

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19488

研究課題名（和文）非がん細胞に依存した、がん細胞の浸潤機構の解明

研究課題名（英文）Fibroblast-dependent cancer cell invasion

研究代表者

石井 源一郎（Genichiro, Ishii）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長

研究者番号：00270869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：線維芽細胞の有無によるがん細胞の浸潤様式を検討した。その結果、1）線維芽細胞存在下においては、ECMに沿ってがん細胞が浸潤すること、2）線維芽細胞の存在により、がん細胞の浸潤が促進していること、が明らかになった。次に、線維芽細胞存在下と非存在下におけるがん幹細胞（Podoplanin陽性）の浸潤について検討した。線維芽細胞非存在下において、がん幹細胞と非がん幹細胞の浸潤に差を認めなかった。しかしながら、線維芽細胞存在下において、がん幹細胞は非がん幹細胞と比較して高い浸潤能を示した。これらの結果から、がん幹細胞と線維芽細胞の間に、がん幹細胞の浸潤を促進する相互作用が存在している事を示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般にがん幹細胞は高い浸潤・遊走能を持つとされているが、本検討では線維芽細胞依存的な浸潤においてのみ、がん幹細胞の浸潤が促進されていた。このことは、がん幹細胞を標的とする治療法を考える上では、がんの微小環境、すなわち、非がん細胞である間質細胞の存在をも考慮すべきであることを示している。

研究成果の概要（英文）：To clear whether podoplanin-positive cancer stem cells in squamous cell carcinoma have higher invasion activity during a fibroblasts-dependent invasion, we performed a collagen gel invasion assay using fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator-labeled A431 cells. The total number and number of invading cells in S/G2/M phase were counted using time-lapse imaging cocultured with fibroblasts. There was no significant difference between the number of invading podoplanin-positive and negative A431 cells when fibroblasts did not exist. On the contrary, the number of invading podoplanin-positive cells was significantly higher when fibroblasts existed. Knockdown of podoplanin decreased the number of invaded A431 cells significantly when fibroblasts existed. Podoplanin-positive A431 cells display higher invasion activity when fibroblasts exist, suggesting that some biological functions of cancer stem cells might become evident only within the fibrous tumor microenvironment.

研究分野：病理学

キーワード：線維芽細胞 がん幹細胞 浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織は形態学的にも生物学的にも不均一ながん細胞から構成されていることが知られている。我々はがん組織の線維芽細胞を用いたがん細胞浸潤モデルを新たに開発し、時間的・空間的に詳細な観察を行うことにより以下の知見を得た。1) 大半のがん細胞は、線維芽細胞が細胞外マトリックス(ECM)内を浸潤することにより形成されたトンネルの中を浸潤する、2) トンネル内を浸潤するがん細胞の数は、線維芽細胞の種類に依存している。上記の現象より、線維芽細胞が形成するトンネルの生物学的特性が、がん細胞の浸潤能を規定している、との仮説を立てた。がん細胞の浸潤能は、がん細胞自身が有する生物像により規定される、と考えられてきた。しかしながら、本研究は全く逆の発想であり、がん生物像の理解に全く新しい概念を提示する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) がん細胞の浸潤を規定するトンネルの生物学的特徴(組成に関わる特徴も含む)を解明し、2) 生体内で起きている真のがん細胞浸潤機構を分子レベルで明かにすること、である。本仮説が証明された時には、がん生物像の理解に全く新しい概念を提示し、がん治療に対する戦略も大きく変わる。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞依存的ながん細胞の浸潤像の特徴を明らかにするため、A431-Fucci 細胞(細胞周期の indicator 導入細胞)を用いて collagen invasion assay を行った。

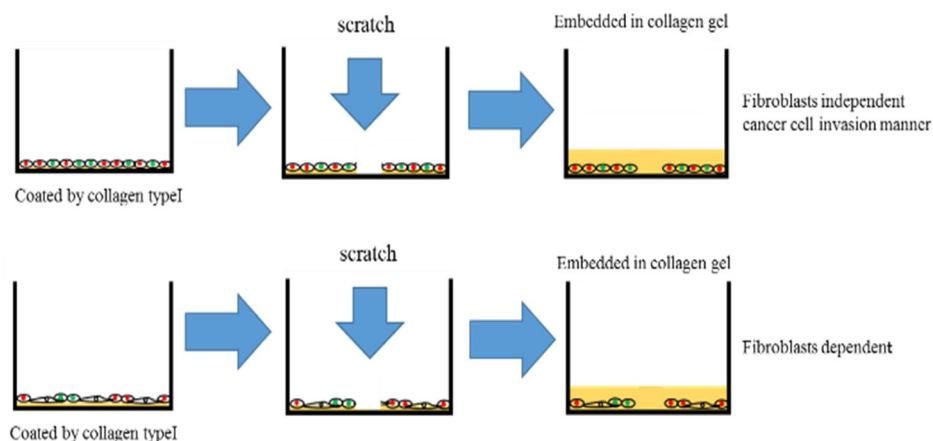
(2) がん幹細胞の浸潤像の特徴を明らかにするため、Podoplanin 陽性 A431 細胞(がん幹細胞)と陰性 A431 細胞における、線維芽細胞依存的、非依存的な浸潤において浸潤細胞数、浸潤様式、細胞周期の解析を行った。

(3) Podoplanin 分子の発現抑制(がん幹細胞における内因性因子の抑制)を介して、線維芽細胞依存的ながん細胞の浸潤における Podoplanin の機能を検討した。

4. 研究成果

本研究で用いられている Collagen invasion assay を以下に記す。

上段は、線維芽細胞非依存的浸潤のモデル、下段は、線維芽細胞依存性浸潤のモデルである。



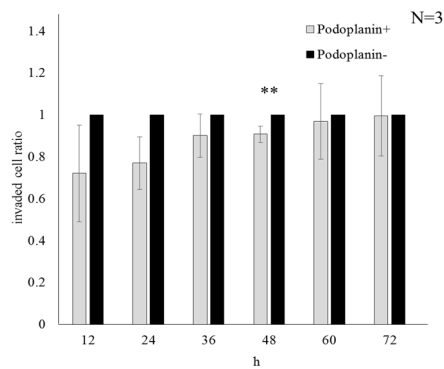
1-A: Time-lapse imaging を行い、浸潤細胞数、浸潤様式、細胞死、細胞周期の解析を行った。線維芽細胞との共培養群では、単独群と比較して癌細胞の浸潤が促進されていた。次に浸潤様式を大きく A) 非浸潤部から連続性の浸潤、B) 非連続性でかつ6細胞以上からなる胞巣、C) 非連

続性かつ5細胞以下からなる胞巣、に分類した。線維芽細胞依存的な浸潤ではB), C)の浸潤様式が有意に多かった。

1-B: 次に浸潤細胞の細胞死の頻度を算出した。線維芽細胞依存的な浸潤と非依存的な浸潤における apoptotic ratio を比較すると、細胞死を起こす頻度に差が無かった。

1-C: 浸潤部における癌細胞の細胞周期について Fucci の蛍光を基に解析した。線維芽細胞非依存的な浸潤と比較して線維芽細胞依存的な浸潤では、60 時間以降で増殖期の癌細胞の割合が高かった。

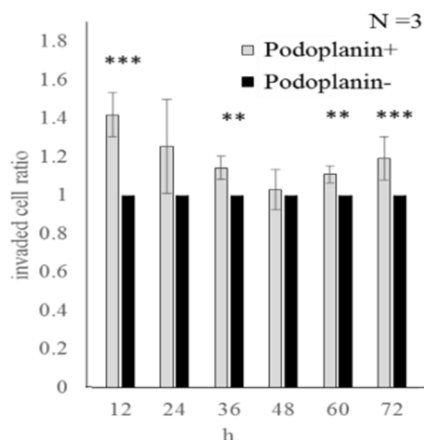
2-A: A431 細胞において、Podoplanin 分子陽性細胞には、がん幹細胞が濃縮されていることが知られている（我々のラボより報告済み、BBRC 2008）。Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞における、線維芽細胞依存的、非依存的な浸潤において浸潤細胞数、浸潤様式、細胞周期の解析を行った。線維芽細胞非依存的な浸潤においては、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に、浸潤癌細胞数、浸潤様式に差は認められなかった（下図）。



線維芽細胞非依存的な Podoplanin 陽性細胞
と陰性細胞の浸潤癌細胞数

2-B: 線維芽細胞依存的な浸潤において Podoplanin 陽性細胞は、有意に浸潤数が促進されていた（下図）。癌細胞の浸潤様式においては、両者の浸潤様式に差は認められなかった。

次に、線維芽細胞依存的な浸潤における Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期について検討を行ったところ両者に差を認めることは出来なかった。



線維芽細胞依存的な Podoplanin 陽性細胞
と陰性細胞の浸潤癌細胞数

3: A431 細胞における Podoplanin 分子の発現抑制を行った結果、線維芽細胞依存的な浸潤が抑制された。以上の結果から、A431 細胞における Podoplanin 分子自身が、線維芽細胞依存的な浸潤に機能的に関与している可能性が示された。

4 総括；一般に、がん幹細胞は、浸潤能が高いことが報告されてきた。しかしながら、本研究の結果から、がん幹細胞の浸潤能が高いのは、周囲に線維芽細胞が存在するときのみであり、線維芽細胞が存在しない状態では、非がん幹細胞との生物学的差異を認めなかった。以上の結果は、1) 浸潤に関わるがん幹細胞の悪性像は、線維芽細胞（いわゆる、がん関連線維芽細胞 CAFs）の存在に依存すること、2) がん幹細胞を標的とした治療を開発する上で、がん細胞周囲の微小環境を考慮する必要があること、を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomoyuki Miyashita, Ishii Genichiro. et al	4. 巻 145
2. 論文標題 Spatiotemporal characteristics of fibroblasts-dependent cancer cell	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 373-381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1007/s00432-018-2798-y	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 Miyashita T, Neri S, Hashimoto H, Akutsu A, Sugano M, Fujii S, Ochiai A, Ishii G.	4. 巻 X X
2. 論文標題 Fibroblasts-dependent Invasion of Podoplanin-Positive Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 X X
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.29624.	査読の有無 無
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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----