

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15598

研究課題名(和文)大腸癌細胞クラスター形成機構の解明と新規抗癌転移治療法への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the colon cancer cell cluster formation mechanism and application to novel anti-cancer metastasis treatment

研究代表者

五藤 倫敏 (Goto, Michitoshi)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50445532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：患者大腸癌PDXにおける多くの大腸癌細胞はE-cadherin強陽性の上皮系の表現型を呈していた。一方、E-cadherinlow ZEB1highの上皮系と間葉系の両方の表現型を持った上皮系/間葉系タイプの癌細胞も検出された。PDXマウスの末梢血中に上皮系/間葉系の表現型を呈した大腸癌細胞集合体が検出された。E-cadherinあるいはZEB1のshRNAによる発現抑制が、ヒト大腸癌細胞オルガノイドのマウスにおける転移形成能を有意に抑制した。以上より、上皮系および上皮系/間葉系の性質をもった患者大腸癌細胞集団が転移形成能に必須であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単一癌細胞あるいは癌細胞集団のどちらが浸潤して遠隔臓器に転移を形成するのかが不明である。またそのメカニズムも不明である。申請者は、多くの患者大腸癌はEMTを介することなく、細胞-細胞接着を有した癌細胞集合体を形成し、浸潤し転移形成に寄与していることを明らかにした。申請研究では、現行の普遍的に重要であると認知されているEMTという概念を打ち破り、それに代わる斬新的な着眼点として、癌細胞が集合体を形成することが、細胞死抵抗性を高め、転移巣形成を容易にしていると推測している。この研究が、今後の癌細胞集合体形成やこれらの浸潤・転移を抑制するような薬剤の開発の助けるなれば幸いである。

研究成果の概要(英文)：Most colorectal cancer cells in patients with colorectal cancer PDX exhibited a strong E-cadherin-positive epithelial phenotype. On the other hand, epithelial / mesenchymal type cancer cells having both epithelial and mesenchymal phenotypes of E-cadherinlow ZEB1 high were also detected. Colon cancer cell aggregates with epithelial / mesenchymal phenotype were detected in the peripheral blood of PDX mice. Suppression of E-cadherin or ZEB1 expression by shRNA significantly suppressed the ability of human colon cancer cell organoids to form metastases in mice. From the above, it was revealed that the colon cancer cell population of patients having epithelial and epithelial / mesenchymal properties are essential for metastatic ability.

研究分野：癌生物学

キーワード：患者大腸癌 PDX 癌細胞集合体 浸潤・転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌上皮細胞が epithelial-mesenchymal transition (EMT) により間葉系の細胞に分化することにより、細胞間の接着能が低下し、癌細胞が周辺組織により浸潤し易くなる。さらに EMT 関連転写因子の強制発現を基にした主に in vitro 実験系の結果より、EMT 仮説は、癌浸潤・転移様式を理解する上で広く受け入れられている。しかしながら患者癌組織における EMT の存在は病理組織学的に確認が困難である。一方、癌細胞クラスターが細胞-細胞接着能を有したまま上皮系の形態を維持し、播種・転移することが最近重要視されている。今後は EMT およびクラスター形成をきたした癌細胞が転移に寄与しているか、患者癌を使用した動物モデルでの証明が必要である。

2. 研究の目的

癌上皮細胞が EMT を介して単一細胞化し浸潤・転移能を獲得するのか (EMT 仮説)、あるいは癌細胞が細胞-細胞接着能を有した細胞集団 (クラスター) を形成し浸潤・転移形成に寄与するのか論争中である。EMT 仮説が現状では普及されているが、患者癌組織において EMT の存在は懐疑的でありかつ EMT を介した単一細胞が転移形成に寄与する直接的証拠はない。本研究では外科的に切除された患者大腸癌組織を使用し、patient-derived tumor xenograft (PDX) モデルを樹立し、癌細胞クラスター形成が転移に必須であるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

外科的に切除された患者大腸癌組織を使用し、PDX モデルを樹立する。原発巣、血中循環癌細胞や転移巣の癌細胞の特性を調査する為、上皮系のマーカーである E-cadherin および間葉系マーカーである ZEB1 に対する抗体を使用した免疫組織染色を施行した。また、癌細胞が単細胞あるいは集合体で浸潤・転移するか否かを調査するために、血中循環癌細胞の形状を調査した。さらに、上皮系あるいは間葉系の形態が癌細胞の転移形成に必須であるか否かを調査するための機能機能解析を、PDX 由来大腸癌オルガノイドを使用することにより施行した。

4. 研究成果

癌細胞が単一細胞で浸潤し転移するのか？あるいは癌細胞集団が浸潤・転移に寄与するのか？は明らかになっていない。また EMT を起こした間葉系の癌細胞が浸潤・転移に寄与するのか？あるいは上皮系の癌細胞が浸潤・転移に寄与するのか？も不明確である。過去の多くの研究は研究室内で長期に培養された癌細胞株を使用することにより、EMT を起こした単一の癌細胞が浸潤・転移に寄与することを示唆した。しかしながら、マウスに自発的に作製された癌やヒトの癌では完全型 EMT の存在は否定的である。本研究では、患者大腸癌組織由来の PDX モデルおよび大腸癌オルガノイドを使用して上記の質問を明らかにすることを意図した。この研究が、今後の癌細胞集合体形成やこれらの浸潤・転移を抑制するような薬剤の開発の一助になれば幸いである。

- i) 順天堂大学下部消化管外科で手術により切除された患者大腸癌組織40例を高度免疫不全マウスに皮下および同所に移植した。40例中13例で同所移植により継代可能な PDXモデルの樹立が成功した。

- ii) 13例中8例のPDXマウスで肝臓および肺への自発的な転移が観察された。
- iii) 患者大腸癌とPDXにおける大腸癌組織は形態的に極めて類似していた。免疫組織染色による解析において、多くの大腸癌細胞はE-cadherin強陽性の上皮系の表現型を呈していた。一方、E-cadherin^{low}ZEB1^{high}の上皮系と間葉系の両方の表現型（中間型上皮間葉移行）を持った上皮系/間葉系タイプの癌細胞も検出された。
- iv) PDXマウスの末梢血中に上皮系/間葉系の表現型を呈した大腸癌細胞集合体が検出されたことより、大腸癌細胞集合体が転移形成に寄与する可能性が示唆された。
- v) 単一癌細胞より癌細胞集合体により顕著に転移形成に寄与していることをPDXマウスを用いた数理モデル解析にて明らかにした。
- vi) ヒト大腸癌細胞オルガノイドを免疫不全マウスの脾臓に注入後の肝臓に形成される転移を調査した。ZEB1陽性癌細胞が転移巣に生着し、コロニーを形成する過程で、ZEB1の発現レベルは徐々に低下し、上皮系の性質の癌細胞に変化することが確認された。この結果は、転移巣では間葉上皮移行を介して癌細胞が転移コロニーの形成能を促進していることを示唆した。
- vii) E-cadherinあるいはZEB1のshRNAによる発現抑制が、ヒト大腸癌細胞オルガノイドの転移形成能を有意に抑制したことより、上皮系および上皮系/間葉系の性質が患者大腸癌細胞集団の転移形成能に必須であることが明らかになった。

以上の研究結果より、患者大腸癌は単一細胞ではなく、癌細胞集合体を形成することにより効率的に転移を形成することができる。そして、上皮系および上皮系/間葉系の性質が大腸癌細胞集合体が遠隔臓器に転移を形成するために必須であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mizukoshi K, Okazawa Y, Haeno H, Koyama Y, Sulidan K, Komiyama H, Saeki H, Ohtsuji N, Ito Y, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, * Orimo A.*	4. 巻 146
2. 論文標題 Metastatic seeding of human colon cancer cell clusters expressing the hybrid epithelial/mesenchymal state.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer,	6. 最初と最後の頁 2547-2562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okazawa Y, Mizukoshi K, Koyama Y, Okubo S, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A	4. 巻 14
2. 論文標題 High-sensitivity Detection of Micrometastases Generated by GFP Lentivirus-transduced Organoids Cultured from a Patient-derived Colon Tumor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of visualized experiments : JoVE	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/57374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi M, Niitsu H, Sakamoto K, Hinoi T, Hattori M, Goto M, Bando H, Hazama S, Maeda K, Okita K, Horie H, Watanabe M; Japan Society of Laparoscopic Colorectal Surgery.	4. 巻 11
2. 論文標題 Survival benefit of lymph node dissection in surgery for colon cancer in elderly patients: A multicenter propensity score-matched study in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian J Endosc Surg.	6. 最初と最後の頁 346-354.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.12474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishiyama S, Sakamoto K, Kamiyama H, Niwa K, Sugimoto K, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y	4. 巻 63
2. 論文標題 Salivary chromogranin a as a psychosomatic stress marker is suppressed in laparoscopic surgery compared with open surgery for colon cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) Juntendo Medical Journal	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto K, Sakamoto K, Ichikawa R, Kure K, Honjo K, Ro H, Takahashi R, Kawano, Niwa K, Ishiyama S, Kamiyama H, Komiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Ishibiki Y, Tomiki Y	4. 巻 63
2. 論文標題 Propensity score analysis in the comparison of long-term outcomes for locally advanced colon cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 264-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14789/jmj.63.264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi M, Niitsu H, Sakamoto K, Hinoi T, Hattori M, Goto M, Bando H, Hazama S, Maeda K, Okita K, Horie H, Watanabe M; Japan Society of Laparoscopic Colorectal Surgery.	4. 巻 11
2. 論文標題 Survival benefit of lymph node dissection in surgery for colon cancer in elderly patients: A multicenter propensity score-matched study in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian J Endosc Surg	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.12474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omoto T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Orimo A, Ohnishi K, Yoshihara K, Miyauchi A, Li S, Gao L, Umemoto T, Tanaka J, Nakahara K, Takeya M, Ishida F, Kudo SE, Haraguchi S, Miyazaki T, Miyazaki A.	4. 巻 37(9)
2. 論文標題 The impact of stromal Hic-5 on the tumorigenesis of colorectal cancer through lysyl oxidase induction and stromal remodeling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1205-1219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-017-0033-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Namba Y, Togo S, Tulafu M, Kadoya K, Nagahama KY, Taka H, Kaga N, Orimo A, Liu X, Takahashi K.	4. 巻 18(1):46
2. 論文標題 Combination of glycopyrronium and indacaterol inhibits carbachol-induced ERK5 signal in fibrotic processes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Respir Res	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-017-0529-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Roswall P, Bocci M, Bartoschek M, Li H, Kristiansen G, Jansson S, Lehn S, Sjölund J, Reid S, Larsson C, Eriksson P, Anderberg C, Cortez E, Saal LH, Orsmark-Pietras C, Cordero E, Haller BK, Häkkinen J, Burvenich IJG, Lim E, Orimo A, Hägglund M, Rydén L, Moch H, Scott AM, Eriksson U, Pietras K.	4. 巻 24(4)
2. 論文標題 Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited through paracrine platelet-derived growth factor-CC signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Med	6. 最初と最後の頁 463-473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ro H, Munakata S, Ueyama T, Komiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Tomiki Y, Sakamoto K	4. 巻 8
2. 論文標題 Pharmacological targeting of neutrophil serine proteases prevents lethality in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal & Digestive System	6. 最初と最後の頁 --
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2161-069X.1000551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Namba Y, Togo S, Traf M, Kadoya K, Nagahama K Y. Taka H, Kaga N, Orimo A, Liu X, Takahashi K.	4. 巻 18(1)
2. 論文標題 Combination of glycopyrronium and indacaterol suppressed carbachol-induced fibrotic responses in lung fibroblasts.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-017-0529-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Astrid E-E, Bartoschek M, Gialeli C, Okroj M, Owen S, Jirstrom K, Orimo A, Jiang W G, Pietras K, Blom A M.	4. 巻 Advance Publication
2. 論文標題 Complement inhibitor CSMD1 acts as tumor suppressor in human breast cancer.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chrysostomi Gialeli, Astrid Escudero-Esparza, Michael Bartoschek, Matthias Mergelin, Petter Storm, Marcin Okroj, Sioned Owen, Karin Jirstrom, Akira Orimo, Wen G. Jiang, Kristian Pietras, Anna M. Blom	4. 巻 221 (10)
2. 論文標題 Complement inhibitor CSMD1 acts as tumor suppressor in human breast cancer.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2016.06.072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 水越幸輔、岡澤 裕、波江野洋、小山 侑、大久保捷奇、Kaidiliavi Sulidan、伊藤恭彦、小見山、光、杉本起一、小島 豊、五藤倫敏、垣生園子、樋野興夫、折茂 彰、坂本一博
2. 発表標題 患者大腸癌細胞集団の中間型上皮間葉移行を介した浸潤・転移機構
3. 学会等名 第30回 日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡澤 裕、水越 幸輔、小山 侑、大久保 捷奇、Kaidiliavi Sulidan、伊藤 恭彦、小見山 博光、小島 豊、五藤 倫敏、垣生 園子、樋野 興夫、折茂 彰、坂本 一博
2. 発表標題 中間型上皮間葉移行による患者大腸癌細胞クラスターの転移への寄与
3. 学会等名 第29回 日本消化器癌発生学会総会 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawano S, Komiyama H, Goto M, Sakamoto K
2. 発表標題 Semaphorin 3C has a possibility of a new prognostic marker in colorectal cancer.
3. 学会等名 110th AACR, Washington DC, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名	Tsukamoto R, Matsuzawa M, Hagiwara T, Tsuchiya Y, Ameniya K, Motegi S, Makino Y, Kawano S, Honjo K, Kure K, Ichikawa R, Ro H, Ito S, Takahashi R, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Kamiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Fukunaga T, Kajiyama Y, Kawasaki S, Sakamoto K:
2. 発表標題	Postoperative adjuvant chemotherapy improves survival in stage II colon cancer a propensity score matching analysis.
3. 学会等名	110th AACR, Washington DC (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Tsukamoto R, Komiyama H, Hosoya M, Kure K, Okazawa Y, Mizukoshi K, Fukaya M, Sugimoto K, Kamiyama H, Tomiki Y, Sakamoto K:
2. 発表標題	Identification of a novel diagnostic marker for colon cancer through comprehensive microRNA analysis.
3. 学会等名	第76回日本癌学会学術総会 横浜
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	折茂彰
2. 発表標題	癌内線維芽細胞と癌悪性化
3. 学会等名	第836回千葉県がんセンター研究所集談会 (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	折茂彰
2. 発表標題	癌内線維芽細胞の癌悪性化機構の解明および治療標的としての展望
3. 学会等名	公益財団法人微生物化学研究会セミナー (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 Okubo S, Mezawa Y, Ito Y, Watanabe s, Hino O, Orimo A
2. 発表標題 Carcinoma-associated fibroblasts upregulate endoglin expression to mediate their activated myofibroblastic traits.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会v横浜
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akira Orimo, Yasuhiko Ito, Yoshihiro Mezawa, Kaidiliavi Sulidan, Nadila Wali1, Okio Hino, Kazuyoshi Takeda, Michiaki Hamada, Yuko Matsumura
2. 発表標題 CAFs boost mammary cancer invasion and metastasis via formation of the epithelial and mesenchymal tumor cell cluster.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshihiro Mezawa, Chikao Morimoto, Okio Hino, and Akira Orimo
2. 発表標題 Carcinoma-associated fibroblasts attenuate CD26/dipeptidyl peptidase-4 expression via activation of the TGF-β-Smad2/3pathway.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuhiko Ito, Yuko Matsumura, Yoshihiro Mezawa, Kaidiliavi Sulidan, Nadila Wali, Yasuhiko Terao, Satoru Takeda, Ko Okumura, Kazuyoshi Takeda, Okio Hino, Akira Orimo
2. 発表標題 Carcinoma-associated fibroblasts promote metastatic seeding of the highly epithelial human breast carcinoma cell cluster with a quasi-mesenchymal trait.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukaya M, Komiyama H, Sugimoto K, Kamiyama H, Sakamoto K:
2. 発表標題 Production of monoclonal antibodies against amino acid transporter SLC7A1 to develop novel therapy for colorectal cancer.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukamoto R, Komiyama H, Hosoya M, Kure K, Okazawa Y, Mizukoshi K, Fukaya M, Sugimoto K, Kamiyama H, Tomiki Y, Sakamoto K:
2. 発表標題 Identification of a novel diagnostic marker for colon cancer through comprehensive microRNA analysis.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 折茂彰・Wali Nadila, 伊藤恭彦, 日野興夫, 竹田和由, 浜田道昭, 松村優子
2. 発表標題 CAFsは細胞接着能を亢進することにより乳がん細胞の転移を促進する
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Okubo S, Mizukoshi K, Okazawa Y, Haeno H, Komiyama H, Saeki H, Ito Y, Gotou M, Watanabe S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A
2. 発表標題 Multicellular tumor clusters seed metastases in colon patient-derived tumor xenografts
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

順天堂大学大学院 下部消化管外科学 (消化器外科学講座)
<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labokabusyoukakan/>
順天堂大学大学院 下部消化管外科学
<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labokabusyoukakan/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小見山 博光 (komiyama mitsuaki) (30348982)	順天堂大学・医学部・非常勤講師 (32620)	
研究分担者	折茂 彰 (orimo akira) (70275866)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (32620)	