

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07220

研究課題名(和文) ニッチ細胞と癌細胞とのハイブリッド形成および癌多様性獲得に寄与する遺伝子の探索

研究課題名(英文) Search for genes that contribute to hybrid formation between niche cells and cancer cells and to the acquisition of cancer diversity

研究代表者

田島 陽一 (TAJIMA, Youichi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：00300955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織では間葉系幹細胞はがん細胞と細胞融合を起こすことが報告されている。我々は間葉系幹細胞と膀胱癌細胞の共培養において両者の細胞融合が起き、免疫チェックポイント分子であるPD-L1の発現上昇が起きることを見出した。融合細胞におけるPD-L1の働きを調べるためにPD-L1遺伝子破壊を行い、xenograftによる腫瘍形成能を検討した。PD-L1欠損した融合細胞は免疫細胞からの攻撃を受け腫瘍が萎縮するのが観察された。このように融合細胞ではDNA損傷によるPD-L1発現誘導が免疫細胞の攻撃からの回避に役立つことを見出した。現在その詳細なメカニズムの研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞融合は生命の根幹に関わっている現象であるにも関わらず不明な点が多い領域である。我々は細胞融合を起こしやすいヒト不死化骨髄由来間葉系幹細胞株(BM-MSC)を樹立し、膀胱癌細胞(UMUC-3)と共培養することで簡単に融合細胞を作製する系を確立した。融合細胞ではDNA損傷が起き、そのシグナルがPD-L1の発現上昇に繋がることを見出した。PD-L1の発現は免疫チェックポイント両方の発展に貢献できるので、がん治療への貢献が見込める。さらにゲノムワイドの研究を行うことで、融合細胞の本質的な理解に繋がると確信している。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that mesenchymal stem cells fuse with cancer cells in tumor tissues. We found that the co-culture of mesenchymal stem cells and bladder cancer cells resulted in cell fusion and increased expression of PD-L1, an immune checkpoint molecule. To investigate the function of PD-L1 in fusion cells, they disrupted the PD-L1 gene and examined the tumorigenicity of xenografts. Thus, we found that induction of PD-L1 expression by DNA damage in fusion cells helps them to evade immune cell attack. We are now investigating the mechanism in detail.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞融合 PD-L1 DNA損傷 RNA-seq解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は損傷した組織に遊走し組織を修復するが、その一方で体細胞と細胞融合を起こすことが多数報告されている。腫瘍組織においても MSC はがん細胞と細胞融合を起こすが、融合したがん細胞が増悪する報告や反対に好転する報告があり、MSC とがん細胞との細胞融合の働きは解明されていない。我々は、不死化骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) と膀胱がん細胞 (UMUC-3) の共培養において普遍的に細胞融合が起きることを見出した。この自然細胞融合系を用いて、細胞融合が及ぼす遺伝子発現の変化さらにはゲノム DNA の変化を解析し、細胞融合ががんに及ぼす影響について解析することを目的とした。

2. 研究の目的

がんは遺伝子の損傷が蓄積することで発症するが、浸潤・転移するがんの悪性化への転換にはゲノム不安定性が起きることが必要である。染色体の転座や欠失、染色体の不当分裂、微小核の形成、染色体破壊などがゲノム不安定の原因と考えられているが、間葉系幹細胞の様にがんに遊走し、がん細胞との細胞融合によりゲノム不安定性を引き起こす可能性を検討する。そこで以下の3つについて解析を行った。

- (1) 細胞融合によるがん細胞の多様性の解析
- (2) 細胞融合で発現誘導される PD-L1 の機能解析
- (3) 融合細胞におけるゲノム損傷及ぼす遺伝子発現の変化

3. 研究の方法

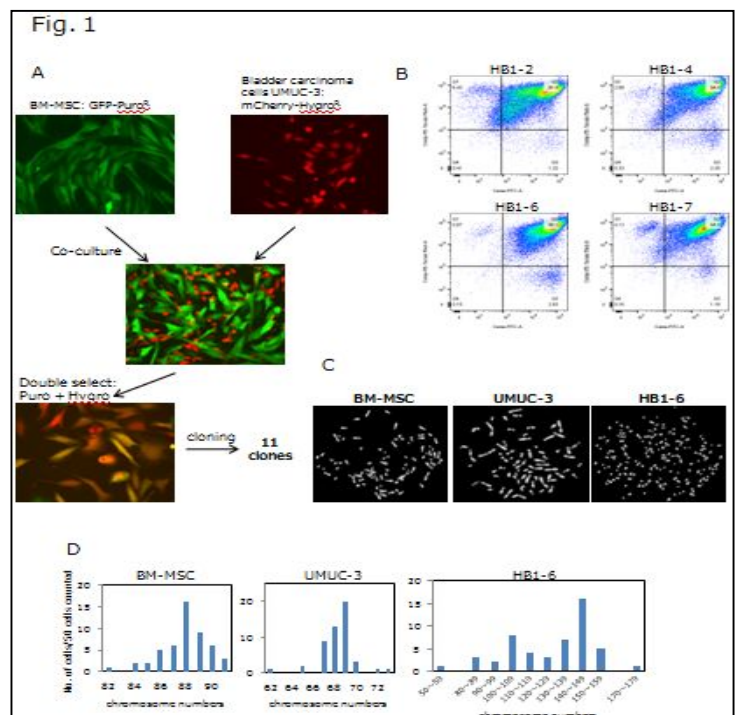
(1) 不死化骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) と入手可能ながん細胞株を共培養し、培養下で細胞融合を観察した。結果、BM-MSC は膀胱がん細胞、乳がん細胞、膵がん細胞など多くのがん細胞と 1%未満で融合細胞を形成した。特に膀胱がん細胞の UMUC-3 との組み合わせで、約 5% 程度の融合細胞を形成したので、この融合細胞を材料にして以下の解析を進めることにした。融合前の元細胞と融合細胞を用いて、Western blot, Real-time PCR, Flow cytometry, および蛍光免疫染色にて解析を行った。

(2) BM-MSC と UMUC-3 の細胞融合により HB1-1 から HB1-11 までの 11 種類の融合細胞株を樹立し、それぞれの細胞から RNA を抽出して RNA-seq 解析により、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

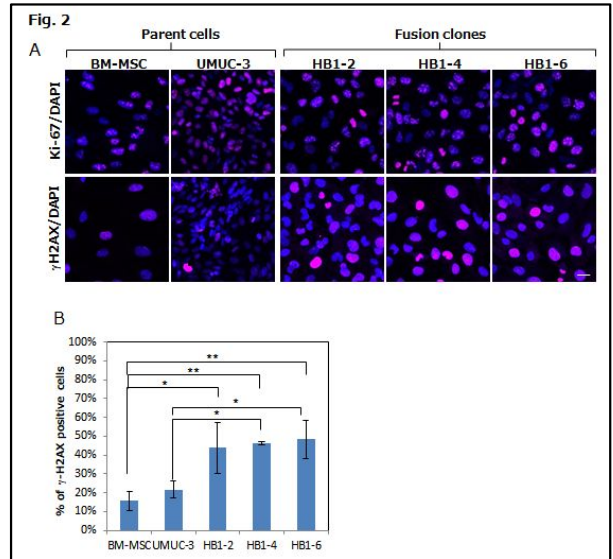
(3) 親細胞および融合細胞を免疫不全マウス (Balb/c-nu/nu) の Xenograft を行い、腫瘍形成能について解析を行った。

4. 研究成果

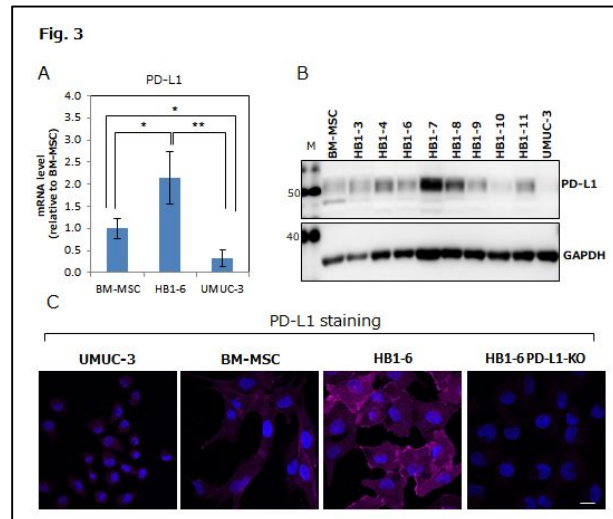
(1) 不死化 BM-MSC と UMUC-3 膀胱がん細胞株の共培養において普遍的に細胞融合が起きることを見出した (Fig.1 A,B)。上記の融合細胞から 11 種類の株化細胞を樹立した。



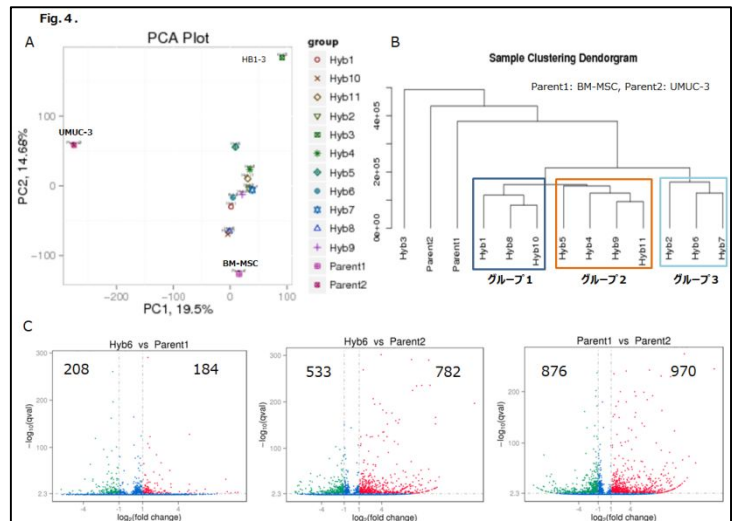
BM-MSC と UMUC-3 及び融合細胞 HB1-6 のカリオタイプ解析を行った。不死化 BM-MSC は染色体 88 本で約 4 倍体、UMUC-3 は 69 本で約 3 倍体、HB1-6 は染色体数にばらつきがあり、染色体 140~149 本が最も多かった。このことから HB1-6 は細胞融合により約 6 倍体から 7 倍体のゲノムを持つことが判明した (Fig.1 C,D)。細胞融合による DNA 損傷を調べるために DNA2 本鎖切断マーカである γ H2AX の発現を免疫細胞染色で検討したところ、融合細胞群では融合前の BM-MSC と UMUC-3 と比べて核内の γ H2AX Foci が多く (Fig.2 A)、 γ H2AX 陽性細胞の割合が有意に増加していた (Fig.2 B)。最近放射線や DNA 損傷誘発剤で細胞を処理すると免疫チェックポイント分子の PD-L1 が増加する報告があるので、この融合細胞を使い PD-L1 の発現について検討を行った。融合細胞 HB1-6 での PD-L1 mRNA の発現は BM-MSC よりも約 2 倍増加し (Fig.3 A)、タンパク質レベルでも増加が見られた (Fig.2B)。細胞局在を調べたところ融合細胞の細胞膜での局在が観察された (Fig.3 C)。



(2) 次に BM-MSC と UMUC-3 および両細胞で作製した融合細胞の HB1-1~HB1-11 の RNA-Seq 解析を行った。PCA 分析では、融合細胞 HB1-1~HB1-11 (HB1-3 を除く) の遺伝子発現パターンは UMUC-3 よりも BM-MSC と類似し (Fig.4A)、クラスタリング解析から融合細胞は、3 つのグループに分かれる結果となった (Fig.4B)。代表的な融合細胞である HB1-6 と BM-MSC の遺伝子発現を比較した場合 2 倍以上発現が増加する遺伝子は 184 個、逆に発現が減少する遺伝子は 208 個であったが、一方 UMUC-3 と比較した場合は発現増加する遺伝子は 782 個、減少する遺伝子は 533 個と明らかに異なる発現パターンを示した (Fig.4C)。また、BM-MSC と UMUC-3 を比較した場合もほぼ同等の遺伝子で発現変化が見られたことから融合細胞株は BM-MSC により類似していることが明らかとなった。さらに HB1-1~HB1-11 細胞では UMUC-3 に由来する変異型 P53 遺伝子 (c.338T>G ; pF113C) が過剰発現していることが特徴的であった。

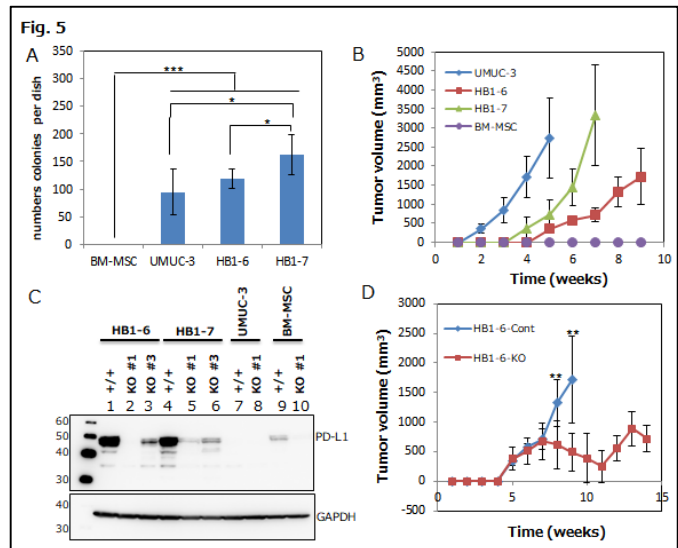


(3) 融合細胞の腫瘍形成能を評価するために、soft agar での足場非依存性増殖能を調べた。BM-MSC は足場非依存的コロニーを形成しなかったが、UMUC-3 と融合細胞 (HB1-6 および HB1-7) は軟寒天培地中で多くのコロニーを形成した (Fig.5A)。2 つの融合細胞 (HB1-6 と HB1-7) ならびに BM-MSC と UMUC-3 を、免疫不全のヌードマウ



スに皮下移植を行い、腫瘍を形成するか 9 週間モニターした。予想通り、UMUC-3 細胞は急速に腫瘍を誘発したが (採取率 100%、n=15) BM-MSC は腫瘍を誘発しなかった (採取率 0%、n=10) (Fig.5B)。また、HB1-6 および HB1-7 は、腫瘍の誘発率が 50% (HB1-6 ; n=10) または 100% (HB1-7 ; n=5) と中程度であった (Fig.5B)。次に、HB1-6 融合細胞の PD-L1 遺伝子を CRISPR-Cas9 でノックアウト (KO) した HB1-6 PD-L1 KO 細胞を作製した (Fig.5C)。この KO 融合細胞を用いて腫瘍形成における PD-L1 の効果を Xenograft により検討した。HB1-6-KO の腫瘍は、接種後 7 週までは HB1-6-cont の腫瘍と区別がつかなかったが、その後 11 週まで HB1-6-KO では顕著な腫瘍の退縮が観察された (Fig.5D)。HB1-6-cont の腫瘍は 9 週後には腫瘍体積が 1700mm³ (n=8) に達したが、PD-L1-KO の腫瘍体積は 490mm³ (n=6) に減少した。このことは、PD-L1 発現レベルが、融合細胞の腫瘍の発生と進行に関与している可能性を示している。

以上の結果により、1) 間葉系幹細胞 (BM-MSC) は膀胱癌細胞 (UMUC-3) の共培養より細胞同士が融合した増殖可能な融合細胞を発生し、その融合細胞は DNA 損傷を伴うゲノム不安定性を示すこと、2) 融合細胞は融合前の BM-MSC や UMUC-3 よりも PD-L1 発現がアップレグレーションされること、3) RNA-seq 解析から融合細胞は UMUC-3 よりも BM-MSC に近い性質を持つこと、4) しかし p53 遺伝子の様に UMUC-3 に由来する遺伝子発現も保持していること、5) 融合細胞は BM-MSC にはない腫瘍形成能を持ち、PD-L1 の発現が腫瘍形成に重要であることを明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田島陽一、芝崎太、正井久雄
2. 発表標題 細胞融合によるPD-L1の発現上昇は腫瘍形成を促進する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会本会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田島陽一、芝崎太
2. 発表標題 異なる性質の間葉系幹細胞とがん細胞との細胞融合の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島陽一、芝崎太
2. 発表標題 マウス生体内でのがん細胞と間葉系幹細胞との自然融合の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし。

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	芝崎 太 (SHIBAZAKI Futoshi) (90300954)	公益財団法人東京都医学総合研究所・病院等連携支援センター・研究員 (82609)	令和2年3月31日 分担研究者を削除。

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