

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18417

研究課題名（和文）好中球カテプシンGによる乳がん細胞凝集反応とがん転移促進作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of neutrophil cathepsin G induces breast cancer cell aggregation and metastasis

研究代表者

鎌田 理代（Morimoto-Kamata, Riyo）

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：00439564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、乳がん組織に浸潤した好中球の機能に着目し、がんの進行に対する関わりを解明すべく実施した。培養乳がん細胞に対して好中球から分泌されるタンパク質であるカテプシンGががん細胞の凝集塊を形成させた。この実験結果は好中球ががん細胞の悪性化と転移促進に関わっている可能性を示している。本研究はこの細胞凝集のメカニズムを解明し、その成果は学術雑誌に掲載された。がん悪性化も促進している可能性が極めて高いことも明らかにした。今後、がん転移との関わりについて進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the function of neutrophils infiltrating the breast cancer and carried out to clarify the relationship with cancer progression. Cathepsin G, a protein secreted from neutrophils, formed aggregates of cultured breast cancer cells. This experimental result shows the possibility that neutrophils are involved in malignant cancer cells and promotion of metastasis. This study elucidated the mechanism of this cell aggregation and the results were published in academic journals. It is also very likely that promoting cancer malignancy is very high. We are planning to promote the relationship with cancer metastasis in the future.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：好中球 乳がん

## 1. 研究開始当初の背景

当研究室の油井らは、好中球特異的プロテアーゼであるカテプシン G(CG)が MCF-7 細胞の自発的運動性を亢進させて細胞集合と、それに続いて起こる球状の E-カドヘリン依存細胞凝集塊(spheroid)の形成を誘導することを見出した。がん細胞 spheroid は、がん患者の血管やリンパ管内に検出される構造体である。塞栓部位で転移巣を形成することから、spheroid の形成はがん転移と強い関連が示唆されている。しかしながら、CG による MCF-7 細胞凝集反応の分子機構は不明な点が多い。また、がん細胞 spheroid はがん悪性化に関わる形質を獲得する場合がある。Spheroid を形成した場合、その中心部が低酸素環境となり、低酸素環境下で機能する転写因子である低酸素誘導因子(HIF)を介して血管新生因子や多剤耐性遺伝子などを発現するためである。しかしながら、CG によって誘導された spheroid ががん転移や悪性形質獲得に寄与しているかは未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、好中球による乳がん細胞凝集反応の分子機構とがん転移への関与を明らかにすることである。がん組織には好中球の浸潤が高頻度で認められるが、がん細胞の増殖や転移などの病態に対する好中球の役割は未解明である。2011 年に本研究室に赴任して以降、本反応には CG の酵素活性が必須であることや、CG が細胞外マトリックス分解作用だけでなく細胞に直接作用して何らかの細胞内シグナル伝達経路を活性化する分子機構で細胞凝集が起こること、CG が何らかの receptor tyrosine kinase cascade を活性化することによって細胞凝集が引き起こされることなどを明らかにした。しかしながら、本反応の分子機構の全容や、がん細胞転移や悪性化形質といった病理学的意義の解明には至っていない。本研究は、好中球が関与するがん細胞転移機構や悪性化形質獲得機構を知る上で非常に重要な知見を与えるだろう。

## 3. 研究の方法

好中球による乳がん細胞凝集反応の分子機構とがん細胞転移促進作用を解明するため、以下の実験を行った。

- 実験計画(1) CG による細胞凝集反応を制御するシグナル伝達機構の解明:これまでの研究成果から、CG による MCF-7 細胞凝集反応は receptor tyrosine kinase 活性化が必須である可能性が高い。様々な kinase に対する阻害剤が多種類組み合わせられた阻害剤ライブラリーを用いて本反応を阻害する分子をスクリーニングした。スクリーニングで陽性となった標的分子には、ウェスタンブロット法にて CG に依存した受容体のチロシンリン酸化が引き

起こされているかを確認した。CG の標的分子の候補について siRNA により遺伝子発現をノックダウンした MCF-7 細胞を作製し、CG 誘導性細胞凝集反応が低下するかを検討した。

- 実験計画(2) CG によって形成されたがん細胞 spheroid の characterization:一般的に、がん細胞 spheroid は中心部が低酸素環境になり、HIF の発現誘導を介して血管内皮成長因子(VEGF)や多剤排出トランスポーターである P-糖タンパク質(P-gp)などのがん悪性化に関わる遺伝子群が誘導される。CG によって形成された細胞凝集体に HIF が発現しているか、また、VEGF や P-gp の発現が誘導され、これらが機能しているかを調べる。in vitro の評価法としてリアルタイム PCR による VEGF mRNA 発現量解析や、CG 誘導性 spheroid の培養上清に含まれる VEGF を定量して検討した。in vivo の評価法として、マトリゲル包埋した spheroid をマウス皮下に移植して新生する微小血管を計数する方法で検討した。
- 実験計画(3) CG によって形成されたがん細胞 spheroid の in vivo 転移促進作用の検討:in vivo における CG 誘導性がん細胞 spheroid 形成を検討した。CG 遺伝子(CTSG)を安定発現したラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞を MCF-7 細胞と一緒にマウスの mammary fat pad に移植し、転移巣の形成や生存期間に対する効果を検討した。転移巣の形成は、In vivo イメージング装置を用いた全身のがん細胞分布解析や、各組織における転移コロニー数により解析した。

## 4. 研究成果

実験計画(1)は全て完了し、平成 29 年に研究結果を *Cancer Science* に投稿し掲載された(Morimoto-Kamata and Yui, *Cancer Sci.*, 2017, 108, 1574-1583.)。阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニングにより、CG が insulin-like growth factor-1 受容体(IGF-1R)の活性化を引き起こしている事を見出した。CG により IGF-1R シグナルカスケードの下流で働く Akt と Erk のチロシンリン酸化が引き起こされる事も確認した。また、siRNA によって IGF-1R タンパク質の発現をノックダウンした細胞では CG による細胞凝集反応が低下していた。これらの結果は CG が何らかの分子機構を介して IGF-1R シグナル経路を活性化することによって細胞凝集を誘導している事を示している。一方で、CG がどのような分子機構を介して IGF-1R を活性化しているのかは解明できていない。CG は分子量や構造から IGF-1R のリガンドになる可能性は極めて低い。しかし、CG によって MCF-7 細胞の培養上清に含まれる insulin-like growth factor(IGF-1)が増加するという実験結果や、IGF-1 の安定化や受容体への結合

を阻害する結合タンパク質である IGF binding protein (IGFBP) が CG によって分解されるという文献から、CG が IGFBP を分解することによって遊離型 IGF-1 を増加し IGF-1R の活性化を誘導している可能性が考えられる。今後この可能性を解明していく。これらの研究成果は CG により乳がん細胞が凝集体を形成する分子機構を解明した。好中球プロテアーゼが関わるがん転移促進の作用機序とそれをターゲットにした抗悪性腫瘍薬の開発に繋がるだろう。

実験計画(2)は7割程度完了した。CG によって形成された MCF-7 細胞凝集体で低酸素マーカーである HIF-1 タンパク質が発現していることをウェスタンブロット法と免疫染色で確認した。また、この細胞凝集体では VEGF mRNA の発現量が増加していた。これらの結果は、CG 誘導性細胞凝集体が低酸素状態に陥っており、HIF によって血管新生が誘導されている可能性が極めて高いことを示している。P-gp mRNA 発現量や抗悪性腫瘍薬への耐性の解析は現在進行中である。今後1年以内に実験計画(2)を完了し、その成果を学術雑誌に投稿する予定である。

実験計画(3)は3割程度しか完了しなかった。CTSG を安定発現した RBL-2H3 細胞を作成した。しかし、MCF-7 細胞との共移植実験はまだ行っていない。今後引き続きこれらの実験計画を実施する予定である。

また、平成30年に学術雑誌「細胞」から研究総説の執筆依頼を受け、本研究期間の成果を取りまとめて投稿し、掲載された(鎌田・油井、細胞、2018, 50, 200-203)。本研究の実験計画(1)および実験計画(2)の成果を中心に、好中球による乳がん細胞凝集反応とその病態生理学的意義および低酸素環境誘導によるがん悪性化の可能性について概説した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Morimoto-Kamata R. and Yui S.

Insulin-like growth factor-1 signaling is responsible for cathepsin G-induced aggregation of breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Sci.* 査読あり、2017, **108**, 1574-1583.

鎌田理代・油井聡 好中球による乳がん細胞凝集とがん転移 *細胞* 査読なし、2018, **50**, 200-203

〔学会発表〕(計2件)

鎌田理代、カテプシンGによる乳がん細胞MCF-7凝集反応はinsulin-like growth factor-1 receptorの活性化を介する、日本薬学会第137年会、2017年  
佐久間裕、好中球カテプシン G の乳がん細胞 MCF-7 に対する結合と細胞内取り込み、日本薬学会第136年会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab2/87bougyo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鎌田 理代 (Riyo Morimoto-Kamata)  
帝京大学・薬学部・助教  
研究者番号：00439564

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )