

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：72609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14622

研究課題名(和文)多色蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種の腫瘍不均一性の解明

研究課題名(英文)Analysis of tumor heterogeneity in peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma by multi-color fluorescent imaging

研究代表者

山口 英樹(Yamaguchi, Hideki)

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・部長(移行)

研究者番号：10345035

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):スキルス胃癌は間質増生、びまん性浸潤、腹膜播種性転移を特徴とする予後不良の難治癌である。本研究では、多色蛍光イメージングによりスキルス胃癌腹膜播種巣の腫瘍不均一性を明らかにすることを目的とした。まずRGBマーキング法を用いて、個々のスキルス胃癌細胞を異なる蛍光色でラベルした。この細胞をヌードマウスに移植し、腹膜播種巣の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、全ての腹膜播種腫瘍は単一の蛍光色ではなく、複数の蛍光色を示した。従って、スキルス胃癌の腹膜播種巣はクローンではなく、複数の細胞集団から形成されることが示唆された。

研究成果の概要(英文):Scirrhous gastric carcinoma (SGC) rapidly and diffusively infiltrates in the gastric submucosa and frequently causes peritoneal dissemination. To understand the process of SGC peritoneal dissemination, we investigated heterogeneity/clonality of peritoneal tumors by multicolor fluorescent imaging. SGC cells were clonally and fluorescently marked by RGB marking method for cell lineage tracking. RGB-marked cells were i.p. or orthotopically injected into nude mice and peritoneal tumors were analyzed by fluorescent microscopy. As a result, each of the peritoneal tumors displayed multiple colors, demonstrating that they were comprised of multiclonal and heterogenous cell populations.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：スキルス胃癌 腹膜播種 蛍光イメージング 腫瘍不均一性

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃癌は間質増生、びまん性浸潤、腹膜播種性転移を特徴とする予後不良の難治癌である。特に腹腔内に種を播く様に転移する腹膜播種は患者の予後と QOL を悪化させる最も大きな要因である。しかし有効な治療法は無く、その形成過程や分子機構は明らかになっていない。

近年、腫瘍は異なる性質を持つ細胞集団(クローン)から成る、また原発巣や転移巣などの臓器間で性質が異なるという「腫瘍不均一性」が注目され、分子標的治療薬に対する抵抗性の主因であると考えられている。腫瘍不均一性の解析には腫瘍組織のゲノムシーケンシングが用いられるが、個々の細胞や腫瘍を大量に解析することが困難である。また関連する遺伝子異常等を厳密に評価するシステムは存在しない。

申請者らは Met や Src の阻害剤がマウスモデルにおいてスキルス胃癌の腹膜播種を抑制することを最報告した (Yamaguchi et al., Cancer Sci 2014; PLOS One 2014; Cancers 2015)。興味深いことに、Src 阻害剤は腸間膜転移を顕著に抑制したが、大網への転移には効果が無かった (Yamaguchi et al., Cancer Sci 2014)。つまり腹膜播種で形成された腫瘍は転移部位により異なる性質を持つことが示唆されたが、その不均一性は全く不明である。従って腹膜播種巣の不均一性の解明は、スキルス胃癌の腹膜播種機構の理解と分子標的薬の臨床応用において極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、個々のスキルス胃癌細胞を異なる色で蛍光ラベルしてマウスに移植し、多色蛍光イメージングにより腹膜播種巣を解析することで腫瘍不均一性を明らかにすること、さらに遺伝子発現解析や評価モデルの作成により腫瘍不均一性や治療抵抗性を生ずる分子機構を解明することを目的とした。

腹膜播種巣や腹水遊離細胞が均一あるいは不均一な細胞集団から成るか、転移部位により違いがあるか、腹膜播種の進行に伴いどのように変化するか明らかにする。

分子標的薬剤を投与して、腫瘍の縮小や再発に伴う細胞集団の均一性の変化を明らかにする。

個々の細胞集団を、ラベルした蛍光色により FACS で分離し、遺伝子発現解析などから不均一性を生じる分子機構を明らかにする。

人為的に遺伝子改変をしたクローンをそれぞれ異なる蛍光色でラベルし、混合してマウスに移植することで腫瘍不均一性の評価モデルを作成する。

3. 研究の方法

本研究ではスキルス胃癌細胞株である 44As3 細胞及び 58As9 細胞を主に用いて実験

を行う。両細胞株はヌードマウスへの同所移植あるいは腹腔内移植により数週間で腹膜播種を起こし、形成された腫瘍はヒトスキルス胃癌の組織型を強く反映する (Yanagihara et al., Cancer Sci 2005; Cancer Res 2006)。

多色蛍光ラベルしたスキルス胃癌細胞株の樹立を行う。44As3 及び 58As9 細胞に、Brainbow プラスミドをリポフェクション法あるいはウィルスベクターにより導入して薬剤選択を行い、安定形質発現株を樹立する。次に Cre リコンビナーゼを一過性に発現させ、蛍光タンパク質遺伝子のランダムな組換えを誘導し、多色蛍光ラベルされた細胞株を樹立する。得られた細胞を限外希釈法によりクローニングして継代を繰り返し、各細胞が長期間安定して、異なる組み合わせの蛍光タンパク質を発現することを確認する。

多色蛍光ラベルした細胞を用いて、腹膜播種巣の腫瘍不均一性の解析を行う。ヌードマウスの胃壁へ同所移植、あるいは腹腔内へ異所移植し、腹膜播種と腹水貯留を誘導する。マウスを解剖し、大網、横隔膜、腸間膜、壁側腹膜などに形成された腹膜播種巣の凍結切片を作製して共焦点レーザー顕微鏡観察を行う。腹水、他の腹腔内臓器(肝臓、腸)の転移巣、同所移植の場合には胃壁原発巣についても同様の解析を行う。またこれらの解析を移植後経日的に行い、腹膜播種の進行に伴う細胞集団の変化も解析する。この方法により、腹膜播種巣が単一の蛍光を呈する均一な、あるいは複数の蛍光を呈する不均一な細胞集団から成るか、それが腹膜播種の進行に伴いどのように変化するかを明らかにする。

分子標的治療薬投与による腫瘍不均一性の変化の解析を行う。と同様にヌードマウスへの移植を行い、Src 阻害剤 (Saracatinib、Dasatinib) や Met 阻害剤 (Crizotinib、PHA-665752) を週 3 回腹腔内投与する。数週間後にマウスを解剖してと同様の解析を行う。また阻害剤投与後に一部のマウスをそのまま飼育して再発を誘導し、再発腫瘍の不均一性を解析する。治療や再発にともない細胞集団がどのように変化するか明らかにする。

腹膜播種における腫瘍不均一性の分子基盤の解析と評価モデルの作成を行う。腹膜播種の進行や分子標的薬剤処理後の再発に伴い、あるいは転移部位により異なる細胞集団が出現した場合には、FACS により分離を行い、DNA マイクロアレイ解析により親株や他の細胞集団との遺伝発現パターンの比較を行う。各細胞集団にどのような遺伝子レベルでの変化が見られるか明らかにし、不均一性に関わる遺伝子を探索する。必要があれば、他のオミックス解析(ゲノム、プロテオーム)等も検討する。さらに、多色蛍光ラベルしたスキルス胃癌細胞を FACS により個々の蛍光色を持つ集団に分離する。困難な場合には様々な蛍光色を持つ蛍光タンパク質 (mTFP1、EGFP、mVenus、mOrange、mCherry、tdTomato 等) を

発現する細胞株を樹立する。各集団において不均一性に関わると考えられる遺伝子の過剰発現、shRNA による発現抑制、あるいは CRISPR/Cas9 システムを用いた変異導入やノックアウトを行う。様々な組み合わせで各細胞集団を混合してマウスに移植し、腹膜播種の不均一性や薬剤耐性に対する影響を検討する。

4. 研究成果

まず、スキルス胃癌細胞の多重蛍光ラベルを行った。当初は、遺伝子組み換え技術によりランダムに蛍光タンパク質が発現する Brainbow システムを用いる予定であった。しかし実験を行った結果、遺伝子導入効率などの問題によりラベルが困難であることが分かった。そこで次に、RGB マーキングという手法を試みた。スキルス胃癌細胞に、赤、緑、青の蛍光タンパク質を発現するレンチウイルスを同時に感染させた。その結果、各遺伝子の導入効率や発現効率の違いによりランダムに各蛍光タンパク質が発現するため、個々の細胞を異なる蛍光色で遺伝学的にラベルすることに成功した。これらの細胞をヌードマウスの腹腔内へ移植し、腸間膜、大網など形成された腹膜播種巣の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、調べた全ての腫瘍は単一の蛍光色ではなく、複数の蛍光色を示していた。従って、スキルス胃癌の腹膜播種巣はクローンではなく、複数の細胞集団からなる腫瘍不均一性を持つことが示された。

現在さらに、マウス腹膜播種モデルを用いて腫瘍不均一性の解析を進めている。腹膜播種巣の転移部位により腫瘍不均一性に違いがあるか、腹膜播種の進行に伴いどのように変化するか検討を行っている。また分子標的薬剤を投与して、腫瘍の縮小や再発に伴う細胞集団の不均一性の変化を解析する予定である。一方、特徴的な細胞集団が認められた場合には、ラベルした蛍光色により FACS でその細胞集団を分離し、遺伝子発現解析などから不均一性を生じる分子機構を明らかにする。さらに人為的に遺伝子改変をしたクローンをそれぞれ異なる蛍光色でラベルし、混合してマウスに移植することで腫瘍不均一性の評価モデルを作成することを目指す。

本研究により得られた成果は、スキルス胃癌の腹膜播種巣の不均一性を明らかにした点で意義が深く、スキルス胃癌の進展、腹膜播種機構の解明や今後の治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。

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 5 件)

Yamaguchi S, Fujii T, Izumi Y, Fukumura Y, Han M, Yamaguchi H, Akita T, Yamashita

C, Kato S, and Sekiya T: Identification and characterization of a novel adenomatous polyposis coli mutation in adult pancreatoblastoma. *Oncotarget* 9: 10818-10827 (2018). 査読有. doi: 10.18632/oncotarget.24017.

Miyamoto S, Nagamura Y, Nakabo A, Okabe A, Yanagihara K, Fukami K, Sakai R, and Yamaguchi H: Aberrant alternative splicing of RHOA is associated with loss of its expression and activity in diffuse-type gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* 495: 1942-1947 (2018). 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.067.

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, and 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. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 495: 1292-1299 (2018). 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.113.

Yamaguchi H, Ito Y, Miura N, Nagamura Y, Nakabo A, Fukami K, Honda K, and Sakai R[†]: Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* 96: 685-694 (2017). 査読有. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.07.005.

Nakashima K, Uekita T, Yano S, Kikuchi J, Nakanishi R, Sakamoto N, Fukumoto K, Nomoto A, Kawamoto K, Shibahara T, Yamaguchi H, and Sakai R: Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKC pathway reduces tumor metastasis and proliferation. *Cancer Sci.* 108: 1049-1057 (2017). 査読有. doi: 10.1111/cas.13218.

〔学会発表〕(計 7 件)

中坊彩花、深見希代子、山口英樹：マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌転移過程の解析 .2017 年度生命科学系学会合同年次大会 . 2017 年 .

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 回癌学会学術総会 . 2017 年 .

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 .

中坊彩花、深見希代子、山口英樹：マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌の腫瘍不均一性と転移機構の解析 . 第 69

回日本細胞生物学会大会．2017年．

山口英樹、白木原琢也、堺隆一：スキルス胃癌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 75 回癌学会学術総会．2016 年．

山口英樹、富山新太、堺隆一：膜輸送による腫瘍形成とがん悪性化の制御．第 89 回日本生化学会大会．2016 年．

山口英樹、白木原琢也、堺隆一：スキルス胃癌細胞における 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)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

山口 英樹 (YAMAGUCHI, Hideki)

公益財団法人佐々木研究所・附属佐々木研究所佐々木研究所・腫瘍細胞研究部・部長

研究者番号： 10345035

(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

齋藤 瑛美 (SAITO, Emi)

岡部 聡之 (OKABE, Akira)

小坂井 瑠璃 (KOSAKAI, Ruri)