察されている。また、逆にヒト悪性メラノーマや乳癌細胞株ではMnSOD遺伝子の導入によりin vitroでの増殖性、plating efficiencyやsoft agar colony formationなどのさまざまな悪性形質の発現低下

が認められるだけでなく、造腫瘍性も消失する<sup>33,34)</sup>。MnSODが細胞内で癌抑制遺伝子様の働きを担っている可能性も推察されている<sup>35)</sup>。しかしながら、その詳しい機序についてはいまだ不明な部分が多いままとなっている。その最大の要因として、*in vivo*, *in vitro*における再現性の良いモデルの不足が挙げられる。

本研究に用いたC57BL/6マウス線維肉腫BMT-11をmutagenであるquercetinで処理して得られたQ R癌細胞クローン、QR-32癌細胞およびQR-29癌細胞はプラスチックプレートやゼラチンスポンジなどの異物とともに同系マウスに皮下移植することで、もとの癌細胞には見られない皮下増殖能および肺転移能を獲得し悪性化進展することから、癌化した細胞がその後の増殖過程で起こる悪性化進展を再現する極めてよい実験モデルとして確立されている。また、悪性化進展を起こす頻度の異なるクローンを比較することにより、悪性化進展を誘発する要因およびその抑制因子の解析にも有用である。このQ R癌細胞の悪性化進展の要因については完全に解明されてはいないが、岡田・加藤らは*in vivo*, *in vitro*において以下の現象を観察している<sup>12-18)</sup>。1, QR-32癌細胞はゼラチンスポンジ反応腹腔浸潤細胞と混合移植することで悪性化進展する。2, QR-32癌細胞はプラスチックプレート埋没後、0～5日目に移植すると高率に悪性化進展するが、20～30日目ではその頻度が低下する。3, Q R癌細胞の悪性化進展度とプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)産生能は正の相関を示す。このPGE<sub>2</sub>産生量はゼラチンスポンジ反応腹腔浸潤細胞との混合培養のみならず、炎症性サイトカインのINF-α, TNF-αおよびTGF-βの添加により増強し、抗酸化酵素の添加により抑制される。4, Q R癌細胞にゼラチンスポンジ反応腹腔浸潤細胞を作用させるとDNA突然変異が生じ、この変異は抗酸化物質マニトールの添加で抑制される。5, Q R癌細胞に

は悪性化進展を起こす頻度の異なるクローンが存在し、それらクローンの細胞内MnSODおよびGPx蛋白量と悪性化進展を起こす頻度との間に逆相関がある。6, *In vivo*で、次硝酸ビスマスやP S K投与により腫瘍組織内に抗酸化酵素を誘導すると、Q R癌細胞のゼラチンスポンジとの同時皮下移植による悪性化進展が抑制される。これらの実験結果より、Q R癌細胞の悪性化進展には異物を移植することで生じる急性炎症の場集積する炎症細胞が産生する活性酸素や炎症性サイトカインが関与していること、また、癌細胞内の抗酸化酵素がQ R癌細胞の悪性化進展の頻度を規定していることが示唆されている。このような実験事実は、近年多くの主要臓器癌に炎症が関わるという知見からも支持されると考えられる。

本研究においても、悪性化進展を起こす頻度の高いQR-32癌細胞および頻度の低いQR-29癌細胞のMnSODおよびGPxの測定と悪性化進展の頻度を検討したところ、QR-29癌細胞のMnSOD量およびGPx量はいずれもQR-32癌細胞に比較して高値を示し、これに逆相関してQR-29癌細胞の悪性化進展頻度は有意に低値を示した(Table 1, 2, 3)。本研究では、MnSODがQ R癌細胞のゼラチンスポンジと同時皮下移植によって起こる癌細胞の悪性化進展に及ぼす影響を明らかにするために、悪性化進展を高率に起こすQR-32癌細胞にMnSOD cDNAを遺伝子導入し、細胞内MnSOD活性が約2倍の値を示す高発現クローン癌細胞を作製し検討した。その結果、MnSOD高発現クローン癌細胞のゼラチンスポンジと同時皮下移植によって起こる癌細胞の悪性化進展頻度は元のQR-32癌細胞やベクターのみを導入したものと比較して有意に抑制されていた。しかし、遺伝子導入を行いMnSODを高発現したにもかかわらず、増殖した腫瘍より得た培養株では2系ともに悪性化の進展がQR-29癌細胞の場合と同様に観察された

(Table 4, 5)。また、今回、結果は示していないが、この2系の培養株のrat MnSOD mRNAの発現を検討したところ、この発現が確認され、増殖した腫瘍での遺伝子の欠落は生じていないことが確認された。

本研究で用いたマウス癌細胞の悪性化進展にも、これに伴う特異的遺伝子変異があると想像される。このまだ未定の遺伝子はおそらく活性酸素により変異をうけて悪性形質を発現させるものと考えているが、細胞内に活性酸素を消去するMnSODなどの抗酸化酵素を誘導しておく、この遺伝子の変異を生じにくくしているものと考えている。しかし、こういった消去能をもつMnSODが誘導されても、この遺伝子に生じた癌細胞は悪性化進展を起こしてしまうものと考えられる。

以上、本実験から炎症によって癌細胞の悪性化進展が促進されること、さらにこの要因に炎症細胞からの活性酸素が関わることを推察される。このような炎症介在性の悪性化進展は癌細胞内に抗酸化酵素を誘導することで抑制されることを示した。本実験では抗酸化酵素を遺伝子導入という方法で発現させたが、このほかにも抗酸化酵素cDNAを用いた遺伝子治療のほか、抗酸化酵素の腫瘍組織内誘導、抗酸化物質の投与などにより癌の悪性化進展が予防される可能性が示された。

## 結 語

Q R癌細胞のゼラチンスポンジとの同時皮下移植によって起こる悪性化進展がMnSOD遺伝子導入によって有意に抑制された。このことより、活性酸素がQ R癌細胞の悪性化進展の要因であること、癌細胞内の抗酸化酵素が悪性化進展に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔外科第二講座有末眞教授、北海道大学医学部癌研究施設病理部門細川眞澄男教授に深く感謝いたします。また、終始適切な御助言をいただいた北海道医療大学歯学部口腔外科第二講座柴田敏之助教授、北海道大学医学部癌研究施設病理部門岡田太助手に謝意を表します。そして、本研究に対しご協力いただいた教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Nowell PC: Mechanisms of tumor progression., *Cancer Res.*, **46**: 2203-2207, 1986.
2. Pitot HC: Progression: terminal stage in carcinogenesis. *Jap., J. Cancer Res.*, **80**: 599-607, 1989.
3. 細川眞澄男, 武市紀年, 岡田 太, 小林 博: がんのプログレッションの定義をめぐって. *Oncologia*, **23**: 138-140, 1990.
4. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, et al.: Genetic progression model for head and neck cancer. Implications for field cancerization., *Cancer Res.*, **56**: 2488-2492, 1996.
5. 中野 稔: 酸素と活性酸素, *Med. Immuno.*, **26**: 385-393, 1993.
6. 吉川敏一, 西村俊一郎, 近藤元治: 酸素ストレス, *Med. Immuno.*, **26**: 395-400, 1993.
7. Ames BN, Shigenaga MK, and Hagen TM: Oxidants, antioxidant, and the degenerative diseases of aging., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 7915-7922, 1993.
8. Cerutti PA: Prooxidant states and tumor promotion., *Science*, **227**: 375-381, 1985.
9. Oberley LW, and Buettner GR: Role of superoxide dismutase in cancer: a review., *Cancer Res.*, **39**: 1141-1149, 1979.
10. Cerutti P, Ghosh R, Oya Y et al.: The role of cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis., *Environ Health Perspect*, **120**: 123-130, 1994.
11. Ames BN, Gold LS and Willett W.C.: The causes and prevention of cancer., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5258-5265, 1995.
12. Okada F, Hosokawa M, Hasegawa J et al.: Regression mechanisms of mouse fibrosarcoma cells after in vitro exposure to quercetin: diminution of tumorigenicity with a corresponding decrease in the production of prostaglandin E2., *Cancer Immuno. Immunother.*, **31**: 358-364, 1990.
13. Okada F, Hosokawa M, Hamada J et al.: Malignant progression of a mouse fibrosarcoma by host cells reactive to a foreign body (gelatin sponge)., *Br. J. Cancer*, **66**: 635-639, 1992.
14. Okada F, Hosokawa M, Hamada J et al.: Progression of a weakly tumorigenic mouse fibrosarcoma at the site of early phase of inflammation caused by plastic plates., *Jap. J. Cancer Res.*, **84**: 1230-1236, 1993.
15. 岡田 太: オキシラジカルによるがんの悪性の進展, *Oncologia*, **26**: 648-653, 1993.
16. 加藤元康, 岡田 太, 芳 紅他: 癌細胞の悪性化進展に及ぼす癌微小環境の役割, *Biotherapy*, **8**: 210-213, 1994.
17. 加藤元康: Endogenous oxygen radical scavengerによるマウス退縮型癌細胞の悪性化進展の抑制に関する研究, *東日本歯学会誌*, **13**: 245-257, 1994.
18. 岡田 太, 細川眞澄男, 加藤元康他: マウス退縮型癌細胞の悪性化進展感受性と細胞内ラジカルスカベンジャー量, 第52回日本癌学会総会記事 p.99, 1993.
19. Ishikawa M, Okada F, Hamada J et al.: Changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cells treated with quercetin or 5-azacytidine., *Int. J. Cancer*, **39**: 338-342, 1987.
20. Felgner PL, Gadek TR, Holm M et al.: Lipofection: a high efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7413-7417, 1987.
21. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4., *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
22. 勝部幸輝, 谷口直之編: SODの新知見構造, 機能と診断, 治療へのかかわり, *メディカルトリビューン*, 東京, 1990, pp 33-42.
23. Oberley LW, Spitz DR: Hand book of methods for Oxyradical Research. Greenwald RA ed., CRC

- Press, Boca Raton FL, 1985, 217-225.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL: Protein measurement with the folin phenol reagent., *Biol. Chem.*, **193**: 265-675, 1951.
  25. 川西正祐, 山本互二, 井上純子: 発がん性重金属化合物と過酸化水素による酸素ラジカル生成およびDNA損傷, *Oncologia*, **24**: 6-14, 1991.
  26. 葛西 宏: 酸素ラジカルと8-ヒドロキシグアニン, *Oncologia*, **24**: 15-21, 1991.
  27. Zimmerman R, Cerutti P: Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/2, T1/2/C18 fibroblasts., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2085-2087, 1984.
  28. Muehlemaier D, Larsson R, Cerutti P: Active oxygen induced DNA strand breakage and polyADP-ribosylation in promotable and non-promotable JB6 mouse epidermal cells., *Carcinogenesis*, **9**: 239-245, 1988.
  29. Mebkes M, Comstock G, Vuilleumier J et al.: Serum-carotene, vitamins A and E, selenium and the risk of lung cancer., *N. Engl. J. Med.*, **315**: 1250-1254, 1986.
  30. Gey F: Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer., *Am. J. Nutr.*, **45**: 1368-1377, 1987.
  31. St. Clair DK, Holland JC: Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells., *Cancer Res.*, **51**: 939-943, 1991.
  32. Oberley LW, Bize IB, Sahu SK. et al.: Superoxide dismutase activity of normal murine liver, regenerating liver, and H6 hepatoma., *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**: 375-379, 1978.
  33. Church SL, Grant JW, Rindnour LA et al.: Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma., *Proc. Natl. Acad. USA*, **90**: 3113-3117, 1993.
  34. Li J, Oberley LW, St. Clair DK et al.: Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase., *Oncogene*, **10**: 1989-2000, 1995.
  35. Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F et al.: SOD2: a new type of tumor-suppressor gene?, *Int. J. Cancer*, **51**: 476-480, 1992.
  36. Baumann H, Gauldie J: The acute phase response., *Immunol. Today*, **15**: 74-80, 1994.
  37. Church SL, Grant JW, Meese EU et al.: Sub-localization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6p25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping., *Genomics*, **14**: 823-825, 1992.
  38. 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦編: 活性酸素生物での生成・消去・作用の分子機構, 共立出版, 東京, 1988, 178-185.
  39. 福山直人, 中澤博江: NOの多面的な作用機序, 医学のあゆみ, **172**: 529-534, 1995.