

令和元年6月6日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15569

研究課題名(和文) 共培養システムを用いた悪性中皮腫の胸膜進展機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of progression mechanism of malignant pleural mesothelioma using co-culture systems

研究代表者

向井 智美 (MUKAI, Satomi)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学分野・研究員

研究者番号：10706146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は主に胸膜に発症する高悪性度の腫瘍であり、壁側・臓側胸膜表面にびまん性に広がる特徴がある。腫瘍が胸膜全体に進展するメカニズムを解明するため、正常中皮細胞と、悪性中皮腫細胞の共培養を行った。様々な共培養システムを検討した結果、正常中皮細胞が優位な発がん初期段階では、正常中皮細胞が悪性中皮腫細胞の増殖促進に寄与し、その後腫瘍細胞が優位になると、正常細胞が排除されて腫瘍細胞に置き換わることが示唆された。また、悪性中皮腫細胞から放出される液性因子によって、正常中皮細胞の細胞間接着能が低下す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

近年、がん細胞と間質細胞との関連が注目されている。特に中皮細胞とがん細胞の関連については、卵巣癌や前立腺癌においてその腫瘍進展を促進させるという報告があるものの、周囲を中皮細胞に取り囲まれる悪性中皮腫についての知見は全くない。しかし本研究によって、悪性中皮腫細胞においても正常中皮細胞が腫瘍進展を促進させることが示唆された。今後さらなる解析により、その原因物質が同定されたあかつきには、それを標的とした新たな治療戦略を構築できる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma is a highly aggressive tumor that mainly develops in the pleura and diffuses on the parietal and visceral pleura. To clarify the mechanisms by which the tumor diffuses throughout the pleura, we performed co-culture of normal mesothelial cells and malignant mesothelioma. As a result of examining various co-culture systems, it was suggested that normal mesothelial cells contributed to the growth promotion of malignant mesothelioma cells in the early stage of tumorigenesis in which normal mesothelial cells dominate. It was also suggested that the predominance of tumor cells would eliminate normal cells and replace them. In addition, it was revealed that the humoral factor released from malignant mesothelioma cells reduces the intercellular adhesion molecule of normal mesothelial cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：悪性中皮腫 共培養

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

### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベストの曝露によって引き起こされる、極めて高悪性度の腫瘍である。主に、胸膜の表面に存在する中皮細胞から発生するが、腹膜や心膜の中皮細胞から発生するケースもある。アスベストの曝露から30年以上経過してから発症することが多く、患者数が年々増加しているにもかかわらず、効果的な治療法がいまだに開発されていない。また、早期発見が難しく、発見時には腫瘍が胸膜や腹膜の表面にびまん性に広がっている場合が多く、根治的的外科的手術が困難な病気である(Rudd, 2010)。

これまでに当研究室では悪性中皮腫患者より新規の悪性中皮腫細胞株30株を樹立し、遺伝子変異として、Hippo pathwayの構成因子であるNF2、LATS2の高頻度な不活化変異を見出し(Sekido *et al.*, Cancer Res. 1995; Murakami *et al.*, Cancer Res. 2011)、Hippo pathwayの不活化が悪性中皮腫の増殖・進展に大きく関わることを明らかにしてきた。また、申請者はLATS1およびLATS2がHippo pathway非依存的に細胞周期制御、染色体不安定性制御、クロマチン制御を行うことを明らかにしており、悪性中皮腫におけるLATS2の変異は、Hippo pathwayだけでなくその他のシグナル経路にも影響を与えることを予測している。その他にも、脱コピキチン化酵素のBAP1の遺伝子変異も高頻度であることを見出しているが(Hakiri *et al.*, Cancer Sci., 2015)、これらの頻度の高い遺伝子変異は全てがん抑制遺伝子であり、活性型のがん遺伝子変異の頻度は極めて低い。このため、既存のチロシンキナーゼ阻害剤などの多くはほとんど有効性を示さず、中皮腫に対する効果的な分子標的治療法は未だ確立されていない。

### 2. 研究の目的

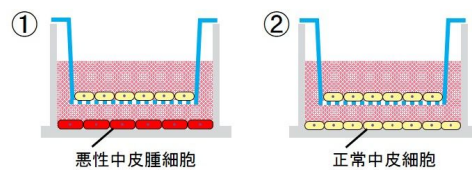
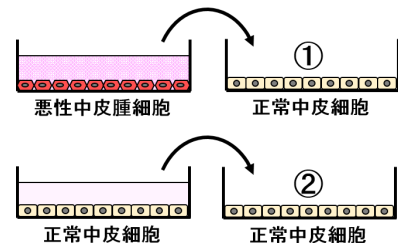
悪性胸膜中皮腫は病理組織学的分類により、上皮型、肉腫型、二相型に分けられ、その大半が上皮型であるにもかかわらず、胸膜全体へのびまん性進展が観察される。がんの進展において、微小環境の関与や周辺細胞との相互作用が注目されているが、悪性中皮腫細胞とその周辺細胞との関係は不明である。近年興味深いことに、卵巣がんにおいて、卵巣表面の中皮細胞が、卵巣がん細胞の運動能を促進することが報告された(Thibault *et al.*, 2014)。このことは、悪性中皮腫においても、正常中皮細胞が腫瘍細胞の進展に関与する可能性を示唆している。そこで、本研究では、正常中皮細胞と悪性中皮腫細胞の共培養システムを構築し、細胞間の相互作用をより詳細に解析し、悪性中皮腫が胸膜表面全体に広がる様子を細胞レベル、および分子レベルで明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 悪性中皮腫細胞と、正常中皮細胞の非接触培養

正常中皮細胞(MeT5A, HOMC-B1, HOMC-D4)にLATS2不活化悪性中皮腫細胞(Y-MESO-27)の培養上清を(右図)、比較対照として正常中皮細胞の培養上清を添加し(右図)、右図における正常中皮細胞の変化について、Hippo pathway関連因子・EMT関連因子の発現量をウエスタンブロッティングによって解析した。

同様の目的で、ポイデンチャンバーを用いた非接触培養を行った。チャンパー内に正常中皮細胞を、プレートウェルにLATS2不活化悪性中皮腫細胞を播種し(右図)、チャンパー内の正常中皮細胞の変化についてHippo pathway関連因子・EMT関連因子の発現量をウエスタンブロッティングによって解析した。比較対照として、チャンパー内、プレートウェル共に正常中皮細胞を播種したもの(右図)を用いた。



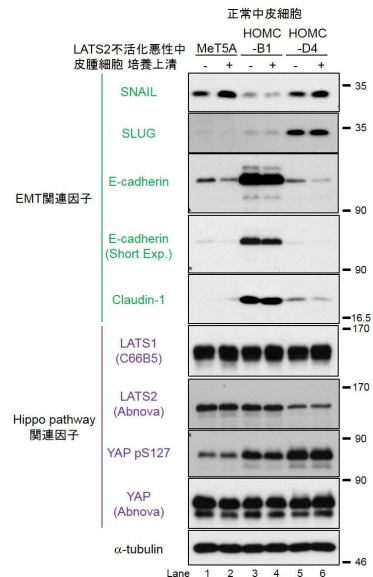
#### (2) 悪性中皮腫細胞と正常中皮細胞の接触培養 (混合培養)

2種類の細胞を混合するにあたり、正常中皮細胞をGFPで蛍光ラベルした株(GFP-正常中皮細胞)と、LATS2不活化悪性中皮腫細胞をmCherryで蛍光ラベルした株(mCherry-悪性中皮腫細胞)を樹立した。正常中皮細胞とmCherry-悪性中皮腫細胞を10:1の割合で混合培養し、mCherry-悪性中皮腫細胞の細胞形態や細胞増殖について、蛍光顕微鏡およびリアルタイム生細胞観察システムを用いて、観察した。

また、悪性中皮腫細胞とGFP-正常中皮細胞を10:1の割合で混合培養した場合についても同様に観察した。

### 4. 研究成果

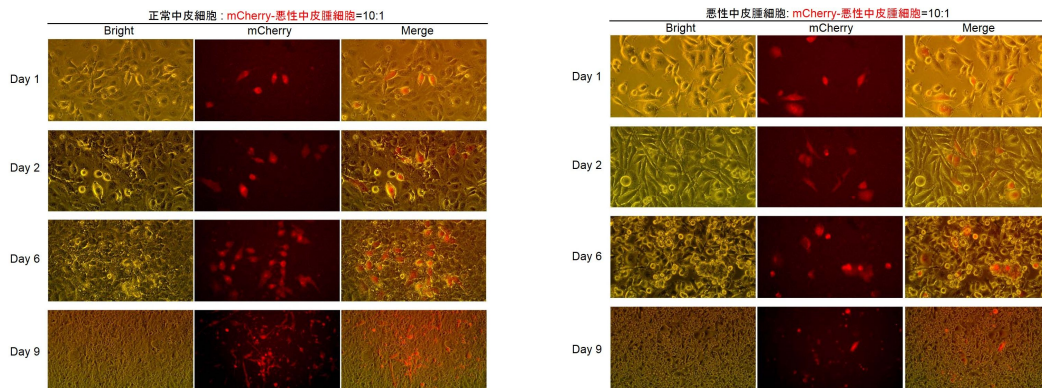
(1) 悪性中皮腫細胞と正常中皮細胞の非接触培養の結果、悪性中皮腫細胞の培養上清を正常中皮細胞 MeT5A に添加すると(右図 Lane 2)、コントロール細胞(右図 Lane 1)と比較して、EMT 関連因子のなかでも、特に SNAIL の発現が上昇し、E-cadherin の減少がみられた。一方で、Hippo pathway 関連因子にはほとんど変化は見られなかった。また HOMO-D4 細胞(右図 Lane 5,6)に関しても同様の傾向が見られた。また、HOMO-B1 細胞(右図 Lane 3,4)は E-cadherin の減少のみ確認できた。これは HOMO-B1 細胞が上皮型の性質が高く、間葉マーカーの発現がほとんど見られないことに起因すると考えている。



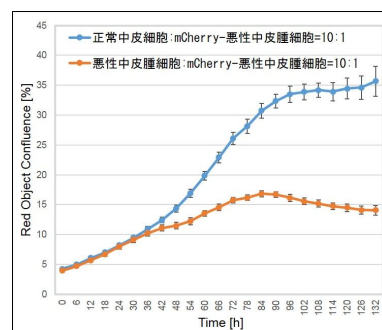
さらに、ポイデンチャンバーを用いた非接触培養においても同様の結果が得られた。

以上の結果から、悪性中皮腫細胞から放出される液性因子が、正常中皮細胞の EMT や細胞間接着に影響を及ぼす可能性が示唆された。

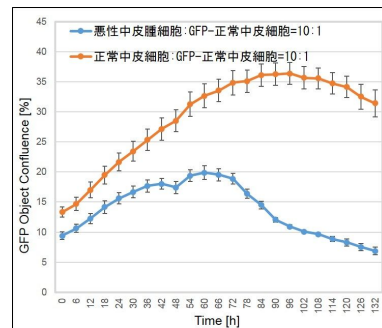
(2) 正常中皮細胞と mCherry-悪性中皮腫細胞を 10:1 の割合で混合培養したもの(下図 左)、悪性中皮腫細胞と mCherry-悪性中皮腫細胞を 10:1 で混合培養したもの(下図 右)を顕微鏡下で比較すると、混合培養開始後 6 日目および 9 日目に、正常細胞との混合培養によって mCherry-悪性中皮腫細胞の細胞増殖が亢進しているような観察結果が得られた。



この細胞増殖を定量する目的で、リアルタイム生細胞観察システムを用いた。具体的には、mCherry-悪性中皮腫細胞が観察視野中に占める割合をモニタリングし、細胞増殖を定量解析した。その結果、顕微鏡下の観察から得られていた結果と同様、正常細胞との混合培養によって mCherry-悪性中皮腫細胞の細胞増殖が経時的に亢進していく結果が得られた(右図 上)。



一方、悪性中皮腫細胞と GFP-正常中皮細胞を 10:1 で混合培養したものと、正常中皮細胞と GFP-正常中皮細胞を 10:1 で混合培養したものを、リアルタイム生細胞観察システムを用いて、細胞増殖を比較すると、悪性中皮腫細胞との混合培養によって、GFP-正常中皮細胞の細胞増殖が抑制され、やがて細胞死が誘導されているような定量結果が得られた(右図 下)。



こうした結果から、正常中皮細胞が優位な発がん初期段階では正常中皮細胞が悪性中皮腫細胞の増殖促進に寄与し、その後腫瘍細胞が優位になると、正常細胞が排除されて腫瘍細胞に置き換わることが推測される。

また、(1)の結果をふまえると、悪性中皮腫細胞から放出される液性因子によって、正常中皮細胞の運動能の上昇、もしくは細胞間接着能が低下することが考えられる。これによって、悪性中皮腫細胞自体が、正常中皮細胞の間を縫うようにして増殖範囲を広げる可能性があり、これが悪性中皮腫が胸膜全体に広がる一因かもしれない。

今後は、混合培養によって増殖能を変化させた因子の同定を行い、悪性中皮腫の進行を抑制する薬剤を目指す。

(3) 同時に、共培養に用いた、LATS2 不活化悪性中皮腫細胞における特徴的な異常について解

析を行った。これまでの報告どおり、Hippo pathway の不活化がみられる他、興味深いことに翻訳後修飾のひとつである O-GlcNAc 修飾が、正常中皮細胞や LATS2 以外の遺伝子変異を持つ悪性中皮腫細胞よりも亢進していることが明らかとなった。O-GlcNAc 修飾は近年がんにおいて亢進することが報告されており、その生理的意義の解明や治療標的・診断マーカーとしての可能性が注目されている。そこで、O-GlcNAc 修飾が亢進している LATS2 不活化悪性中皮腫細胞に、O-GlcNAc 修飾阻害剤を添加したところ、その細胞増殖が抑制された。これは O-GlcNAc 修飾の亢進が悪性中皮腫細胞の生存・増殖に強く関与し、O-GlcNAc 修飾の抑制が悪性中皮腫に対する新規治療戦略に応用可能であることを強く示唆している。しかし悪性中皮腫に対する特異性を高めるためには、悪性中皮腫において亢進する O-GlcNAc 修飾標的タンパクを見い出す必要がある。今後はこの標的タンパクの同定とその生理的意義についても検討する。また、共培養を行った際の変化についても今後の検討課題とする。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Matsushita A, Sato T, Mukai S, Fujishita T, Mishiro-Sato E, Okuda M, Aoki M, Hasegawa Y, Sekido Y.  
TAZ activation by Hippo pathway dysregulation induces cytokine gene expression and promotes mesothelial cell transformation.  
Oncogene, 38, 2019, 1966-1978, doi: 10.1038/s41388-018-0417-7. 査読有

### 〔学会発表〕(計 4 件)

1. 向井 智美, 松下 明弘, 佐藤 龍洋, 藤下 晃章, 三城 恵美, 奥田 真帆, 青木 正博, 関戸 好孝.  
悪性中皮腫における Hippo 経路の破綻による腫瘍進展機構  
第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年
2. Satomi Mukai, Tatsuhiro Sato, Emi Mishiro-Sato, Masahiro Aoki, Norikazu Yabuta, Yoshitaka Sekido.  
LATS2 inhibits O-GlcNAcylation in malignant mesothelioma cells.  
第 77 回 日本癌学会学術総会, 2018 年
3. 向井 智美, 松下 明弘, 佐藤 龍洋, 藤下 晃章, 青木 正博, 関戸 好孝  
IL-1 受容体拮抗薬は Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞の進展を抑制する  
第 22 回 日本がん分子標的治療学会学術集会, 2018 年
4. Satomi Mukai, Akihiro Matsushita, Tatsuhiro Sato, Teruaki Fujishita, Masahiro Aoki, Yoshitaka Sekido  
Transcriptional coactivator TAZ induces malignant mesothelioma progression via enhancement of IL-1b transcription  
第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 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：  
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：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6．研究組織

(1)研究分担者  
該当なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者  
該当なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。