

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18590356
研究課題名(和文) がん-間質相互作用における新規誘導分子の同定・探索
研究課題名(英文) Screening and Identification of a Novel Inducing Factor involved in Cancer-Stroma Interaction.
研究代表者
藤井 元 (FUJII GEN)
国立がんセンター(研究所及び東病院臨床開発センター) 病理部・主任研究官
研究者番号：90321877

研究成果の概要：

がん組織における<がん間質相互作用>は、その成立・維持において重要な機能を担っている事が近年示唆されている。しかし、その分子的機構については未だ解明されていない点が多い。

そこで具体的研究対象として、がん悪性の指標となっている分子(ラミニンなど)の浸潤先進部における発現が間質細胞からの誘導による<がん間質相互作用>によって惹起されうるという現象を利用しての研究を行った。この現象が培養細胞を利用した実験系で模倣可能であることから、間質細胞側の誘導分子の本体はどのようなもので有るのかについてスクリーニングを行って探索すると共に、発現誘導に影響を及ぼすような環境条件があるのかについての解析も行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	750,000	4,250,000

分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：腫瘍・がん間質相互作用、発現誘導、浸潤先進部、スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

ヒトの内在性ゲノムの変異に起源するような腫瘍病変において、その体細胞における発生を遺伝子レベルで人為的に止めることを考えた時、DNA障害の予防的ケア等を行う以外には実際には困難な点が多い。そこで臨床腫瘍死を激減させようとするような腫瘍悪性化過程を止めうる次善のステップとして適当な方策を考えるならば、浸潤・転移の人為的阻止こそが最有力な候補手段の一つである。このような観点から現在までに数多くの転移・浸潤に関する研究がなされ、数多の関連分子が発見され、そして様々な転移・浸潤メカニズムが考えられてきた。

ここで浸潤・転移をその開始時点に注目して人体病理学的観点に立った新規な視点から再検し、薬理・臨床的な措置に応用させようとするならば、浸潤先進部こそは直接的にこの事象を観察しうる有用な「現場」の一つであり、浸潤先進部で起っている病理変化を詳細に検討することで浸潤・転移の新たな原理や機序を発見できうる可能性は十分高いと考えられた。

固形腫瘍組織における浸潤先進部は、その本体である上皮性のがん細胞とともに、その周囲を取り囲むように存在している間質組織より形成されている。ここでの間質組織は単なる支持組織ではなく、「がん-間質相互作用」を介して、腫瘍を腫瘍たらしめる役割を機能的に担っていることがトランスジェニック動物を用いた実験などの様々な研究により明らかにされていた。その機能的な相互依存性は間質細胞においてはがん細胞からの影響を受けてのがん周辺部活性化型線維芽細胞の存在と言う形で、がん細胞においては間質細胞が産生する各種成長因子などを受容しての浸潤先進部特異的な分子の発現変化という現象でよく示されていた。

研究開始時点で比較的研究が進んでいた分野は、腫瘍組織浸潤先進部におけるがん細胞側の特異的な発現変化であり、それに関しては、浸潤先進部特異的なモノクローナル抗体の作製を通じて以前より数多くの研究を行なわれてきていた。これまでの研究によって浸潤先進部において様々な分子の発現が特異的に増強もしくは減弱することは明らかにされ、これらが病理学的診断に於て有用なマーカー分子として利用されてはきたものの、その「上流」にあたる発現誘導分子自体は既知の細胞増殖因子やサイトカイン類を除けば殆ど明らかになっていなかったのが実情であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、がん-間質相互作用に基づいて浸潤先進部のがん細胞側で特異的なマーカー分子の発現を増強、もしくは減弱を誘導しうる間質細胞由来の「上流分子」を探索・同定する事をプライマリーな目的とした。

具体的な手段としては、後述の方法部分において詳細に述べるが、がん細胞においてマーカー分子の特異的な発現を誘導しうる間質細胞を選び出し、そこで発現している遺伝子のcDNAライブラリーを作製して、培養細胞へ導入しての発現アッセイスクリーニングを行うことになる。このような実験を実際のシステムとして滞りなく遂行して研究を勧めて行くためには、マーカー分子の発現の誘導を起こせるがん細胞-間質細胞の組み合わせ共培養実験系、さらには分子生物学的基盤に基づく鋭敏な Cloning-First の High Throughput Screening技術が必要であり、その双方技術の策定・開発がまず最初の目的となった。

研究期間内ではがん細胞側の変化にとどまらず、さらに間質細胞側の発現変動（例：通常の間質線維芽細胞ががん周辺部活性化線維芽細胞（CAF: Cancer Activated Fibroblast）に変化した際に見受けられる平滑筋アクチンの発現上昇等）を引き起こせるような間質細胞側に力点を置いたがん-間質相互作用実験系の開発についても研究を行うこと、さらにはがん間質相互作用が機能する時の周囲の環境条件（培養条件や低分子化合物などの物理科学的な変動）に関して探索を行う事も副次的な目的とした。

これらの研究により現在まだ不明な点が多い腫瘍組織における間質細胞の活性化機構や機能的関連性を解析出来る実験病理学的基盤が整えられる可能性が高いからである。

本研究で得られるがん細胞の浸潤・転移能を誘起させるような間質細胞由来の新規誘導分子の発見は、浸潤・転移を人為的に抑制するための重要なターゲット分子であり、創薬や臨床治療研究に与える影響はとて大きなものとなるものと期待された。浸潤先進部におけるがん-間質相互作用の分子機構解明に新たな知見を与える意義は大きく、その機序解明は前述の浸潤・転移レベルでがんによる臨床腫瘍死を激減させようものと思定されるため、将来的な目的としてはこのようながん間質相互作用分子を機能的に調節することによる治療を挙げる事が出来よう。

3. 研究の方法

本研究では以下のような段階を踏んで実験を行い、研究を進めていった：

(1) 浸潤先進部を模したがん-間質相互作用実験系確立

浸潤先進部という浸潤・転移の現場における構成成分であるがん細胞と間質細胞の間の相互作用を解析する実験系を樹立した。具体的には、約10種類の培養間質細胞と培養がん細胞とでTrans-Filter実験、もしくは共培養実験を行い、その時の浸潤先進部のがん細胞側において特異的発現変化が示されているラミニン5 γ 2鎖分子の発現変化をウェスタンブロット法により定量解析し、培養細胞を利用した組み合わせ実験系を確立、誘導分子の特性について解析を行った。

(2) 間質細胞の産生する誘導分子を同定するための実験系の樹立

上記実験系の確立過程で、発現誘導分子は、MRC-5などの線維芽細胞に発現している細胞接着依存的に機能している分子と判明した。そこで

- ・ それらの線維芽細胞より全長を保ったcDNAライブラリーをSMART法などの適切な方法により作製、EF1aやCMVの様な強制発現プロモーターを持ったベクター下流に一方方向的に組み込む
- ・ その後、これらの分子を発現していないと考えられる培養ホスト細胞を選定し、その細胞に調整したプラスミドであるcDNAライブラリーの遺伝子導入を行う。
- ・ さらにこの遺伝子導入済みテスト細胞をマーカー分子発現に関する指示がん細胞と共に培養し、抗体を利用したマーカー分子の発現アッセイを、定量的に行うことで、目的とする分子をコードする遺伝子を選び出し、最終的に単離・同定するというスクリーニング戦略をとる事にした。

この戦略を利用したスクリーニングにおける最大の難点は、共培養を利用しているため誘導分子を発現している遺伝子導入細胞を鋭敏に検出する事が難しい点にある。そこで大腸菌に形質転換されたライブラリーの有効独立クローン濃度を算定しておき、Cloning-Firstなスクリーニング系として実験を行う事とした。プラスミドの調整・培養細胞への遺伝子導入・免疫化学的アッセイの全てを96well plateの共通フォーマットを利用して行ったのだが、多数のアッセイ標品か

ら陽性試料を選び出すのではないCloning-Firstの実験系であっても1 well-1 cloneではさすがに効率が悪い。そこで今回は5 clone/well程度でスクリーニングを行った。1 wellに5 clone程度が入るように調整した液体培地からプラスミド調整を行い、スクリーニングする事で非常に低コストでのアッセイを行う事が可能となった。

(3) スクリーニング

初年度は実験系の最終調整やライブラリーの作製などもあったが約65000 cloneを、次年度も前年度と同程度のclone数のスクリーニングを行った。2007年度・2008年度は一次陽性サンプル wellの二次スクリーニングおよびその先の個々の陽性遺伝子の単離・同定を順次進めていった。

(4) 間質細胞側で機能する相互作用

がん細胞側でなく、間質細胞側のマーカー分子（平滑筋アクチン分子やテネシン分子など）の発現変動を引き起こせるような組み合わせがないかについても同様の手法を利用して解析を行った。これはがん-間質相互作用が決して一方から一方への単方向性の作用ではなく、相互に依存しあった双方向性のものと考えられるからであり、特に間質細胞側の変化（がん周辺部活性化線維芽細胞（CAF: Cancer Activated Fibroblast）化）は今後の浸潤・転移研究を進めるうえで欠かせない要素の一つになると予想されるからである。これらCAFに関してはがん細胞との直接関連性を持ち、詳細な分子機構解析が可能な安定で良い*in vitro*の実験系が無いため、その基礎となりうる実験系を策定しておくこと自体が今後の病理学的解析のために有意義だと考えた。

(5) がん-間質共培養における培養環境条件の物理科学的な変動、ならびにがん細胞内における誘導シグナルの伝達

がん-間質共培養時のマーカー分子発現が酸素濃度や温度・pH、さらには低分子代謝化合物の濃度といった物理化学的な環境条件変動の影響下に有るかを解析した。同時にこの実験系での培養細胞内の伝達経路の解析（シグナル伝達の薬理的解析）はがん間質相互作用をシステムとして捉える機序解明の一端となりうると思え、すでに作用が判明している細胞増殖因子を添加した時に見られる活性化のシグナル伝達系における阻害実験を中心に、特定のシグナル伝達系の関与の解析を平行して行った。

4. 研究成果

前項：研究の方法に対応した形で成果を記していく事とする：

(1) 浸潤先進部を模したがん-間質相互作用実験系の解析

幾つかの間質細胞とがん細胞の組み合わせで発現の変動が見られたが、その中でもっとも顕著な発現の変動が見られた組み合わせは口腔がん細胞HO-1-u1細胞と有限増殖線維芽細胞MRC-5、またはHUC-F・HFL-1などを組み合わせた時のラミニン5 γ 2鎖分子の発現上昇に関する実験系であった。

またこの時にがん細胞と線維芽細胞の組み合わせ実験に関して、培養細胞上清を用いた実験・Trans-Filter実験・同一培養平面内の共培養実験として試験施行することにより、分子が液性因子なのか、細胞接着依存的な分子なのかについて検討してみたところ、Trans-Filter実験で得られた発現増強と比較した時と比較して明らかに強い（数倍以上）ラミニン5 γ 2鎖分子の発現上昇が同一培養平面内の共培養（混合培養）実験で認められた。新たに考案した周囲を間質細胞で包囲したような特殊な平面培養（Surrounding Culture）でも間質細胞と接しているがん細胞上においてラミニン5 γ 2鎖分子の強い発現が示されたことから、この発現増強は間質細胞で産生された非液性の分子によって引き起こされる細胞接着依存的ながん-間質相互作用によるものと推定され、EGF/TGF α といった成長因子様の液性成分以外に浸潤先進部マーカー分子の発現を誘導し、ひいては浸潤・転移能を高めるような形質変化を引き起こせる強い誘導活性を有した分子が間質細胞側に存在する事が示された。

(2) 間質細胞の産生する誘導分子を同定するための実験系の樹立

スクリーニングに用いる遺伝子導入宿主細胞系として有る意味最も適当だと考えられるのは指示細胞に用いているHO-1-u1細胞自身への遺伝子導入であるが、既知の遺伝子導入系を用いる限りこの細胞への高い導入効率は余り得ることが出来なかった。そこで次善の策として、共培養した時に今回の実験で用いるマーカー分子であるラミニン5 γ 2鎖分子の発現に変動を起こさせないような機能的に中立で、遺伝子導入効率の高い細胞を利用する事を目指して選別を行い、多くの遺伝子導入実験で利用されているHEK293細胞を適当なホ

スト細胞として選び出した。

遺伝子導入法や、どの程度の割合で遺伝子導入したHEK293宿主細胞と指示細胞であるHO-1-u1細胞を混ぜて利用すればいいのか、さらには定量アッセイまでの培養時間はどの程度取るのが適切なのか、などについて予備的な実験を行った後、実際のスクリーニングを施行した。

(3) スクリーニング

約260Plate/120000cloneよりラミニン5 γ 2鎖分子の発現を上昇する分子を複数個単離・同定する事ができた。

その中の多くは転写因子や翻訳関連分子、さらには細胞シグナル伝達系に参与する分子などの<発現を引き起こすまでの中間的な分子>であると考えられたが、唯一酵母のLASS2類似遺伝子が細胞膜上で発現している候補遺伝子として単離された。

そこでこのLASS2類似遺伝子のラミニン5 γ 2鎖分子発現誘導活性について強制発現系を利用して詳細な解析を行ったところ、確かに誘導活性を有しているものの、間質細胞として利用した線維芽細胞の作用を完全に代替できる程の強い誘導活性は残念ながら得られなかった。

ここから推測される事は、今回単離できた遺伝子以外に誘導分子の本体がまだあるか、複数因子/条件の協働作用によって発現誘導が起こっているものと推定された。

(4) 間質細胞側で機能する相互作用

がん細胞側での発現を解析する系として選んだHO-1-u1細胞とMRC5線維芽細胞の共培養の組み合わせで、MRC5細胞において、がん周辺部活性化線維芽細胞（CAF: Cancer Activated Fibroblasts）としての既知マーカー分子である平滑筋アクチン分子の有意な発現上昇を逆に引き起こせることを見いだすことができた。

間質細胞側に着目した実験系を利用した間質細胞の活性化機構（CAF化）の解析を現在進めているところである。

(5) がん-間質共培養における培養環境条件の物理科学的な変動、ならびにがん細胞内における誘導シグナルの伝達

実験を行っている過程の中で、発現の上昇は常に観察されるものの、その変化

科学研究費補助金研究成果報告書

が一定ではなく、上昇レベルがとても高い事もあれば、低い事も有る事に気がついた。

そこで出来る限り同じような培養条件で実験を繰り返す中で、培養条件や低分子代謝物質の添加によってこの発現変動を人為的に変化させる事、そしてそれはがん細胞側自体でなく、間質細胞の活性化という過程を経た結果として引き起こされる事を見いだした。

線維芽細胞の活性化を引き起こせる低分子代謝産物としては乳酸などの無酸素呼吸関連分子(解糖系関連分子)が特異的に関与している事を見いだした。

この発現上昇は無機的な酸である塩酸などでは誘起されない事から、pHといった物理科学的な変動ではなく、解糖系代謝産物により誘起されている事を確認できた。

がん細胞ではエネルギー供給経路として無酸素呼吸(解糖系)が主たる経路となる事が、以前よりがん組織に特徴的なワールブルグ効果として知られていたが、この無酸素呼吸自体ががん間質相互作用を通じてがんの悪性度増悪に寄与している可能性を初めて明らかにできたものと考えている。

また腫瘍細胞におけるラミニン5 γ 2鎖分子発現誘導がEGF/TGF α によって人為的に誘起できる事から、EGFファミリー分子による誘導が機能していると考えられるのだが、この系ががん細胞での唯一主要なシグナル伝達系として利用されているのかについて、EGFファミリーシグナル伝達の主要経路MAP-Kinase経路の関与を阻害剤を利用して解析した。その結果間質細胞が誘起しているラミニン5 γ 2鎖分子の発現上昇において、この経路が比較的大きな役割を担っているものの、唯一絶対な経路ではなく、細胞接着依存時には他のシグナル経路も働いてラミニン5 γ 2鎖分子の発現上昇を引き起こしている事が示唆された。

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 2件)

1)
Toshihiko Oka, Tomoko Sayano, Shoko Tamai, Sadaki Yokota, Hiroki Kato, Gen Fujii, and Katsuyoshi Mihara
Identification of a Novel Protein MICS1 that is Involved in Maintenance of Mitochondrial Morphology and Apoptotic Release of Cytochrome c.
Molecular Biology of the Cell 19, 2597-2608 (2008), 査読: 有り

2)
Takahiro Yamanashi, Yukihiro Nakanishi, Gen Fujii, Yuri Akishima-Fukasawa, Yoshihiro Moriya, Yae Kanai, Masahiko Watanabe, and Setsuo Hirohashi
Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology*, in press (2009) 査読: 有り

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]
○特になし

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 元 (FUJII GEN)
国立がんセンター
(研究所及び東病院臨床開発センター)
研究所 病理部・主任研究官
研究者番号: 90321877

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし