

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16757

研究課題名(和文)スフェロイド形成細胞の形態変化に着目した、卵巣癌腹膜播種進展の病態解明と治療開発

研究課題名(英文)Elucidation of peritoneal dissemination and exploration of novel therapeutics of ovarian cancer focusing on the morphological changes of spheroid-forming cell

研究代表者

田口 歩 (Taguchi, Ayumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60756782

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)：マウス卵巣癌細胞株であるID8にKRAS遺伝子を導入した結果、ID8-KRASにおいてマウス腹腔内でスフェロイド形成が促進されることを確認した。また、ID8-KRAS細胞で活性化していたRAS-RAF-MEK経路の阻害剤であるTrametinibを使用することでスフェロイド形成は抑制され腹膜播種形成は有意に阻害された。

次に、スフェロイド形態で発現上昇したCXCL17のノックダウン細胞株shCXCL17-ID8-KRASを作成し、腹腔内環境を検討した。その結果、shCXCL17-ID8-KRAS株では、骨髄由来免疫抑制細胞の腹腔内への誘導が抑制され、有意な腹膜播種形成阻害を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、卵巣癌腹膜播種形成には腹腔内でのスフェロイド形成が重要であることを示し、また、KRAS変異がスフェロイドの安定化に寄与し、播種形成を促進することを見出した。スフェロイド形成を促進する遺伝子変異をターゲットとすることで、卵巣癌の播種進展を阻害できる可能性を示し、今後の卵巣癌治療方法の発展に寄与した。また、本研究は、がん遺伝子変異とその形態変化に伴うケモカインの発現変化が、腹腔内環境を調整し癌進展に関連している可能性を示した。この知見は、今後のがん遺伝子変異と腫瘍内微小環境を統合した治療戦略の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In vivo spheroid-formation was significantly increased in the KRAS-transfected ID8 cells (ID8-KRAS). Comprehensive cDNA microarray analysis revealed that some genes partially regulated by the MEK-ERK pathway were upregulated only in ID8-KRAS cells in 3D culture. A MEK inhibitor, trametinib, dramatically improved the prognosis for mice with ID8-KRAS tumors in an in vivo mouse model. We next focused on a chemokine, CXCL17, which was upregulated in spheroid cells and established shRNA knockdown ID8-KRAS cells. shCXCL17-ID8-KRAS cells significantly suppressed peritoneal disseminations accompanied by the decreased number of peritoneal myeloid derived suppressor cells (MDSC).

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 スフェロイド KRAS CXCL17 腫瘍内微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は進行期に発見されることが多く、中でも「腹膜播種」は卵巣癌における最も多い転移 / 進展形式である。腹膜播種を伴う Stage III 期の卵巣癌は、手術や抗がん剤を組合せた集学的治療を行っても 5 年生存率 50% 以下と、非常に予後不良である。

卵巣癌は、腹腔内では浮遊状態で「スフェロイド」と呼ばれる集合体を作って存在し、腹膜播種進展をすることが知られている。一方、スフェロイド形成のメカニズムについては未だ十分解明されていない。近年、卵巣癌細胞が tumor-associated macrophage (TAM) や myeloid-derived suppressor cell (MDSC) と複合体を作ることによって、安定したスフェロイド状態を維持していることが報告された (*J Clin Invest*, 2016)。TAM や MDSC は抗腫瘍免疫を抑制するのみならず、スフェロイドの安定性向上を介しても卵巣癌進展に寄与していることが初めて解明された。また、スフェロイド培養は癌幹細胞培養モデルとしても注目されており、スフェロイド形成に伴う、免疫回避機構の獲得やアポトーシス耐性機序の獲得について近年盛んに研究が行われている。スフェロイド形成の機序やスフェロイド形成に伴う細胞内調整機構を解明して行くことで、卵巣癌の腹膜播種進展の機序解明や、有効な予防法 / 治療法の開発に繋がると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍細胞の形態変化に伴う細胞内 / 細胞間分子機構を調査し、卵巣癌腹膜播種進展の機序解明および治療戦略の基盤構築を目的とした。

3. 研究の方法

1. in vitro スフェロイドモデルの作成および解析:

スフェロイドモデルの作成とスフェロイド形成能の評価

Low attachment plate を用いることで、腹腔内の浮遊状態を模倣した 3 次元スフェロイド培養が可能となる。まずは、この系におけるマウス卵巣癌細胞株である ID8 と、ID8 にがん遺伝子 (KRAS) 変異を導入した株 (ID8-KRAS) のスフェロイド形成の程度や、スフェロイド培養における細胞増殖能について検討した。

スフェロイド形成における細胞内シグナルの解析

スフェロイド形成時の細胞内シグナルを、cDNA マイクロアレイを用いて比較検討した。

スフェロイド形成による代謝調整機構の解明

スフェロイド状態における癌遺伝子と代謝調整機構の関連を調査した。

2. in vivo マウスモデルの作成:

マウス卵巣癌細胞株 ID8 と ID8-KRAS を同系マウスに移植し、マウス腹膜播種モデルを作成した。

In vivo スフェロイド形成細胞の解析

In vivo の系からスフェロイド形成細胞を単離し、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行い、*in vitro* におけるスフェロイドとの遺伝子発現プロファイルを比較した。

癌遺伝子のスフェロイド促進作用および、その特異的阻害剤についての検討

がん遺伝子が腹腔内におけるスフェロイド形成や播種形成に及ぼす影響を検討するとともに、そのがん遺伝子により活性化したパスウェイを阻害することでスフェロイド形成および播種形成に与える影響を検討した。

3. CXCL17 ノックアウト (ノックダウン) モデルの検討

我々は本研究において、スフェロイド形成に伴って CXCL17 が発現上昇することを見出した。これにより、「細胞形態変化に伴う CXCL17 の発現上昇 TAM や MDSC の遊走 スフェロイ

ドの安定性増大 腹膜播種進展」という仮説が成立する(図1)。

これを証明するため、shRNA 技術を用いた CXCL17 ノックダウン株や CRISPR-Cas9 技術を用いた CXCL17 ノックアウト株を作成し、腹膜播種進展への影響を検討した。また、ノックアウト株における腹腔内/スフェロイド内微小環境を、TAM や MDSC に着目して評価した。

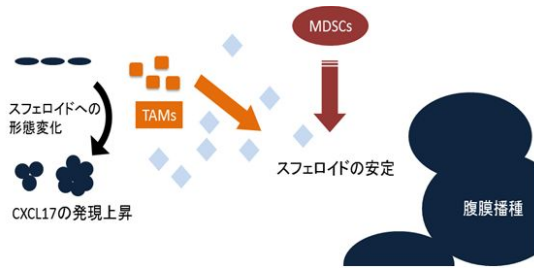


図1. 形態変化に伴う微小環境の変化(仮説)

4. 研究成果

マウス卵巣癌細胞株である ID8 に KRAS 遺伝子を導入した結果、ID8-KRAS において腹腔内でスフェロイド形成が促進されることを確認した(図2)。次に、がん遺伝子の有無と、形態変化によって発現が変化する遺伝子群を検討するためにマイクロアレイ検査を行った。その結果、ID8 細胞と ID8-KRAS 細胞は monolayer における 2 次元培養(2D)では遺伝子発現にほとんど

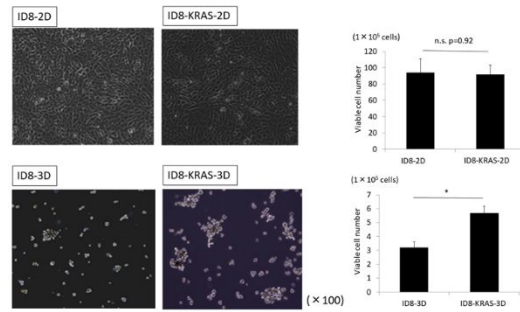


図2. KRAS変異導入に伴う2Dと3D培養における細胞増殖への影響

差を認めなかったのに対し、スフェロイドを形成する 3 次元培養(3D)においては顕著な遺伝子発現変化を認めることを見出した。特に、3D になった際に、ID8-KRAS 細胞では RAS-RAF-MEK 経路の活性化が顕著であることを見出した。また、この経路の阻害剤である Trametinib を使用することで *in vitro* におけるスフェロイド形成の有意な阻害を認めるとともに、マウスモデルにおける腹膜播種形成を有意に阻害した(図3, BMC Cancer, 2018)。

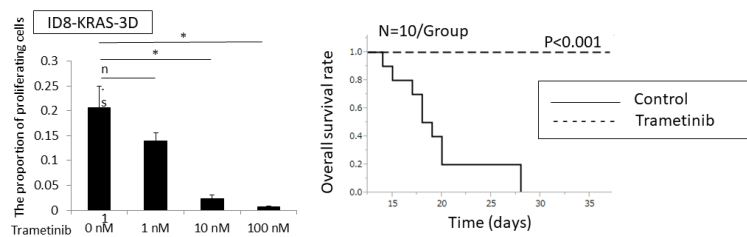


図3. ID8-KRASのスフェロイド形成や卵巣癌マウスモデルにおけるTrametinibの効果

また、上記で実施したマイクロアレイの検討より、スフェロイド形態におけるグルタミン代謝経路の活性も認めた。このため、スフェロイド培養には特にグルタミンが必須である可能性を考慮して、グルタミン欠乏培地での 3D 培養を行った。この結果、ID8-KRAS ではグルタミン欠乏培地での顕著なスフェロイド形成阻害を認めた。このことより、スフェロイド状態での増殖にはグルタミンが不可欠であることが示唆された。

次に、スフェロイド形態になった際に発現上昇するケモカインである CXCL17 に着目して検討を行った。CXCL17 はマクロファージなどのケモカインであることが知られている。まず、*in vivo* における CXCL17 の発現を検討した。その結果、*in vivo* における浮遊状態の細胞では、CXCL17 の発現上昇を認めることがわかった(図4)。また、ID8-KRAS 株に

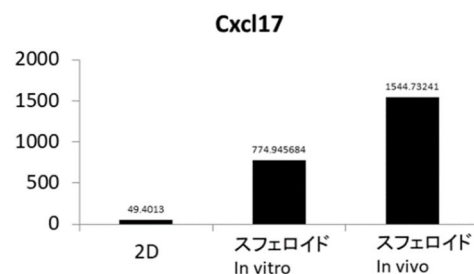


図4. 各状態のID8-KRASにおけるCXCL17発現

において、CXCL17 ノックダウンを作成するために、shRNA 技術を用いて、shCXCL17 細胞株を作成した。作成した shCXCL17-ID8-KRAS 株を用いて、*in vivo* における腹膜癌モデルの検討を行った。その結果、shCXCL17-ID8-KRAS 株では有意な腹膜播種形成阻害を認めた。ただし、

shCXCL17-ID8 細胞株においては腹膜播種形成に違いは認めなかった。次に ID8-KRAS 細胞と shCXCL17-ID8-KRAS 細胞を用いて、腹腔内環境の変化を検討した。ID8-KRAS 細胞由来の腹膜播種形成に伴い、腹腔内の CD11b+Ly6G+Ly6C^{low} 陽性 MDSC の割合が増加するが、この MDSC 分画の増加は、shCXCL17-ID8-KRAS 株では有意に抑制されることが分かった (図 5)。

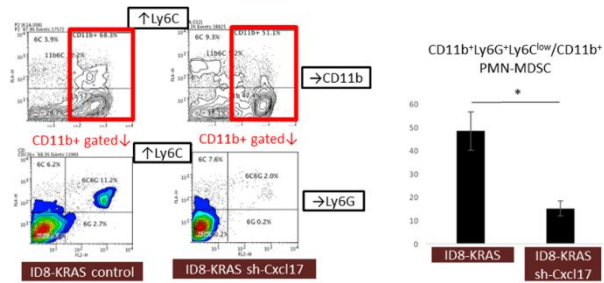


図 5. CXCL17ノックダウンによる腹腔内MDSCの変化

次に申請者らは、ID8 株における CXCL17 ノックダウン形質変化の違いを検討するために、ELISA 法を用いて CXCL17 濃度を検討したところ、shCXCL17-ID8 株由来の腹水でも CXCL17 発現を認めることがわかった。この結果より、ID8 株においては shRNA 技術では、CXCL17 のノックダウンは不十分であった可能性が示唆された。このため、申請者らは CRISPR-Cas9 技術を用いて CXCL17-ノックアウト株 (CXCL17-KO 株) の作成に取り組んだ。しかし、ID8 株ではミスマッチ導入効率が低く、ホモ CXCL17-KO 株の作成に至らなかった。上記結果より、少なくとも、ID8-KRAS 株においては、CXCL17 ノックダウンが腹膜癌形成を抑制し、またその機序の一つとして、MDSC の遊走を抑制している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogishima Juri, Taguchi Ayumi, Kawata Akira, Kawana Kei, Yoshida Mitsuyo, Yoshimatsu Yuki, Sato Masakazu, Nakamura Hiroe, Kawata Yoshiko, Nishijima Akira, Fujimoto Asaha, Tomio Kensuke, Adachi Katsuyuki, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kiyono Tohru, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 The oncogene KRAS promotes cancer cell dissemination by stabilizing spheroid formation via the MEK pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-018-4922-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Mitsuyo, Taguchi Ayumi, Kawana Kei, Ogishima Juri, Adachi Katsuyuki, Kawata Akira, Nakamura Hiroe, Sato Masakazu, Fujimoto Asaha, Inoue Tomoko, Tomio Kensuke, Mori Mayuyo, Nagamatsu Takeshi, Arimoto Takahide, Koga Kaori, Hiraike Osamu, Oda Katsutoshi, Kiyono Tohru, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 53
2. 論文標題 Intraperitoneal neutrophils activated by KRAS-induced ovarian cancer exert antitumor effects by modulating adaptive immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1580-1590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Satoshi, Hirota Yasushi, Ueno Toshihide, Taguchi Ayumi, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13708-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aotsuka Aeri, Matsumoto Yoko, Arimoto Takahide, Kawata Akira, Ogishima Juri, Taguchi Ayumi, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Mori Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Oda Katsutoshi, Kawana Kei, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 110
2. 論文標題 Interleukin 17 is associated with expression of programmed cell death 1 ligand 1 in ovarian carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3068 ~ 3078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻島樹里、田口歩、川名敬、吉田光代、河田啓、佐藤雅和、富尾賢介、足立克之、永松健、織田克利、大須賀穰、藤井知行
2. 発表標題 CXCL10 works as a tumor promoter in tumor microenvironment in ovarian cancer
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河田 啓、田口 歩、荻島 樹里、吉田 光代、中村 寛江、佐藤 雅和、富尾 賢介、足立 克之、織田 克利、川名 敬、大須賀 穰、藤井 知行
2. 発表標題 CXCL17, as a key regulator of microenvironment, promotes peritoneal dissemination in ovarian cancer
3. 学会等名 第70回 日本産科婦人科学会 学術講演会
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
---------------------------	-----------------------	----