

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17172

研究課題名(和文) 休眠状態にある骨髄播種癌細胞の包括的理解による転移・再発メカニズムの解明と制御

研究課題名(英文) Elucidation and regulation of the metastasis mechanism based on tumor dormancy of bone marrow disseminated tumor cells

研究代表者

中村 拓哉 (NAKAMURA, TAKUYA)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：80761212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄に播種された骨髄播種癌細胞(BM-DTC)は、休眠状態に保たれていることによって、通常の治療法に抵抗性を示し、その存在は再発・転移の強力な危険因子である。我々は、細胞増殖抑制状態で、抗癌剤治療抵抗性を示す、BM-DTC株を樹立した。マイクロアレイ解析を行ったところ、高Src活性に関連する可能性がある、EPHA3という因子がBM-DTCの休眠状態の維持に関与している可能性を示した。次にBM-DTC内のクローンの隔たりの有無を検討した。BM-DTCのクローンは親株のクローンと全く異なる分布を示した。BM-DTCのクローンは骨髄での停留、維持に重要といわれているCXCR4の高発現を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌による死因のほとんどは転移再発を原因とする。治療により臨床的治癒を認めた例でも、その数か月から数十年後に転移再発をすることが臨床的に大きな問題となっている。その原因として治療後も残存している微小癌細胞集団が原因として考えられその検出、制御が大変重要である。その微小残存癌細胞が認められる臓器として骨髄が多数報告されているため、我々は骨髄播種癌細胞の研究を行った。我々が樹立した骨髄播種癌細胞株は、休眠状態を示す性質を有しており、原発巣内の細胞とは大きく異なる特徴を示している。今後その特性をさらに解析することによって癌の転移・再発に非常に重要な微小残存腫瘍の検出、制御に大きく寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：Dormant disseminated tumor cells(DTC) in bone marrow(BM) are resistant to conventional therapy in several cancers. The abundance of these cells at the time of surgery or after treatment directly correlates with reduced metastasis-free survival. We established BM-DTC. We used the human cell line HEP3-originated sublines (i.e. parental line (P-HEP3), BM-DTC-derived (BM-HEP3), and lung metastases-derived sublines (Lu-HEP3)). BM-DTCs were intrinsically slow-cycling and were resistant to an anticancer drug. Next, we performed microarray analysis of these cells. Gene expression pattern in BM-HEP3 was distinct from P-HEP3 and Lu-HEP3. Our data indicated overexpression of EPHA3 in BM-DTC. Src activation maintained from EPHA3 may be important for survival of dormant or slow-cycling BM-DTC. We performed clonality analysis of these cells. Clone of BM-DTC was distinct from other clone. CXCR4 reported a central role in BM homing was much higher in clone of BM-DTC than that in the other clone.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：微小残存腫瘍 骨髄環境 抗癌剤耐性 休眠状態 細胞周期停止 クローナリティ パーコード配列 放射線治療耐性

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌による死亡のほとんどは転移・再発によるものである。そして、癌細胞が明らかな病変を形成する以前の無症候性かつ検出不可能な期間を「Tumor dormancy(がんの休眠状態)」と呼ぶ。そのような休眠状態に保たれた腫瘍細胞が、なんらかの要因により増殖開始することで致死的な再発や転移に至る(Aguirre-Ghiso, Nat Rev Cancer 2007)。したがって、Tumor dormancyのメカニズムの解明とその制御が癌治療においてとても重要であると考えられている。

また、腫瘍進展の早期より癌細胞は播種癌細胞(Disseminated tumor cell: DTC)として全身に散布されていることが知られている。興味深いことに様々な癌種の患者において、DTCsに起因する「微小残存腫瘍」が骨髄(Bone marrow: BM)において高頻度に観察される(Aguirre-Ghiso, Nat Rev Cancer 2007)。骨髄穿刺液中に認められるDTCsは、そのほとんどが増殖マーカー(Ki-67など)陰性であるにもかかわらず(Klein, Curr Opin Genet Dev 2010)、手術時や治療終了の時点におけるBM-DTCsの存在が、その後の無転移生存率と密接に関連している(Partridge et al. Clin Cancer Res. 2003)。注目すべきことに、この統計学的な関連性は、骨転移を来すことが比較的稀な頭頸部扁平上皮癌(head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC)などの癌種においても共通して認められる(Gath et al. Cancer Metastasis Rev. 1999)。

これらの知見から、BM-DTCsはある一定の期間、機能的に細胞周期が静止した“休眠状態(Tumor Dormancy)”を維持しており、なんらかのきっかけにより転移巣の形成を開始すると考えられる。さらに、BMは他の臓器での転移・再発を引き起こすような癌細胞の供給源となっていると考えられている。このような休眠状態にある微小残存腫瘍は、現状では臨床的に検出することが不可能である。以上の理由から、BM-DTCsの検出や制御が癌の治療を目指すにあたって極めて重要である。

### 2. 研究の目的

上記背景に示した通り、骨髄におけるBM-DTCの存在ががんの再発・転移や、それに伴う生存率の低下、治療耐性に大きく関わっており、その検出や制御が非常に重要である。

BM-DTCsや転移細胞の自律的性質と微小環境要因の統合的な理解を通して、休眠状態にある微小残存腫瘍に対する新規診断・治療法の開発に期待が持てるため、本研究では、BM-DTCs及びその他の嗜好株の更なる解析を通して、骨髄をはじめ各臓器におけるDTCの自律的特性や選別過程の解明を目的として研究を行っていった。

### 3. 研究の方法

#### 【1. In vivo selection 法にて樹立したBM-DTC株の解析】

申請者は休眠状態もしくは増殖抑制状態にあるBM-DTCsの特異的性質を解明するために、BMおよび肺のDTCに由来する細胞株をそれぞれ樹立した。HNSCC細胞であるHEp3細胞は、マウスや鶏卵モデルにおいて多臓器転移を呈するが、骨転移は形成せず、BMに播種したHEp3細胞は、HNSCC患者の臨床象を反映するように、ほぼ100%休眠状態を保つことが知られている。HEp3細胞をマウスの皮下に移植し、移植部位から分離したHEp3細胞を親株としてP-HEp3と名付けた。また一方で、BMおよび肺からそれぞれDTCsを分離した。それら2種類のDTCsをそれぞれディッシュ上で培養し、再度それぞれをマウスの皮下に移植した。これらのマウス皮下移植からDTCs分離の過程は、5回繰り返し行った。5回目の移植の際にBM、肺から分離したDTCsを、BM-Hep3、Lu-HEp3と名付けた。これらの3株を比較することで、BM-DTC特有の性質の解明を試みた。

#### 【1-a. マイクロアレイ解析結果に基づくBM-DTCに特徴的な因子の解析】

樹立した3株をそれぞれマイクロアレイ解析を行った。その中でBM-DTCに高発現が認められたEPHA3について検討した。骨髄環境での細胞生存に関わるSrc活性の阻害剤としてダサチ

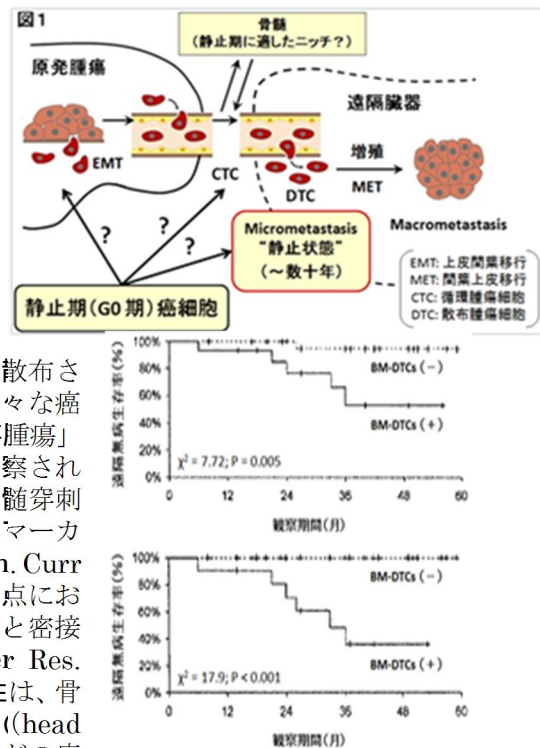


図2 OSCC患者 BM-DTCs と予後との関連

ニブを用いて検討を行った。

【1 - b . BM-DTC の放射線治療耐性についての検討】

申請者は先行研究により樹立した BM-DTC s ( BM-HE p 3 ) が放射線治療に対して耐性をもつのかどうか、他の細胞株と比較することで検討した。放射線照射には 150-KVp X 線照射器 ( Model MBR-1520R, Hitachi ) を用いた。

【2. DTC のクローナリティー解析】

本研究では、DNA バーコーディングという手法をもちいて、休眠 DTC のクローナリティー解析を行った。ClonTracer Library という 100 万パターン以上の DNA バーコードライブラリーを用いて、癌細胞 1 つ 1 つのゲノム DNA にそれぞれ異なったバーコードと呼ばれる名札となるような 30 塩基の配列を組み込んで、各細胞ごとに追跡できるようにした。まず 1 細胞 1 バーコードとなるようなウイルス感染効率を決定して、感染させた細胞をマウスに移植し、移植腫瘍が増大してきたのちに、骨髄と移植腫瘍、末梢血液、肺などを摘出して、それらからゲノム DNA を抽出し、ライブラリー作成後、次世代シーケンサーを用いて各臓器のバーコード配列の割合について分析した。

今回の検討ではマウスで明らかな転移巣を形成しないヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株である SAS 細胞株を用いた。まず、この SAS 細胞にバーコード標識をして 5 匹のマウスの頬粘膜に移植した。1 ヶ月後に移植腫瘍、肺、骨髄、末梢血を採取し、DNA を抽出し、次世代シーケンサー解析を行った。また、移植時を before とし、そのバーコード集団を dish 上で継続的な培養を行い、after とし、合わせて同様に解析を行った。以降は、移植腫瘍を P、肺を Lu、末梢血を CTC、骨髄を BM と表記する。

4 . 研究成果

【1 . In vivo selection 法にて樹立した BM-DTC 株の解析】

申請者は休眠状態もしくは増殖抑制状態にある BM-DTCs の特異的性質を解明するために、BM および肺の DTC に由来する細胞株をそれぞれ樹立した。これらの株を比較することで、BM-DTC 特有の性質の解明を試みた。その中で、BM-HEp3 細胞株が、他の二株より、増殖抑制状態でありなおかつ抗癌剤耐性であることを見出した。さらに BM-HEp3 のそのような性質は、BM-DTC 自身が有する CXCR4-SDF-1-TGFβ-2 のポジティブフィードバック機構によって制御されていること突き止めた ( Nakamura et al. Oncotarget 2015 )

【1 - a . マイクロアレイ解析結果に基づく BM-DTC に特徴的な因子の解析】

樹立した 3 株をそれぞれマイクロアレイ解析を行った。興味深いことに BM-DTC はマイクロアレイ解析において親株及び Lu-HEp3 とは異なる特徴的な遺伝子発現をしていた。その中で、BM-DTCs で高い遺伝子発現を認めた EPHA3 に着目した。EPHA3 は、mRNA でもタンパクレベルでも BM-HE p 3 において高発現を認めた。EPHA3 は骨髄環境での細胞生存に必要と報告されている Src 活性との関連が報告されている ( Zhang et al, Cancer Cell 2009. ) EPHA3 の高発現が Src 活性の阻害剤であるダサチニブの感受性に関連することが報告されている ( Sos et al, J Clin Invest 2009. ) 3 株にダサチニブを添加したところ、BM-HEp3 においてのみ細胞生存能の低下を認めた。Src 活性が増殖抑制状態にある BM-DTC の骨髄環境での生存に重要である可能性が考えられた。

【1 - b . BM-DTC の放射線治療耐性についての検討】

申請者は先行研究により樹立した BM-DTC s ( BM-HE p 3 ) が放射線治療に対して耐性をもつのかどうか、他の細胞株と比較することで検討した。3 株にそれぞれ放射線を照射し生存した細胞数を比較したところ、3 株において有意な差は認めなかった。放射線治療耐性に関しては DTC の細胞自身の特性だけではなく、骨髄における環境因子が関与している可能性を考えた。そこで先行研究で検討した、CXCR4-SDF-1-TGFβ-2 のポジティブフィードバック機構によって制御されている可能性を考え、CXCR4 阻害剤添加、TGFβ-2 の発現抑制をそれぞれ行い、放射線照射を行ったが有意な差は認めなかった。その他の骨髄における環境因子や放射線耐性に関わるとされている因子を検討していく予定である。

【2. DTC のクローナリティー解析】

まず、全マウスで共通して移植部位に生着できたクローンの数は 82 クローンだった。その 82 クローンを対象として、各組織におけるクローン分布をみるために、主成分分析を行い、各組織でのクローン分布の特徴を検討したところ、まず、in vitro サンプルと移植巣の分布は近似しており、Lu と CTC は同じ分布を示した一方で、注目すべきことに BM は特有の分布を示した。

クローン一つに絞って解析すると、BM で最も

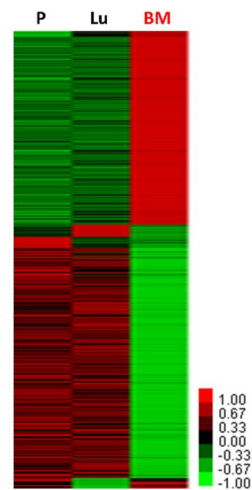


図4 マイクロアレイ解析結果

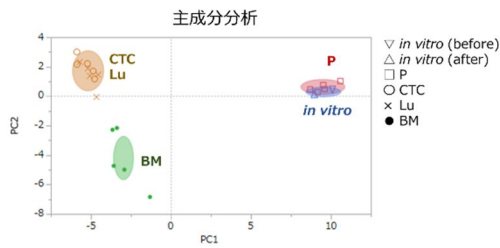


図5 各組織におけるクローン分布



多いクローンは多臓器ではマイナーなクローンであった。また、CTC で最も多いクローンは P では稀少なクローンで、Lu や BM にも多く存在していた。次に、そのような臓器特異的に存在するクローンを、どのような細胞に由来しているかを明らかとするため、バーコードを組み込んだ直後の SAS をシングルセルソートし、それぞれ培養し、32 種類の異なるバーコードのクローンを樹立した。それらを均等に混合してマウスに移植し、同様にクローナリティ解析を行った。このアプローチにより、優勢クローンとして同定されたクローンの機能解析が可能となった。クローナリティ解析の結果、図 6 に示す通り BM で突出して優勢な、クローンを同定することができた (クローン H)。このクローンは、P すなわち移植巣ではほとんど存在しない稀なクローンであるということも同時に分かった。

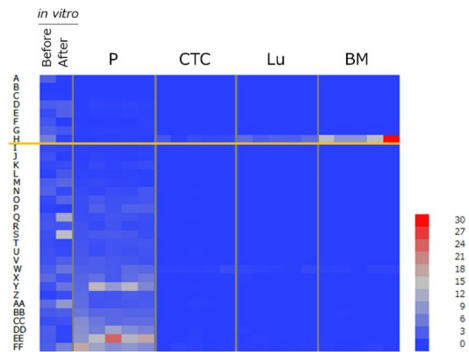


図 6 各組織における各クローンの分布

CXCL12-CXCR4 シグナリングは、造血幹細胞や癌細胞の骨髄へのホーミングに重要であることがよく知られている。すなわち、癌においては、CXCR4 を高発現する癌細胞は、骨髄で豊富に存在する CXCL12 に向かってホーミングする。先行研究でも、BM-DTC 自身が有する CXCR4-SDF-1-TGF- $\beta$ 2 のポジティブフィードバック機構によって制御されていること突き止めた (Nakamura et al. Oncotarget 2015) そこで、まず我々は同定したクローンにおける CXCR4 の遺伝子発現を解析したところ、このように、クローン H は SAS の親株や他の 31 クローンに比較して、とびぬけて CXCR4 発現が高いということが確認された。

本研究から、原発巣で稀少なクローンが、骨髄でドミナントであるという結果が得られた。このことから、まず特有の自律的性質を持つ癌細胞が骨髄へ播種・潜伏しやすいと考えられた。特に、骨髄における最優勢クローンは、CTC でも稀少であったことから、骨髄生着過程での選別の影響が大きいと考えられた。本研究で、クローン H という、骨髄で潜伏しやすい癌細胞の起源細胞を同定することができた。今後は、このクローンを解析していくことで、骨髄での休眠潜伏を引き起こす癌細胞の分子マーカーや治療標的の開発に寄与するのではないかと考えている。

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 中村拓哉
2. 発表標題 TGFb2-SDF-1-CXCR4シグナルが骨髄播種癌細胞の抗癌剤耐性と増殖抑制に関与している
3. 学会等名 第63回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 前城学
2. 発表標題 骨髄に潜伏する播種性癌細胞の特性の解析
3. 学会等名 第63回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 前城学
2. 発表標題 骨髄に潜伏する播種性癌細胞の特性の解析
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 前城学
2. 発表標題 骨髄播種性休眠癌細胞の分子特性の解析
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 前城学
2. 発表標題 骨髄で休眠を呈する播種性癌細胞播種癌細胞の特性の解析
3. 学会等名 第30回日本臨床化学会九州支部総会
4. 発表年 2019年～2020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
研究協力者	松井 啓隆  (Matsui Hirotaka)		
研究協力者	神力 悟  (Shinriki Satoru)		