

令和元年6月6日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14616

研究課題名(和文) 癌と間質線維芽細胞との相互作用による浸潤能獲得の分子機構の解析

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of cooperative invasion between cancer cells and stromal fibroblasts

研究代表者

堺 隆一 (Sakai, Ryuichi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：40215603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の増殖、転移、浸潤などの悪性化の過程に、癌細胞とその周囲の間質線維芽細胞との相互作用が深くかかわることが明らかになっている。本研究は、先行研究で樹立した3D共培養のイメージング手法に、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを用いたスクリーニングを組み合わせることで、スキルス胃癌と間質線維芽細胞の相互作用に関わる癌細胞側、線維芽細胞側の膜蛋白質を同定する方法を確立することに成功し、この相互作用を抑える候補ファージ抗体を複数単離することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年種々の腫瘍で腫瘍細胞と間質細胞の相互作用が腫瘍の悪性化の制御因子として着目されているが、細胞間の相互作用は通常分子生物学的、細胞生物学的手法のアプローチに限界があるため、この相互作用の鍵となる分子の探索は進んでいない。本研究によりマトリゲル上の3D共培養を用いた浸潤能の定量とファージディスプレイ抗体ライブラリーを用いた全く新しいスクリーニング手法を確立することができたことは、多くの腫瘍の腫瘍間質相互作用の解析に応用可能であると考えられる。また本研究で候補として挙げてきた分子は、全く新しいスキルス胃癌の治療法開発の糸口となりうると考える。

研究成果の概要(英文)：It is recently highlighted that the interaction between cancer cells and surrounding stromal fibroblasts is deeply involved in the regulation of growth, metastasis and invasion of cancers. In this study, we established a new approach to reveal molecules regulating this interaction by using three dimension co-culture method along with the screening of the phage display antibody library. Several candidates of the phage antibody clones are picked up using this new technology.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：スキルス胃癌 間質線維芽細胞 ファージ抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織には腫瘍細胞の他に間質細胞と呼ばれる線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞などの非腫瘍細胞を含み、さらに細胞外マトリックスなどの細胞以外の成分が入り込んでいる。このようにいわゆる微小環境が腫瘍細胞の悪性形質誘導に関わることが最近注目されている。特に腫瘍細胞と周辺の間質線維芽細胞の相互作用により癌の浸潤が激しく増強されることが見いだされ、そのメカニズムに興味もたれている (Yamaguchi H & Sakai R, Cancers 2015)。我々は、固形腫瘍の中で特に間質細胞の強い関与が示唆されるスキルス胃癌を用いて、先行研究として腫瘍細胞と間質線維芽細胞との相互作用の研究を開始した。

本研究開始までの解析で、スキルス胃癌細胞を胃壁線維芽細胞とマトリゲル内で三次元の状態でも共培養すると、どちらの単独の培養でも得られなかった強い収縮力を生じ、特有の浸潤性凝集塊の形成や細胞外マトリックスの分解、リモデリングが起こることが分かった。このような凝集塊は線維芽細胞を中心とした細胞集団に癌細胞が引き寄せられることで生じており、液性因子よりも直接の細胞間の接触が重要であることが示された。浸潤性凝集塊の形成は、スキルス胃癌で見られる胃壁内での腫瘍細胞を取り囲む間質増生と組織の収縮を伴った臨床像との関わりも興味深い。生化学的解析によりアクチン系系の活性化がこの強い収縮力を生み出していることが分かったが (Yamaguchi H et al, PLoS One 2014)、その相互作用の詳細は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

腫瘍細胞と間質細胞の相互作用の重要性が近年脚光を浴びているが、その解析手法が限られているためなかなか分子メカニズムの解明には至っていない。本研究は、3D共培養のイメージング解析とファージディスプレイ抗体ライブラリーのスクリーニングにより、相互作用に関わる癌細胞側、線維芽細胞側の膜蛋白質を同定し、浸潤能の誘導に関わる相互作用の本態を明らかにすることを目的とする。またその相互作用を阻害する抗体などが、マウスモデルにおいて胃癌の転移・浸潤能に与える影響を解析し、新規治療法の導出につなげる。

3. 研究の方法

これまでに確立したマトリゲル内での共培養によって浸潤性凝集塊の形成を観察する系は、低倍率で画像を撮りイメージングソフトで凝集塊のサイズ、個数などを計測することにより定量的に評価可能である。これを用いてマルチウェルプレート上で化合物や siRNA を比較的効率良くスクリーニングに用いることができる

A) スキルス胃癌と線維芽細胞で形成される浸潤性凝集塊をイメージングにより定量し、siRNA ライブラリーおよびファージディスプレイ抗体ライブラリーを用いて相互作用を阻害するクローンをスクリーニングし、単離されたクローンについて標的となる腫瘍細胞側あるいは間質線維芽細胞側の蛋白質を明らかにする。この分子のノックダウンにより浸潤性凝集塊の形成が阻害されることを確認して、両細胞の相互作用による協調的な浸潤能獲得の分子メカニズムを明らかにする。

B) 得られた相互作用の制御分子候補が *in vitro* の共培養や、マウスに移植した腫瘍の増殖や浸潤に与える影響をノックダウンなどにより評価するとともに、単離されたヒト型ファージ抗体クローンについては、完全抗体に変換するなどして創薬としての有効性を評価する。

4. 研究成果

スキルス胃癌細胞と間質線維芽細胞を3次元マトリゲル上で共培養することで特徴的な浸潤性の細胞凝集塊を形成することを見出した。この浸潤性凝集塊は腫瘍細胞や線維芽細胞のみでは形成されず、また高分化型胃癌細胞でもほぼ形成が見られないことから、癌 - 間質の相互作用による浸潤能獲得のモデルになると考えた。蛍光イメージングにより定量解析できることから、この相互作用を抑制する薬剤のスクリーニングを、文科省がん支援班から供給された約 3000 種の阻害薬ライブラリーを用いて進め、実際、幾つかの薬剤が強い細胞毒性の見られない濃度で、浸潤性凝集塊の形成を優位に阻害することを見出した。これらの薬剤のうち Dasatinib については腹膜播種モデルマウスの腹腔内への投与で、線維芽細胞の腫瘍内への侵入が減少し、播種結節の形成を抑える効果が確認された。スキルス胃癌細胞と間質線維芽細胞との相互作用のみ

られる変化は、一方の培養上清の添加では起こらないためがん細胞と線維芽細胞の直接接触によっておこると考え、直接接触に影響を与える化合物・モノクローナル抗体の探索の系の確立を行った。

線維芽細胞を単層培養したディッシュ上に GFP でラベルしたスキルス胃がん細胞を重層し、15 分後に 2 回洗うことで残存したスキルス胃がん細胞の数を蛍光によって定量化すると、線維芽細胞をあらかじめ蒔いておかない場合に比べ著しく残存細胞が増えることがわかった。高分化型胃がん細胞を用いた場合にはこのような接着能の差がみられないことから、スキルス胃がん特有の線維芽細胞との直接相互作用を反映している可能性が高いと考え、この系での化合物・モノクローナル抗体の検索を開始した。

スキルス胃がん細胞と間質線維芽細胞の直接的な相互作用を評価するハイスループットスクリーニング系を確立する目的で、まずスキルス胃癌細胞株 44As3 と高分化型胃癌細胞株 MKN74 にレンチウイルスベクターにより GFP 遺伝子を導入し、安定形質発現株を樹立した(44As3-GFP、MKN74-GFP)。同様に、スキルス胃癌由来間質線維芽細胞 CaF37 に Tomato 遺伝子を導入した(CaF37-Tomato)。CaF37-Tomato を 96 ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるよう培養した。その CaF37-Tomato 上に 44As3-GFP 及び MKN74-GFP を播種し、一定時間培養した後に洗浄し、CaF37-Tomato に接着して残った 44As3-GFP 及び MKN74-GFP の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。このアッセイ系を用いて実験の条件検討を行い、最適な細胞数、培養時間、洗浄の条件を決定した結果、44As3-GFP の蛍光強度が MKN74-GFP の 10 倍程度高くなった。また他のスキルス胃癌細胞を用いた場合にも同様の結果が得られた。従ってこのアッセイ系により、スキルス胃癌細胞に特有な線維芽細胞との接着能を検出することが可能となった。

そこで藤田保健衛生大学の黒澤博士らが作成した、スキルス胃癌を含む胃癌細胞株の細胞表面に結合する数百種類のファージ抗体クローンを用いて阻害抗体の探索を試みた。各ファージを感染させた大腸菌培養上清を用いて、上記接着アッセイを行ったが、大腸菌培養液が非特異的に両細胞間の接着を阻害したため、このアプローチではスクリーニングが困難であることが分かった。そのため、特に両細胞間の接着部位を認識するファージ抗体クローンを細胞染色により選択することを試みた。これまでに著しく強い染色強度を持つ抗体は得られていないが、候補となる弱陽性のクローンについてはヒト IgG 化を行い、精製した IgG 抗体を用いて機能の再評価を進めている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 5 件)

1. Miyazaki M, Otomo R, Matsushima-Hibiya Y, Suzuki H, Nakajima A, Abe N, Tomiyama A, Ichimura K, Matsuda K, Watanabe T, Ochiya T, Nakagama H, Sakai R, Enari M. (査読あり) The p53 activator overcomes resistance to ALK inhibitors by regulating p53-target selectivity in ALK-driven neuroblastomas. *Cell Death Discov.* 4 : 56, 2018. doi: 10.1038/s41420-018-0059-0.
2. Miyamoto S, Nagamura Y, Nakabo A, Okabe A, Yanagihara K, Fukami K, Sakai R, Yamaguchi H. Aberrant alternative splicing of RHOA is associated with loss of its expression and activity in diffuse-type gastric carcinoma cells. (査読あり) *Biochem Biophys Res Commun.* 495(2):1942-1947, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.067.
3. Yamamoto Y, Tomiyama A, Sasaki N, Yamaguchi H, Shirakihara T, Nakashima K, Kumagai K, Takeuchi S, Toyooka T, Otani N, Wada K, Narita Y, Ichimura K, Sakai R, Namba H, Mori K. Intracellular cholesterol level regulates sensitivity of glioblastoma cells against temozolomide-induced cell death by modulation of caspase-8 activation via death receptor 5-accumulation and activation in the plasma membrane lipid raft. (査読あり) *Biochem Biophys Res Commun.* 495(1) : 1292-1299, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.113.

4. Yamaguchi H, Ito Y, Miura N, Nagamura Y, Nakabo A, Fukami K, Honda K, Sakai R. Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells. (査読あり) *Eur J Cell Biol.* 96(7) : 685-694, 2017. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.07.005.
5. Nakashima K, Uekita T, Yano S, Kikuchi JI, Nakanishi R, Sakamoto N, Fukumoto K, Nomoto A, Kawamoto K, Shibahara T, Yamaguchi H, Sakai R. Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKC pathway reduces tumor metastasis and proliferation. (査読あり) *Cancer Sci.* : 108(5):1049-1057, 2017. doi: 10.1111/cas.13218.

(学会発表)(計 13 件)

1. Shirakihara T, Sakai R. Identification and functional analysis of FGFR2 binding proteins in diffuse-type gastric carcinoma. AACR Annual Meeting 2019(国際学会), 2019 年
2. Shirakihara T, Sakai R. Identification and functional analysis of FGFR2 binding proteins in scirrhous gastric cancer. 11th AACR-JCA Joint Conference : Breakthrough in Cancer Research (国際学会), 2019 年
3. 白木原琢哉、堺隆一:スキルス胃がんの進展に関わる FGFR2 結合タンパク質の探索と機能解析. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年
4. 宮本真吾、中坊彩花、深見希代子、柳原五吉、堺隆一、山口英樹:びまん性胃がんにおける RhoA のスプライシング異常とそれに伴う発現及び活性の低下. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年
5. 白木原琢哉、堺隆一:スキルス胃がんの進展に寄与する FGF 受容体結合タンパク質の探索と機能解析. 第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会、2018 年
6. 宮本真吾、堺隆一、山口英樹:スキルス胃がんと間質線維芽細胞の直接的な相互作用に関わる分子機構の解明. 第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会、2018 年
7. 白木原琢哉、堺隆一:スキルス胃がんの悪性化に関わる受容体チロシンキナーゼ標的タンパク質の探索と機能解析. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
8. 山口英樹、富山新太、堺隆一:スキルス胃癌細胞における SHP2 の機能解析. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
9. 山口英樹、堺隆一:スキルス胃癌細胞の増殖及び浸潤転移における SHP2 の機能解析. 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年
10. 山口英樹、柳原五吉、八代正和、堺隆一: Interaction between carcinoma cells and stromal fibroblasts during invasion and metastasis of scirrhous gastric carcinoma. 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
11. 山口英樹、白木原琢哉、堺隆一:スキルス胃がんにおける新規チロシンリン酸化タンパク質 PLEKHA5 の機能解析. 第 76 回日本癌学会学術総会、2016 年
12. 白木原琢哉、山口英樹、堺隆一:スキルス胃がんにおける活性化受容体型チロシンキナーゼ結合蛋白質の同定と機能解析. 第 76 回日本癌学会学術総会、2016 年

13. 山口英樹、白木原琢哉、堺隆一: スキルス胃がん細胞における PLEKHA5 の機能解析.
第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会、2016 年

(図書)(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 山口 英樹

ローマ字氏名: Yamaguchi Hideki

所属研究機関名: 公益財団法人佐々木研究所

部局名: 附属研究所

職名: 部長

研究者番号(8桁): 10345035

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 黒澤 仁

ローマ字氏名: Kurosawa Gene

研究協力者氏名: 白木原 琢哉

ローマ字氏名: Shirakihara Takuya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。