

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07216

研究課題名（和文）がん転移過程フォーカスドin vivoスクリーニングによる制御因子の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of novel metastasis regulators by the metastasis-step focused in vivo screening

研究代表者

竹本 愛 (TAKEMOTO, Ai)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 基礎研究部・主任研究助手

研究者番号：20706494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん転移は、多段階かつ多様な過程で制御される。従って、転移成立に寄与する機構の理解と効果的な抑制法の提案には、転移の過程を区別できるモデルを用いた解析が効果的である。本研究では、転移の各過程が機能欠損しているがん細胞株を利用し、shRNAライブラリーを導入することで転移の成立を助長した因子をin vivoスクリーニングし、得られた候補因子をこのモデル細胞を用いて解析することで、新規がん転移制御機構の理解を目指した。得られた候補因子のうち、1つは転移初期に重要な遊走能・浸潤能に関わる可能性、1つは中期の血行性転移の効率に影響する血小板凝集因子の発現制御に関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者の死因の9割を超える転移に対して未だ効果的な抑制法が不足している現状において、転移制御因子の同定と各因子の機能に踏み込んだ詳細な解析による新規制御経路の理解と転移抑制標的としての妥当性の評価は、抑制法の提案に欠かせない。本研究では、機能解析を加速化できるように各転移過程にフォーカスしたin vivoスクリーニングを構築し、実際に複数の新規転移候補因子の同定と制御機構を示唆するに至った点で学術的意義がある。さらに、このような系によるスクリーニングの遂行と同定した因子のin vivoでの解析を進めることで効果的な転移抑制法開発の足掛かりとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Cancer metastasis is regulated by multi- and various steps. To understand the mechanism contributing to metastasis establishment and to propose the effective suppression strategy, analyses using the model possible to discriminate metastasis steps could be useful. Therefore, in this study, cancer cell lines lacking the specific metastasis step were used for in vivo screen, in which genome-wide shRNA library was transformed to each cell line and promoted metastatic frequency by the shRNA knock-down was monitored in vivo metastasis model. And then, identification of candidates of metastasis regulators and analysis using the specific model were performed in aiming to understand the novel metastasis-regulatory mechanism. Out of identified candidates, one was suggested to contribute in mobility and invasion ability important during the early metastasis step and the other in the regulation of expression of a platelet aggregation-promoting factor.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん転移

1. 研究開始当初の背景

がん患者の死亡原因の90%以上が転移であることから、転移ががんの予後を決定するといえる。したがって、がん転移の抑制はがん研究における重要課題の一つである。未だ効果的な転移抑制法がほぼ存在しない現状において、転移に関わる分子機構の解明は、がん転移の効果的な抑制法確立の基盤となる。がんの血行性転移を促進する機構として血小板凝集による腫瘍塞栓形成の亢進が知られる。申請者が所属する研究室では、がん細胞に発現する血小板凝集誘導因子としてポドプラニンと同定し(Kato Y et al. JBC 2003)、創製したポドプラニン中和抗体投与により腫瘍塞栓形成を阻害することで血行性転移が抑制されることを示した(Takagi S et al. 2012, Sekiguchi T, Takemoto A et al. Oncotarget 2016)。血小板のがん転移への効果1つとて、血中循環過程だけでなく、血管外遊出の過程、原発腫瘍での作用と多様な機構への関与があり、多段階で複雑な転移に関わる機構を明らかにするためには、各過程の寄与を区別、フォーカスして調べることができる実験系が必要である。昨今、高転移性細胞株と低転移性細胞株間、原発巣と転移巣間の遺伝子発現比較、ゲノム、エピゲノム情報比較などによる網羅的解析により転移予測のバイオマーカーや転移関連因子の探索が行われ、予後との相関を示す因子が次々に同定されている。しかし、このような比較解析に基づくスクリーニングで同定された因子は転移のどの過程に関与するかを明らかにすることが難しい。そこで、関与する転移過程を絞りつつ、転移の成立を決定付けるような因子の特定を行うことでその後の解析も加速化したいと考えた。古くから転移研究においては、マウス転移モデルから多様な転移特性を有するがん細胞株を単離し、比較解析を行うことで進められてきた。この特徴的な転移性質を利用し *in vivo* スクリーニングを行えば、関連する転移過程の情報が付随した形で転移関連因子が同定でき、転移における活性や機能が不明の因子についても解析が進む可能性がある。そこで本研究では、特徴的な転移性質を有するがん細胞株として、まず“転移初期過程”；原発巣から血管侵入に機能欠損を示す細胞を選び、転移成立を指標とした *in vivo* スクリーニング系を構築し、新規転移制御因子群の同定と解析を行うことで、新たな転移制御機構の解明を試みることにした。さらに、血小板凝集能に依存的、非依存的な低血行性転移能を示す細胞株すなわち“転移中期過程”；血管内侵入から血中循環、“転移後期過程”；血管外遊出から転移巣での生着・増殖に機能欠損を示す細胞株を選び同様の *in vivo* スクリーニングを計画した。

2. 研究の目的

がん転移の効果的な抑制法が未だ存在しないため、がん転移機構の全容解明は重要課題である。がん転移は多段階かつ多様な過程で制御されることから、転移成立を決定する機構の理解には、転移の各過程を含みかつ区別して解析できる系が必要である。そこで本研究では、がん転移初期、中期、後期の過程が機能欠損しているがん細胞株をそれぞれ *in vivo* スクリーニングモデルとして利用し、ゲノムワイドな機能性ライブラリーを導入することでがん転移の成立を決定する因子の同定を行い、その因子が関与する転移制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。さらに、臨床情報や多様ながん細胞株を解析に用いることでがん種特異性や悪性度との相関も検討し、転移の抑制法や早期診断法の基盤となる有用な情報の蓄積を図ることを目指した。

3. 研究の方法

本研究は、関連する転移過程を絞ったフォーカスド *in vivo* スクリーニング系で新規転移制御因子の同定を行い、その因子が関与する制御機構の解析を行うことで、転移抑制法開発の足掛かりとなる転移制御機構の理解を目指した。具体的には、以下の計画を進めることとした。

- (1) **フォーカスド *in vivo* スクリーニング系の構築**：転移の一部の過程、初期、中期、後期それぞれの過程を乗り越える能力を欠損しているがん細胞株をモデルに用い、shRNA ライブラリーを導入することで転移成立できた標的因子の同定を進める。転移初期過程に機能欠損を示す細胞株としては、マウス膀胱扁平上皮がん細胞株 MBT-2 を選択した。この細胞は皮下原発腫瘍から自然転移しないものの、血管内に移植すると血行性転移できる、すなわち、原発腫瘍から血管内侵入に必要な性質を欠いた細胞である(Barut BA et al. Clin Exp Metastasis 1986)。shRNA ライブラリーを導入して自然転移するようになった細胞を回収し、shRNA の標的因子を同定する。転移中期過程および後期過程に機能不全を示す細胞株としてマウス大腸がん細胞株 Colon26 のサブクローンの中から、血行性転移の促進に寄与することが知られる血小板凝集能が低い低転移性のクローン、血小板凝集能が高いにも関わらず低転移性のクローンを選択した(Tsuruo T et al. Cancer Res 1986)。それぞれの細胞株に shRNA

- ライブラリーをウィルスベクターで導入し、転移能に関与する因子の同定を行う。転移中期過程関連因子のスクリーニングでは、血小板凝集活性に関与する因子に加え、免疫への抵抗性や液性因子による増殖促進、アポトーシス抑制など転移後期過程にも関わる転移制御因子を同定できる可能性がある。コントロールベクター導入により、転移が観察されない移植細胞数、移植後日数等の条件を検討し、スクリーニング系を構築する。
- (2) 転移制御因子候補の同定：それぞれのスクリーニング系で肺に転移した細胞を培養し、ライブラリーベクターが導入された細胞を薬剤で選択した後、ゲノムに組み込まれた shRNA コード配列を解析し、標的因子を特定する。
 - (3) 同定した候補因子の単独転移成立決定能による絞り込みと再現性の確認：同定した候補因子のノックダウン細胞を再構築し、単独で転移初期、中期、後期それぞれの転移成立に関与する機構への寄与を検討することで因子の2次スクリーニングを行う。2次スクリーニングで絞られた因子については複数の別の配列を標的とするノックダウンベクターを用いて転移への効果について再現性を得る。
 - (4) フォーカスした転移過程における機能の特定、因子に応じた機能解析：スクリーニング系に応じた転移過程への関与を検証する。転移初期関連因子の場合、原発腫瘍から血管侵入過程への寄与を想定し、腫瘍増殖、血管新生、遊走能・浸潤能へ関与をノックダウンや過剰発現による影響で評価する。転移中期関連因子の場合、腫瘍塞栓形成、血小板凝集誘導能、転移中期および後期関連因子の場合、NK 活性やシアストレスへの抵抗性、転移巣（肺）での生着性・増殖性等への影響を評価する。併せて、個々の候補因子に応じた機能解析を行うことで転移制御機構の詳細解明に繋げる。
 - (5) 臨床情報・検体および他のがん種の細胞株での転移能と発現の相関解析：web 上の臨床検体や各種がん細胞株における発現解析の情報を参考にして、実際に転移能の異なる細胞株や転移情報付帯の臨床検体アレイを用いることで、転移制御候補因子の発現レベルと転移性の相関を検討することで、転移抑制の標的として妥当な経路の関連因子が評価する。

4. 研究成果

研究の主な成果

本研究では、転移の各過程が機能欠損しているがん細胞株を *in vivo* スクリーニングに利用し、ゲノムワイドな shRNA ライブラリーを導入することでがん転移の成立に寄与する因子を探索し、得られた候補因子について関与する各転移過程における機能を解析することで、新規がん転移関連因子の機能解明および抑制標的としての可能性の提案することを目指した。本スクリーニングを遂行することで転移初期制御候補因子7種を同定した。この中には、転移抑制因子として既報の DDB2 も含まれていた。2次スクリーニングとして転移の初期過程に関与する遊走能・浸潤能への影響をそれぞれの因子のノックダウンにより検討し、ノックダウンにより遊走能と浸潤能が亢進した1種の候補因子 EMR1 (early-step metastasis regulator 1) をピックアップした。また、転移中期過程にフォーカスしたスクリーニングから同定された候補因子6種については、スクリーニングに用いた細胞株のサブクローン間でその発現が転移能と逆相関していた3種に着目した。ノックダウンによる検討から MMR1 (middle-step metastasis regulator 1) が血行性転移過程に重要な血小板凝集誘導因子の発現抑制に関与する可能性が示された。MMR1 と血小板凝集因子、両因子の発現量は、同じがん細胞株由来の複数のサブクローンにおいて、転移能と逆相関しており転移制御への寄与が示唆された。さらに、MMR1 はヒストン修飾酵素として知られ、ノックダウンによる血小板凝集誘導因子の増加は、転写産物 mRNA 量の増加を伴っていたことから、MMR1 によるエピジェネティック制御を介した発現調節が考えられた。また、MMR1 ノックダウンによる血小板凝集因子の増加は、その細胞の血小板凝集活性を促進し、血小板凝集因子の中和抗体により抑制されたことから、MMR1 による制御が血小板を介した転移促進に寄与する可能性が示された。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

患者検体や転移モデル由来の細胞株を用いた遺伝子発現解析、ゲノムおよびエピゲノム比較解析から転移や予後不良に関与する因子の網羅的解析の報告が増えているが、このような比較解析に基づくスクリーニングでは、多くの疑陽性が検出されてしまうことや真の転移関連因子を特定することが難しいことが問題である。一方、各因子の機能に踏み込んだ詳細な解析や新規制御経路を示すことは転移抑制標的としての提案に欠かせない。本研究では、フォーカスした転移過程に関連する因子を抽出できる *in vivo* スクリーニングを行うことで関与する過程をある程度限定し、関連機能が示唆された形で因子の同定が可能であるため、機能解析を加速化でき、世界に先駆けて新規がん転移促進経路の理解に繋げることが期待された。実際、本スクリーニングにより転移制御候補因子として複数の新規転移候補因子の同定と制御機構を示唆するに至った。特に、ゲノムワイドに影響を及ぼすため、関連機能の特定が難しいエピジェネティック制御

因子についても転移制御経路を示唆することができたのは成果といえる。今後これらの因子の *in vivo* での解析が進めば、さらにインパクトが大きい。今のところ、MMR1 についてはエピジェネティック制御因子であるためか、shRNA 導入による安定的なノックダウン細胞が得られず、*in vivo* 転移モデルにおける寄与の検証を行うことができなかった。一方で siRNA による一過性ノックダウンによる血小板凝集因子の高発現誘導および凝集活性の上昇は認められた。比較的最近になって、この因子の特異的阻害剤の開発も報告され、阻害剤利用による転移制御への寄与を今後評価できる可能性がある。今回示唆された血小板凝集因子発現制御の効果も確認することで、制御経路、抑制標的としての妥当性の解明に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 木村美紗, 藤田直也, 竹本愛
2. 発表標題 低転移性の結腸がん細胞を用いた in vivo スクリーニングによる新規がん転移制御因子の探索
3. 学会等名 第22回 日本癌分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------