

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15786

研究課題名(和文) ヒト循環内腫瘍細胞の培養法の開発

研究課題名(英文) Preliminary investigation of optimal cell culture condition of circulating tumor cells

研究代表者

齋藤 正夫 (SAITOH, Masao)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90345041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞におけるEMT(partial EMT)はCTCの発生などに関与している。そこで、EMTを誘導した様々ながん細胞を用い、コラーゲンを浸潤し、アノキス抵抗性や、細胞培養プレートの底面に再付着する性質を持つ細胞を検討した。ある遺伝子を乳癌細胞に強制発現したところ、浸潤能の亢進と、アノキス耐性能の獲得を、研究代表者らが開発した実験系で確認した。この細胞は効率良くEMTが誘導されており、現在も引き続きin vitroとマウスの実験系での検証を続けている。

研究成果の概要(英文)：During EMT in cancer progression, cancer cells that originate from epithelial cells exhibit both mesenchymal and epithelial characteristics, known as partial EMT. Partial EMT in cancer cells is thought to enhance their invasive properties, generate circulating tumor cells(CTC) and cancer stem cells, and promote resistance to anti-cancer drugs. We found that partial EMT is dramatically in cancer cells by overexpression of a certain gene (geneX). The cancer cells undergoing partial EMT promote invasive properties and resistance to anoikis as determined by equipments developed by us. Thus, we are further investigating the roles of the cells in CTC by in vitro experiments and mouse in vivo models.

研究分野：がん生物学

キーワード：EMT CTC TGF-beta

### 1. 研究開始当初の背景

**EMT(Epithelial mesenchymal transition:** 上皮間葉転換)は1980年代はじめに発生学で提唱された概念であり、がん細胞を悪性度の高い低(未)分化型やがん幹細胞への分化転換機構として、近年非常に注目されている。近年、がん細胞の浸潤や抗がん剤耐性などの悪性度獲得に EMT のメカニズムが利用されていることも明らかとなっている。研究代表者は、がん細胞における EMT に **TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ )**が関与していることを明らかとし、がん細胞に対する腫瘍促進因子としての **TGF- $\beta$** の作用を報告した。以降、**TGF- $\beta$** が誘導する EMT の分子機構に着目し、**Snail** や **ZEB1/2** などの転写因子の機能ならびに **ESRP** による選択的スプライシング制御の重要性を明らかにし、さらにこれらの分子制御薬剤の有効性を治療法開発の観点から明らかにし、**TGF- $\beta$** ががん細胞における EMT を強力に惹起し、さらにその分子機構を明らかにしてきた。がん細胞が転移する際には、脈管系への親友が不可欠であり、循環内腫瘍細胞(**CTC**)の単離研究も進められ、**CTC**が EMT 様の形質を獲得していることが明らかとなった。さらに、**CTC**は **TGF- $\beta$** を多量に分泌する血小板に付着して生存していることも既に明らかとなっている。しかしながら、単離した **CTC**を培養する技術が無いため、**in vitro**での機能解析ができない現状であり、それを打開する目的で本研究を遂行した。

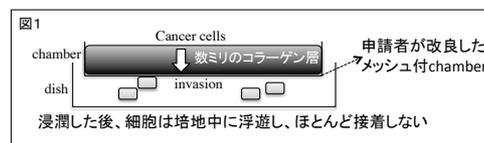
### 2. 研究の目的

近年の **CTC**に関する研究では、**CTC**が EMT を獲得していることや、**TGF- $\beta$** を多量に含む血小板と密に接していることなどが報告されている。そこで、本研究では研究代表者のこれまでの研究業績をもとに、**CTC**の **in vitro**での細胞培養法の技術を開発を第一の目的とし、その応用も試みる。樹立されたがん細胞ならびに初代培養細胞などを用い、**TGF- $\beta$** などのサイトカイン、増殖因子、**Ras**などの癌遺伝子産物によって EMT を誘導させた癌細胞をもちい、EMT 獲得の有無ならびに **CTC**の生存や細胞死などの評価に応用しながら培養法の開発・最適化を行う。がん細胞が浸潤後に脈管侵入することから「単細胞浸潤」や「集団細胞浸潤」などの近年の新たな浸潤機構と **CTC**との関連性なども **in vitro**の実験系で検討する。さらに、生存する **CTC**の細胞表面マーカー分子を検討し、**CTC**の培養法へ応用し、将来的な **CTC**の検出法・治療法への応用に発展させる。得られた結果を、マウス移植実験系やがん自然発症マウス系での **CTC**の評価に応用する。最終的に臨床検体を用いヒトの **CTC**の培養の開発に発展させる。これらを目的とし、研究を行った。

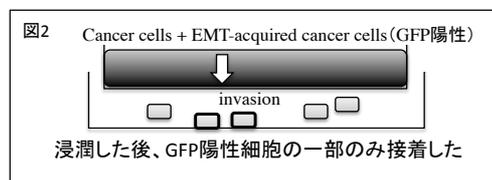
### 3. 研究の方法

(1) . 研究代表者の先行研究では、**TGF- $\beta$** が誘導する EMT の分子機構に着目し、EMT 実行転写因子の発現制御機構を詳細に解析し、さらに、EMT には RNA 結合分子 **ESRP** による選択的スプライシング制御の重要性を明らかにした。さらに癌遺伝子産物の **Ras** は **TGF- $\beta$** の腫瘍抑制作用を阻害することで癌化させることが知られていたが、ひとたび癌化した腫瘍細胞では **Ras**が **TGF- $\beta$** による EMT を相乗的に促進することを見出し、その分子機構の一端を明らかにし、また、腫瘍間質中の **TAM** (腫瘍関連マクロファージ) や **CAF** (がん関連線維芽細胞) が分泌する液性因子も **TGF- $\beta$** 誘導性 EMT を劇的に促進することを発見した。そこで、マイクロアレイ解析やエクソンアレイなどの、大規模解析を施行し、複数の EMT に係わる新規な分子を同定し、その解析をおこなった。

(2) . 通常がん細胞など運動性を評価する実験として、**invasion(migration) assay** が用いられ、これは **8.0um** の pore をもつチャンバーで行われ、その pore を通過できた細胞を **invasion** した細胞として評価する。この実験系では、EMT を獲得した細胞の様な単細胞 (**single cell**) 浸潤には適しているが、近年話題の集団細胞(**collective cell**)浸潤を評価できない。そこで独自に **70um** のメッシュ状の構造を持つチャンバーを作り (図 1) 、その実験系を検証しながら、さらに通常より数倍厚いコラーゲン層 (**3-5mm**) を用い、がん細胞浸潤の解析をおこなった。



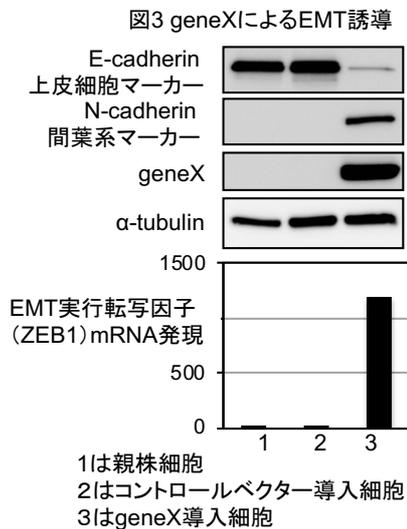
(3) . EMT を人工的に誘導させた細胞に **GFP** を、EMT を惹起させていない同種の細胞に **mcherry** などを遺伝子導入し、個別化する。これらの細胞を混入させ、細胞運動実験を行い、集団細胞(**collective cell**)浸潤の実験系を確立する。また、EMT を人工的に誘導させた細胞に **GFP** のみを用いた、単細胞 (**single cell**) 浸潤と比較しながら、浸潤した後の **dish** への付着性や **anoikis** 耐性能などを検討した。すでに、予備実験として、混入させた場合、**GFP** 陽性細胞が選択的に底面の **dish** に付着する結果を得ており (図 2) 、それをさらに検証した。



#### 4. 研究成果

(1). 複数の EMT に係わる新規な分子の機能解析に関する研究

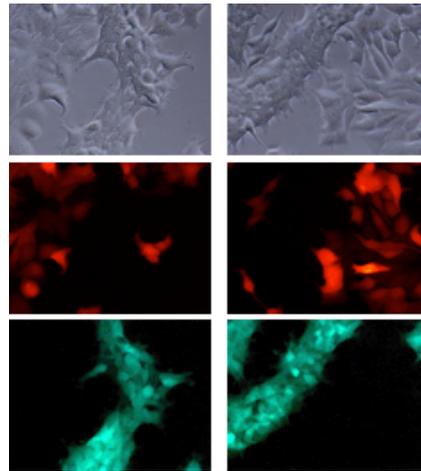
新規のマーカー分子と思われる複数の遺伝子を細胞に導入し解析したところ、その中のある1つの遺伝子 (gene X) によって、顕著な EMT が誘導 (上皮分子マーカー E-cadherin の低下と間葉系分子マーカー N-cadherin の上昇) され、EMT 実行転写因子の ZEB1/ZEB2 も劇的に上昇した (図3)。さらに EMT が観察される、E-cadherin などの上皮マーカー分子は減少し、N-cadherin などの間葉系マーカー分子は顕著に増加することもわかった。また高い運動性や抗癌剤耐性も確認され、非常に興味深いことに、細胞培養用 plate から離脱し、CTC 様に振る舞うことがわかった。さらに、細胞老化も抑制されていることも明らかとなり、geneX が顕著に EMT を誘導すると判断し、その分子機構は継続研究として実験を行っている。



(2). EMT 細胞と nonEMT 細胞の共培養 geneX を遺伝子導入し EMT 様に形質変化した細胞に GFP を導入した。また、EMT を起こしていない細胞 (non EMT 細胞) に mcherry を遺伝子導入し、それぞれをイメージングできるよう個別化した。これらの細胞を共培養したところ (図4)、一部の細胞に接着することがわかり、免疫染色法により、E-cadherin や N-cadherin などの接着分子を検討した結果、EMT 細胞には N-cadherin が結い医に染色され、non-EMT 細胞には E-cadherin は有意に染色された。既に発表された論文では、N-cadherin と E-cadherin のヘテロダイマーによる細胞間相互が報告されているが、本実験は検出が十分できなかった。さらに、コラーゲングルによる浸潤能を検討すると、GFP 陽性の EMT 細胞が non-EMT 細胞に比較し、有意に運動性が高かった。さらに、EMT 細胞はコラーゲン層から脱離し、培養液中に浮遊するような細胞

が出現し、一部の細胞は dish の底面に接着していた。一方 non EMT 細胞では、これらの所見はほとんど検出されなかった。そこで、これら2種の細胞を混合して検討したところ、GFP 陽性細胞に牽引されるように、nonEMT 細胞が培養液中に出現した。しかしながら、本実験は定量性に弱く、実験毎のバラツキが大きく、統計的な有意差を認めることができなかった。そこで、実験系を確立すべく、改良を続けている。

図4 EMT細胞 (緑) とnonEMT細胞の共培養



(3). 集団細胞 (collective cell) 浸潤と単一細胞 (single cell) 浸潤

EMT 細胞がコラーゲン内を浸潤し、最終的に浮遊することが確認されたが、細胞数が十分回収できなかった。そこで、実験系を拡大したこと、コラーゲングルの強度の限界のより実験に失敗した。

2種の細胞を共培養し、コラーゲンを固定し、固定後、染色により collective cell 浸潤を判定しようとしたところ、予想以上に細胞が少なく、共焦点顕微鏡では困難と判定した。そこで、コラーゲングルを単純に分割し、その状態で蛍光観察し、必要に応じて、染色するように試みたところ、一部に collective cell 浸潤を確認できた。現在も継続して実験を行っている

本研究から、EMT 細胞はコラーゲングル内の運動性が高く、また浸潤した細胞は、培養液中に容易に浮遊して生存している可能性を見いだした。さらに一部の細胞は培養 dish の底面に付着するようになった。しかし、nonEMT 細胞はコラーゲン内での運動性が低かった。共培養によって、nonEMT 細胞も僅かであるが、コラーゲングルを貫通し、浮遊するようであるが、EMT 細胞と異なり生存していない可能性が高かった。したがって、本研究は浸潤から CTC への移行、さらには血管への着床を in vitro で再構築できる可能性があり、さらに、様々な培地や dish のコーティングなどを工夫し、検討している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells

Ryosuke Nakamura, Hiroki Ishii, Kaori Endo, Asami Hotta, Eiji Fujii,

Keiji Miyazawa, Masao Saitoh<sup>1</sup>

PlosOne, 2018 inpress

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 正夫 (SAITOH, Masao)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号 90345041

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

坂本 啓 (SAKAMOTO, Kei)

坂本 要 (SAKAMOTO, Kaname)

中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)

堀田 麻美 (HOTTA, Asami)

古谷 智 (FURUYA, Satoshi)