

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07150

研究課題名(和文)がん細胞に集団浸潤を誘引する接触追従の機序解明と普遍性の検証

研究課題名(英文)The mechanism of contact following inducing cancer collective invasion and the verification of universality

研究代表者

芳賀 永 (Haga, Hisashi)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：00292045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多数の細胞が集団で同じ方向に移動するためには、細胞-細胞間の接着を維持しながら隣接する細胞の動きに合わせて個々の細胞が同じ方向に運動する必要がある。このことを接触追従とよぶ。本研究では、がん細胞の集団浸潤における分子機構とその普遍性について解析を行った。その結果、集団浸潤するがん細胞株であるヒト扁平上皮がん細胞(A431細胞)においては、インテグリン 1、ラミニン332、17型コラーゲンが細胞-細胞間に充填されており、ラミニン332が17型コラーゲンと結合することで安定化し、さらにそのラミニン332がインテグリン 1の活性化を促すことでがん細胞の集団浸潤が誘引されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞の浸潤に関する研究は、これまで主に単一の細胞を対象に行われてきた。一方、実際の生体内では、がん細胞は組織内を集団で浸潤することが知られている。このことを集団浸潤とよぶ。本研究は、がん細胞の接触追従という性質に着目し、集団浸潤の機序を解明することを目的に、接着タンパク質インテグリン 1に着目して、接触追従を担う分子およびシグナル経路の同定を目指した。その結果、本研究によって接触追従の機序の一端が明らかとなった。今後は、接触追従に関与するタンパク質を薬剤投与などで失活させるなどががん細胞の浸潤を抑えるための新たな創薬ターゲット、および治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Collective invasion, in which cancer cells invade as a cell population, is associated with the metastatic potential and prognosis of cancer patients. The collectiveness of cancer cells is a necessary attribute for collective invasion. However, the mechanism that causes cancer cells to form collectiveness is not currently well known. To investigate this mechanism, we focused on contact following, which is the phenomenon that instigates the movement of neighboring cells in the same direction via intercellular adhesion. In this study, we show that the intercellular expression of extracellular matrix proteins (type-XVII collagen and laminin-332) and integrin-1 promotes contact following in collective invasion. Our findings suggest that integrin-extracellular matrix interaction in the intercellular site could be a new therapeutic target for treating cancer with collective invasion potential.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞・組織 がん細胞 集団運動 接触追従 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

基質と接着するほぼ全ての細胞は運動する能力を有する。とくに、がん細胞の場合、悪性度が進むにつれて基質中を移動する能力(浸潤能)が増し、生体内を無秩序に移動し増殖することで個体の生命を脅かす。このことから、がん細胞の浸潤を抑制することは、がんの治療につながると思われる。

がん細胞の浸潤に関する研究は、これまで主に単一の細胞を対象に行われてきた。一方、実際の生体内では、がん細胞は組織内を集団で浸潤することが知られている。このことを集団浸潤とよぶ。しかし、がん細胞の集団浸潤に関する研究は、海外の数グループによる報告がある程度で、その機序についてはほとんど分かっていなかった(Wang *et al.*, *Pathol. Int.*, 2016)。

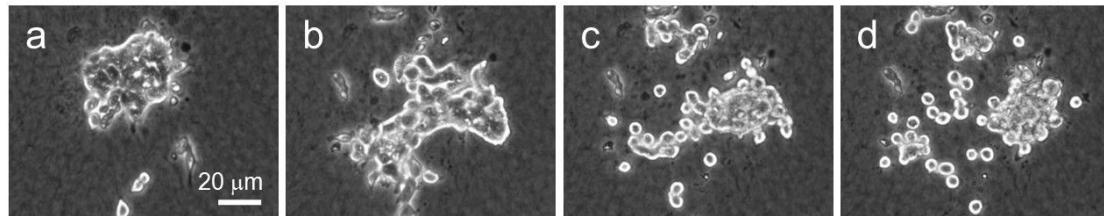
### 2. 研究の目的

多数の細胞が集団で同じ方向に移動するためには、前方に隣接する細胞の動きに同調して、同じ方向に移動する必要がある。このことを接触追従とよぶ。そこで本研究は、がん細胞の接触追従という性質に着目し、集団浸潤の機序を解明することを目的とした。具体的には、接着タンパク質インテグリン  $\beta 1$  に着目して、接触追従を担う分子およびシグナル経路の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

研究代表者はこれまでに、悪性化したがん細胞を3次元コラーゲンゲル中で培養し、がん細胞が浸潤する様子を顕微鏡下でリアルタイム観察することに成功している。なかでも、悪性化したヒト肺腺がん細胞では転写因子 ATF5 とインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  が活性化することで浸潤能が高まることを見出し、それらの阻害によって肺腺がん細胞の浸潤を著しく抑制することに成功している(S. Ishihara, *et al.*, *Oncotarget*, 2015, X. Li, *et al.*, *PLOS ONE*, 2013)。

さらに、研究代表者は、ヒト扁平上皮がん細胞株(A431細胞)の集団浸潤の観察に成功した(図1a, b)。集団浸潤するがん細胞に対し、活性阻害抗体(AIIB2)を用いてインテグリン  $\beta 1$  の活性を阻害したところ、細胞-細胞間の接着が外れ、浸潤能が低下することを発見した(図1c, d)。

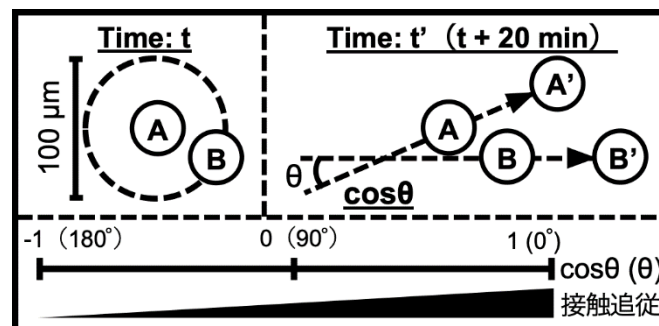


(図1 コラーゲンゲル中を集団浸潤する A431 細胞。3 時間ごとの位相差像。c で阻害剤投与)

これらの結果は従来法である2次元の培養環境では観察できなかった現象である。研究代表者が3次元培養によって生体内に近い環境を培養系で実現させたことで、細胞レベルでの集団浸潤の観察に初めて成功した。本研究では、これら技術を用いて、集団浸潤に関わる分子およびシグナル経路の同定を目指した。

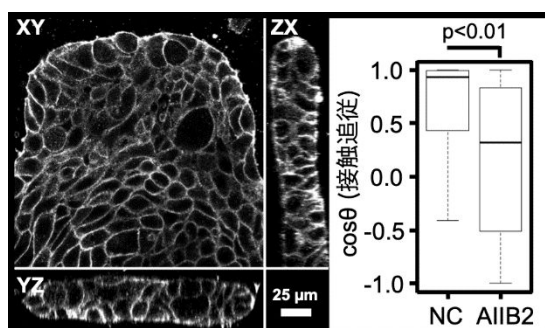
### 4. 研究成果

(1) 本研究では A431 細胞に核内局在蛍光タンパク質を発現させることで、個々の細胞の運動を追跡することに成功した。さらに接触追従を解析するための新規手法を確立した(図2)。接触追従は細胞集団において、隣接する細胞(周囲 100  $\mu\text{m}$ )の運動方向が揃っているかどうかで評価した。20分毎に画像を取得し、得られた座標から運動方向がなす角度  $\theta$  を求めた。さらに角度  $\theta$  から  $\cos\theta$  を算出した。 $\cos$  の性質より、細胞が同一方向に運動すれば  $\cos\theta$  の値は 1 に近づき、離れる方向に運動すれば  $\cos\theta$  の値は -1 に近づく。これにより、接触追従を -1 から 1 の範囲で定量することが可能となった。



(図2 集団浸潤における接触追従の解析方法)

(2) A431 細胞におけるインテグリン  $\beta 1$  の局在を免疫蛍光染色により調べた。その結果、インテグリン  $\beta 1$  は A431 細胞の細胞-細胞間に局在することが明らかとなった (図 3 左図)。さらに、接触追従におけるインテグリン  $\beta 1$  の機能を調べるために AIIB2 を投与し、接触追従について解析を行った。その結果、AIIB2 の投与により接触追従は抑制された (図 3 右図)。これらの結果から、細胞-細胞間におけるインテグリン  $\beta 1$  の活性が接触追従において必要であることが明らかとなった。

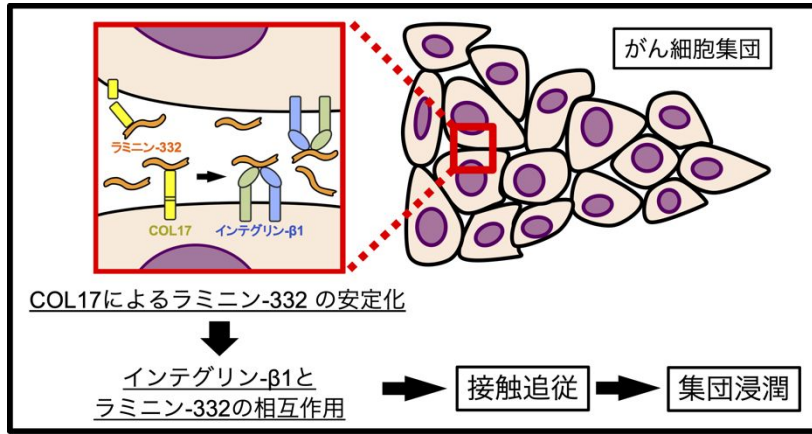


(図 3 左図：インテグリン  $\beta 1$  の局在，右図：AIIB2 投与による接触追従への影響)

(3) インテグリン  $\beta 1$  は細胞外基質 (Extracellular Matrix: ECM) の受容体である (R. Hynes, Cell, 2002)。したがって A431 細胞の細胞-細胞間には ECM が存在することが示唆された。そこで十数種類の ECM タンパク質に対して免疫蛍光染色を行ったところ、A431 細胞の細胞-細胞間にはラミニン 332 の構成分子であるラミニン  $\alpha 3$  及びラミニン  $\beta 3$ 、膜貫通型コラーゲンである 17 型コラーゲン (COL17) が局在することが明らかとなった。COL17 の細胞外ドメインは、細胞膜上のプロテアーゼによって切断されることで細胞外へと分泌される (W. Nishie, *et al.*, Am. J. Pathol., 2011)。本研究では A431 細胞が発現していることを確認した。さらに siRNA を用いた RNA 干渉法によりこれらの ECM タンパク質の発現を低下させたところ、接触追従は抑制された。これらの結果から、細胞-細胞間におけるインテグリン  $\beta 1$  と ECM タンパク質の相互作用が接触追従において必要であることが示唆された。

(4) ラミニン 332 はインテグリン  $\beta 1$  の代表的なリガンドであるが (F. Decline, *et al.*, J. Cell Sci., 2001), COL17 とインテグリン  $\beta 1$  の相互作用は不明である。そこで抗 COL17 抗体を用いた免疫沈降により、COL17 とインテグリン  $\beta 1$  が複合体を形成するかどうかを調べた。その結果、抗 COL17 抗体画分においてインテグリン  $\beta 1$  は検出されなかった。同様にラミニン 332 について調べたところ、抗 COL17 抗体画分においてラミニン 332 が検出された。したがって、COL17 とラミニン 332 は複合体を形成することが示された。これらの結果から、COL17 はラミニン 332 を介して接触追従に寄与することが示唆された。そこで COL17 を発現抑制した際の、ラミニン 332 のタンパク質量について調べた。その結果、COL17 の発現抑制によりラミニン 332 のタンパク質量は減少した。これらの結果から、COL17 はインテグリン  $\beta 1$  のリガンドであるラミニン 332 のタンパク質量を制御することにより、接触追従に寄与することが示唆された。

(5) 本研究では A431 細胞の細胞-細胞間におけるインテグリン  $\beta 1$  の活性が接触追従において必要であることを明らかにした (図 4)。さらに、細胞-細胞間にはインテグリン  $\beta 1$  のリガンドであるラミニン 332 が局在しており、ラミニン 332 の発現低下は接触追従を抑制した。これらの結果から、細胞-細胞間におけるインテグリン  $\beta 1$  とラミニン 332 の相互作用が接触追従に必要であることが示唆された。COL17 もインテグリン  $\beta 1$ 、ラミニン 332 と同様に細胞-細胞間に局在することが分かった。さらに COL17 の発現低下によりラミニン 332 のタンパク質量は減少し、接触追従は抑制された。これらの結果から、COL17 はラミニン 332 のタンパク質量を制御することで、インテグリン  $\beta 1$  とラミニン 332 の相互作用に影響し、接触追従に寄与することが示唆された。今後はこれらの ECM タンパク質が細胞-細胞間において細胞外基質として存在するかを電子顕微鏡観察により調べる。細胞外基質として存在する場合、細胞外基質が細胞-細胞間の接着を媒介している可能性がある。また細胞外基質として存在しない場合、これらの ECM タンパク質が液性因子としてインテグリン- $\beta 1$  に作用している可能性がある。その場合はインテグリン  $\beta 1$  の下流シグナル経路を明らかにする。



( 図 4 研究成果のまとめ図 )

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kumagai Yuji, Nio-Kobayashi Junko, Ishida-Ishihara Sumire, Tachibana Hiromi, Omori Ryosuke, Enomoto Atsushi, Ishihara Seiichiro, Haga Hisashi	4. 巻 514
2. 論文標題 The intercellular expression of type-XVII collagen, laminin-332, and integrin- 1 promote contact following during the collective invasion of a cancer cell population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1115 ~ 1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.058	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 Ishihara Seiichiro, Aoki Kei, Mizutani Takeomi, Amano Maho, Nishimura Shin-Ichiro, Haga Hisashi	4. 巻 43
2. 論文標題 Glycosphingolipid GM2 Induces Invasiveness in Irradiation-tolerant Lung Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 177 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.18026	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 Wang Xiaoze, Enomoto Atsushi, Weng Liang, Mizutani Yasuyuki, Abudureyimu Shaniya, Esaki Nobutoshi, Tsuyuki Yuta, Chen Chen, Mii Shinji, Asai Naoya, Haga Hisashi, Ishida Sumire, Yokota Kenji, Akiyama Masashi, Takahashi Masahide	4. 巻 109
2. 論文標題 Girdin/GIV regulates collective cancer cell migration by controlling cell adhesion and cytoskeletal organization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3643 ~ 3656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13795	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 該当する

1. 著者名 Ishihara Seiichiro, Ponik M. Suzanne, Haga Hisashi	4. 巻 28
2. 論文標題 Mesenchymal stem cells in breast cancer: response to chemical and mechanical stimuli	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncoscience	6. 最初と最後の頁 158 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncoscience.381	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 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yuji Kumagai, Junko Nio-Kobayashi, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga
2. 発表標題 The role of intercellular gaps for collective invasion in cancer cell population
3. 学会等名 第70回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Ito, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga
2. 発表標題 ascin-1 promotes breast cancer cell invasion by regulating expression of LGR5
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kumagai, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga
2. 発表標題 Activation of intercellular integrin- 1 promotes collective invasion in human squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東 祐紀, 石原 誠一郎, 芳賀 永
2. 発表標題 FSCN1-LGR5経路により誘導される乳がん細胞の浸潤機構
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kumagai, Junko Nio-Kobayashi, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga
2. 発表標題 Intercellular ECM proteins promote collective invasion in human squamous carcinoma cells through the activation of intercellular integrin- 1
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisashi Haga
2. 発表標題 Substrate stiffness enhances cancer progression through transcription factor YAP and ATF5
3. 学会等名 HU-KSMCB Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuji Kumagai, Hisashi Haga
2. 発表標題 The role of integrins in the collective invasion of human A431 squamous carcinoma cells
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 芳賀 永
2. 発表標題 メカニカルなストレスによって促進されるがん細胞の悪性化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuji Kumagai, Junko Nio-Kobayashi, Hisashi Haga
2. 発表標題 The role of integrin- 2 1 in the collective invasion of human A431 squamous carcinoma cells
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuji Kumagai, Junko Nio-Kobayashi, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga
2. 発表標題 Investigation of the cell-cell adhesion mechanism of A431 cells with collective invasive potential
3. 学会等名 5th International Life-Science Symposium
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芳賀 永
2. 発表標題 Mechanosensitive Response of Cancer and Epithelial Cells Induced by in/on Viscoelastic Substrates
3. 学会等名 The 33rd Biomechanics Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kumagai, Junko Nio-Kobayashi, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga
2. 発表標題 Integrin- 1 promotes contact following in collective invasion of squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第71回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Yuki Ito, Seiichiro Ishihara, Masayuki Kano, Hisahiro Matsubara, Hisashi Haga
2. 発表標題 FSCN1 promotes breast cancer cell invasion via expression of LGR5
3. 学会等名 第71回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷 祐二, 小林 純子, 石原 誠一郎, 芳賀 永
2. 発表標題 がん細胞の集団浸潤：接触追従における integrin- 1の機能解析
3. 学会等名 第56回 日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷 祐二, 小林 純子, 石原 誠一郎, 芳賀 永
2. 発表標題 広い細胞間隙が惹起するがん細胞の集団浸潤
3. 学会等名 第16回 日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石原 誠一郎, 芳賀 永	4. 発行年 2019年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 197
3. 書名 三次元培養における培養手法と周辺技術動向	

〔産業財産権〕

[ その他 ]

細胞ダイナミクス科学研究室  
<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3>

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	小林 純子 (仁尾純子)  (Nio-Kobayashi Junko)  (70447043)	北海道大学・医学研究院・講師    (10101)	