

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15232

研究課題名(和文) ミクロナ「硬さ」から迫るがんが転移しやすい臓器の共通性

研究課題名(英文) Cancer metastasis regulated by tissue stiffness

研究代表者

石原 誠一郎 (Ishihara, Seiichiro)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：10719933

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)：本研究では組織の硬さががん転移に与える影響を明らかにすることを旨とした。硬さの異なる基質上で血管内皮細胞を培養し、血管シートをつくることに成功した。また、様々な硬さの基質をつくるためにコラーゲンに架橋剤であるゲニピンを加えてゲルを作成した。その結果、0.02-10 kPa程度の硬さをもつコラーゲンゲルを作成することに成功した。さらに、In vitroの細胞培養系で転移を評価するためにライブイメージングを行った。その結果、がん細胞が血管シート中に侵入する様子を三次元で経時観察することに成功した。加えて、硬い基質上の血管内皮細胞で高発現し、転移に寄与する可能性のある遺伝子を見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは日本を含む多くの先進国で死因の一位となっている病気である。がんは進行するとがん細胞が様々な臓器に散らばってそこで増殖する。これを転移と呼ぶ。がんの死因の90%以上は転移によるものといわれている。このため、転移を抑制することは効果的ながん治療法になると考えられる。しかしながら転移が起きるメカニズムには未解明な点が多く、転移を抑制するための有効な方法は確立されていない。本研究の成果は、がん細胞が転移しやすい臓器の硬さが存在することを示唆するものである。今後は転移が起きやすい臓器の硬さを明らかにし、それをターゲットとしたがん治療薬を提案する予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether tissue stiffness is critical for metastasis of cancer cells. First, we prepared sheet of blood vessel endothelial cells on substrates with different stiffness. We also prepared collagen gels of different stiffness by treating with genipin, a cross-linker of collagen. We successfully made collagen gels with 0.02 to 10 kPa stiffness. Next, we performed live imaging to observe metastasis in vitro cell culture model. We observed the penetration of cancer cells in a sheet of blood vessel cells by using confocal laser scanning microscopy. We also found three genes up-regulated in blood vessel cells on stiff substrates.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん 転移 腫瘍微小環境 メカノバイオロジー 組織の硬さ 血管内皮細胞 コラーゲンゲル 転移の共通性

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。

1. 研究開始当初の背景

がんは日本を含む多くの先進国で死因の一位となっている病気である。がんは、がん細胞が発生しそれが増殖してがん細胞の塊（原発巣）を形成することにより生じる。がんが進行すると、がん細胞が血管などを通して離れた臓器に移動する。そこでがん細胞が定着・増殖して転移巣を形成する（図1）。がんの死因の90%以上は転移によるものといわれている。このため、転移を抑制することは効果的ながん治療法になると考えられるが、いまだ有効な方法は確立されていない。

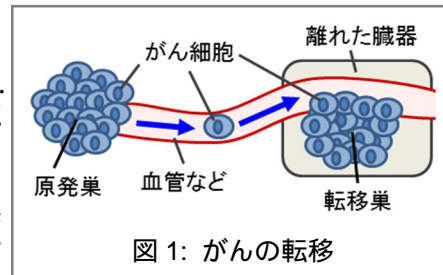


図1: がんの転移

興味深いことに、がんは由来が異なっても共通の臓器に転移する傾向がある。例えば、肺がん・乳がん・卵巣がんは転移しやすいがんの代表例であるが、それらは共通して脳・肺・肝臓・骨に高確率で転移する（図2, Nguyen et al., Nat. Rev. Cancer, 2009 など）。このような転移先の共通性は知られているが、なぜ、由来の異なるがんが共通の臓器に転移するのかは明らかではない。

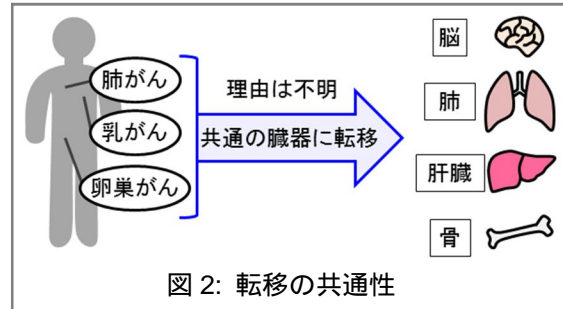


図2: 転移の共通性

2. 研究の目的

本研究では、物理的な特性、特に転移先の臓器の硬さが転移の共通性をもたらすのではないかと、いう仮説を立てた。具体的には、臓器全体の硬さ（マクロな硬さ）ではなく、がん細胞が転移時に接着する血管周囲の硬さ（ミクロな硬さ）が、脳・肺・肝臓・骨において共通しているのではないかと考えた（図3）。そして、がん細胞がその硬さを好んでおり、そこに定着・増殖して転移巣をつくるのではないかと、仮定した。さらに、その際に共通して働く分子があり、その分子を阻害すると肺がん・乳がん・卵巣がん細胞の脳・肺・肝臓・骨への転移を抑えることができると予想した。

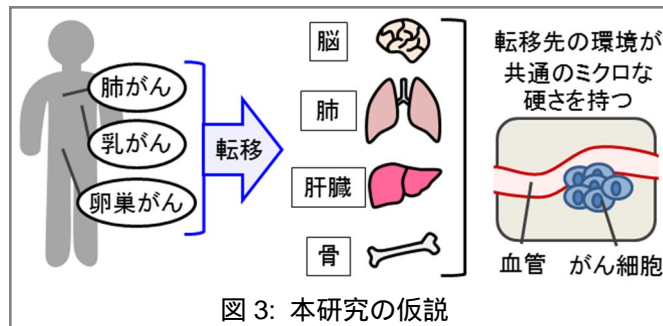


図3: 本研究の仮説

当初は上記の仮説を示すために、臓器の血管周囲の硬さを原子間力顕微鏡で測定する予定であった。しかしながら、原子間力顕微鏡を用いて組織の硬さを計測する際には組織をスライスする必要があり、その際に組織本来の硬さが失われてしまう可能性があることに気付いた。そこでまずは、*In vitro*の細胞培養系において転移モデルを確立し、その実験系を用いて基質の硬さが血管内皮細胞に刺激を与え、その結果としてがん細胞の転移が変化するかどうかを検証することとした。

3. 研究の方法

(1)硬さの異なる基質上での血管内皮細胞（HUVEC）の培養

硬い基質としてガラスまたはプラスチックディッシュのコラーゲンをコートしたものを、軟らかい基質としてコラーゲンゲルを用いた。その上に HUVEC を播種し、細胞密度が 100%になるまで培養した。免疫蛍光染色により VE-cadherin（血管内皮細胞特異的に発現する、細胞-細胞間接着に寄与するタンパク質）を硬い基質上と軟らかい基質上の HUVEC について染色し、すべての細胞-細胞間に VE-cadherin が局在しているかどうかを確認した。これによって HUVEC が互いに接着構造をもち、血管内皮細胞のシート（以下、血管シート）をつくるかどうかを確認した。

## (2)ゲニピンを加えて硬さを制御したコラーゲンゲルの作成

コラーゲンゲルとガラス・プラスチックでは、生体内に存在する様々な硬さを再現することはできない。そこでコラーゲンゲルに架橋剤であるゲニピンを様々な濃度で加えて、硬さのバリエーションをもつコラーゲンゲルをつくることを目指した。作成したゲルの硬さは原子間力顕微鏡により測定した。

## (3)転移能を評価するためのライブイメージング

*In vitro* の細胞培養系で転移能を評価するために、ライブイメージングを行った。まず、血管内皮細胞の細胞-細胞間で発現する VE-cadherin を赤色蛍光標識したタンパク質を発現するためのベクターを作成した。それを HUVEC に強制発現させたのちに株化し、細胞間で赤色蛍光を発する HUVEC を樹立した。それを用いて血管シートを作成し、その上に緑色蛍光タンパク質を発現する肺がん細胞株を播種し、転移の様子をライブイメージングにより観察した。

## (4)硬さの異なる基質上で HUVEC が発現する遺伝子の探索

硬い基質上と軟らかい基質上の HUVEC における発現遺伝子の違いを解析した。転移に寄与することが報告されている分子について qPCR によりスクリーニングを行った。

# 4. 研究成果

## (1)硬さの異なる基質上での血管内皮細胞 (HUVEC) の培養

免疫蛍光染色により硬い基質上と軟らかい基質上の HUVEC において VE-cadherin の局在を確認した。その結果、両者の HUVEC にてすべての細胞-細胞間に VE-cadherin が局在していることを確認した(図4)。加えて、両者の HUVEC は血管内皮細胞に特徴的な単層のシートをつくっていた(図4)。このことから硬い基質上と軟らかい基質上の HUVEC は血管シートをつくることが確認された。

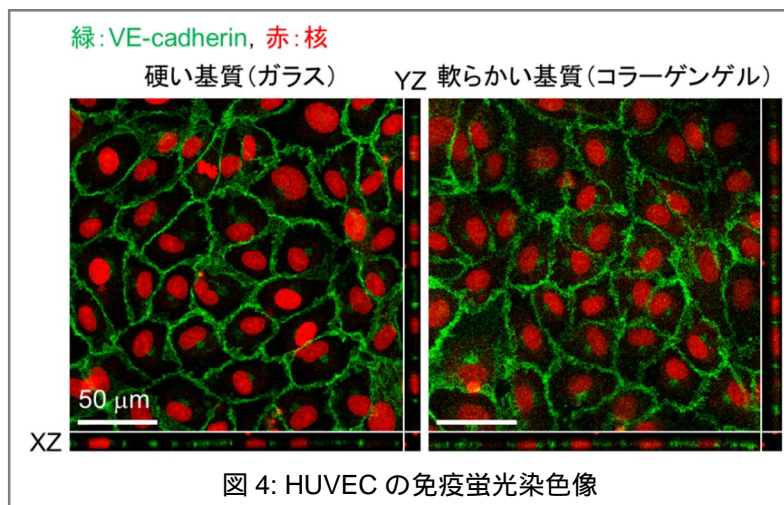


図4: HUVEC の免疫蛍光染色像

## (2)ゲニピンを加えて硬さを制御したコラーゲンゲルの作成

コラーゲンゲルに架橋剤であるゲニピンを様々な濃度で加えて、硬さのバリエーションをもつコラーゲンゲルをつくることを目指した。原子間力顕微鏡でゲルの硬さを測定した結果、ゲニピンの添加によって 0.02-10 kPa 程度の硬さのコラーゲンゲルを作成することに成功した(図5)。また HUVEC はゲニピンを加えたコラーゲンゲル上でも血管シートをつくることが確認した。今後はこのゲルを用いて生体内の硬さを再現し、組織の硬さが転移に与える影響を調べる予定である。

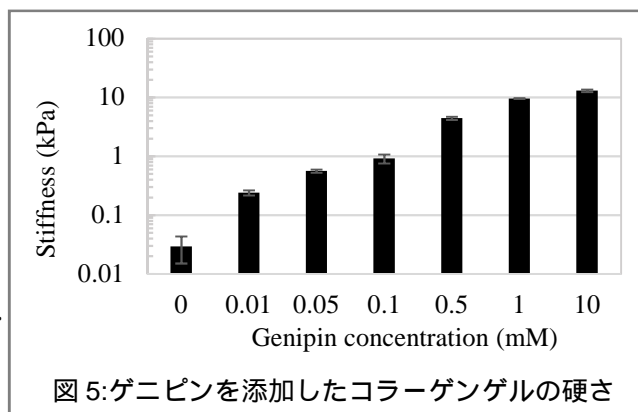


図5:ゲニピンを添加したコラーゲンゲルの硬さ

### (3) 転移能を評価するためのライブイメージング

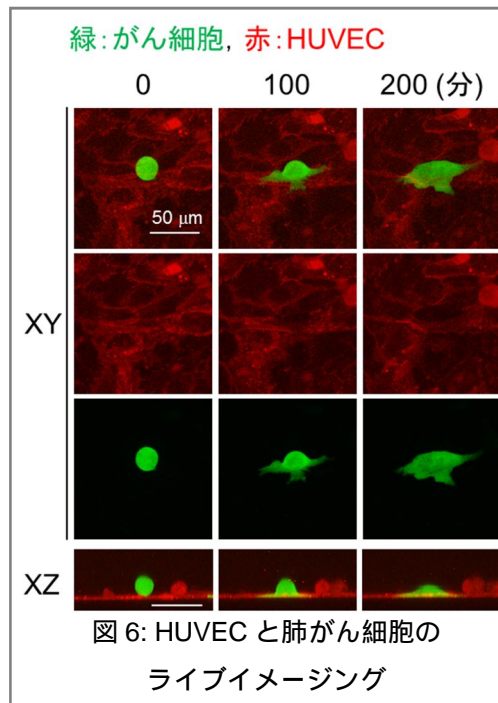
*In vitro* の細胞培養系で転移能を評価するために、ライブイメージングを行った。細胞-細胞間で赤色蛍光を発する HUVEC を用いてコラーゲンコートしたガラス上で血管シートを作成し、その上に緑色蛍光タンパク質を発現する肺がん細胞株を播種した。その後共焦点レーザー顕微鏡を用いて、三次元的に経時観察を行った。その結果、肺がん細胞が血管シートに侵入する様子を三次元的に観察することに成功した (図 6)。

### (4) 硬さの異なる基質上で HUVEC が発現する遺伝子の探索

硬い基質上と軟らかい基質上の HUVEC における発現遺伝子の違いを解析した。転移に寄与することが報告されている分子について qPCR によりスクリーニングを行った結果、硬い足場上の血管内皮細胞で高発現する遺伝子を 3 種類同定することに成功した。

### (5) まとめと展望

以上の通り、がん細胞が血管シートに侵入する様子を *In vitro* でライブイメージングすることに成功し、血管内皮細胞が基質の硬さを認識して発現を変化させる遺伝子の同定に成功した。しかしながら、上記の結果を得た際の血管シートでは血管内皮細胞が激しく運動していたため、*In vivo* の血管の状態を正確に反映していない可能性がある。今後は実験条件を検討し、血管内皮細胞が動かない培養方法を確立するとともに、転移に対する組織の硬さの寄与を調べる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原 誠一郎、温田 晃弘、芳賀 永
2. 発表標題 Transcription factor ATF5 is stretch-responsive in pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 誠一郎、温田 晃弘、芳賀 永
2. 発表標題 転写因子ATF5から迫る膵がん細胞のメカノバイオロジー
3. 学会等名 2019年度先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 誠一郎、温田 晃弘、芳賀 永
2. 発表標題 メカニカルな刺激に対するActivating Transcription Factor 5の応答
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

1. 発表者名 石原 誠一郎、温田 晃弘、芳賀 永
2. 発表標題 伸展刺激はアクチン繊維依存的に膵がん細胞における転写因子ATF5の核局在を増加させる
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 誠一郎、温田 晃弘、芳賀 永
2. 発表標題 メカニカルな刺激に応答する転写因子ATF5
3. 学会等名 第4回日本メカノバイオロジー学会学術大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----