

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07681

研究課題名(和文)GMN癌細胞の動態解明へ：CAFによる癌悪性化へのシナジー効果

研究課題名(英文)Dynamics of GMN cancer cells: Synergistic effect on cancer malignant alteration by CAF

研究代表者

伊藤 剛 (Itoh, Go)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60607563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：化療や放射線治療後などの腫瘍組織で巨核、多核の異型癌細胞(GMN癌細胞)が散見されても、関心を払われてこなかった。GMN癌細胞は決して静止期の細胞ではない。積極的に癌の微小環境を改変して、そのフィードバックからGMN癌細胞はさらに間葉転換を容易に受け、腫瘍は浸潤性を獲得する悪性スパイラルの原因になる事を提唱した。GMN癌細胞とCAF(癌関連線維芽細胞)動員という、一見して異なる現象が結びつき新たな領域の研究となった。GMN癌細胞の増殖や癌浸潤・転移のシグナル伝達経路を明らかにする本研究は、癌治療後の再発および悪性化のブロックや感知に働く創薬や腫瘍マーカーの創造へと繋がる事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞における細胞分裂の失敗は、癌ゲノム情報に大規模な変異を与える(ミクロ的变化)。また、癌細胞とその周辺細胞との相互作用も癌細胞の性質変異につながる(マクロ的变化)。ミクロとマクロな2つの変化が連携し、癌悪性化を増幅させるメカニズムを明らかにできる。従来とは異なる効果的な癌抑制経路を模索し、癌の緩和を目指している。

研究成果の概要(英文)：Giant / Multi-Nucleated cancer cells (GMN cancer cells) are found in tumor tissues after chemotherapy or radiation therapy. GMN cancer cells are by no means quiescent cells. GMN cancer cells were found to contribute to active alteration of the tumor microenvironment and to be susceptible to mesenchymal transition from their feedback. GMN cancer cells and CAF (Cancer associated fibroblasts) mobilization, which seemingly different phenomena, will lead to creation of a new field of research. This study, which elucidates the signaling pathways of GMN cancer cell proliferation and cancer infiltration / metastasis, will lead to the creation of drugs and tumor markers that block and detect cancer recurrence and malignancy after cancer treatment.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：CAF 細胞分裂 がん微小環境 浸潤 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

巨核・多核である GMN 癌細胞 (GMN: Giant and / or Multi-Nucleated) は細胞分裂の失敗により産生される。細胞分裂の失敗は自然発生的な要因もしくはがん化療や放射線治療を原因することが知られている。GMN 癌細胞では染色体構造異常や大規模なゲノム DNA 変異が散見されるため、細胞内情報の錯乱が報告されている。がん組織における GMN 癌細胞の有無が 5 年生存率と相関することが認められている。

近年、癌組織に含まれる異質な間質細胞と癌細胞の相互応答による癌進行が注目されている。例えば、正常な線維芽細胞は癌細胞からの刺激により、CAF: Cancer associated fibroblasts (癌関連線維芽細胞) へと変質する。CAF は癌細胞の分子発現を誘導し、癌増殖や浸潤の促進に働くことが注目されてきた。申請者は細胞分裂異常と癌周辺環境 (がん微小環境) の両面からの腫瘍研究を進めてきた。

これまでに、組織特異的ながん微小環境が癌細胞の細胞分裂異常を導くことを見つけた (2021 年、癌学会学術総会にて発表)。ミクロ (GMN 癌細胞) とマクロ (CAF) な変化の連携が癌悪性化を加速させるという斬新な概念を検討してきた。GMN 癌細胞に応答した線維芽細胞はサイトカイン産生の高い CAF へと変化することを見出した。一方、GMN 癌細胞は CAF の構築したがん微小環境に対して高い感受性を示すことで浸潤や転移性を一層亢進させ、悪性度の高い癌細胞の拡散を導くことが考えられた。

2. 研究の目的

GMN 癌細胞と CAF がどのように相互作用し、腫瘍を増悪とさせるか明らかにする。GMN 癌細胞による CAF の動員および、CAF からのフィードバックによる GMN 癌細胞の移動・増殖性促進に関わる分子シグナルを特定する。通常癌細胞とは異なる GMN 癌細胞特有の細胞外小胞や液性因子に注目し、構築されるがん微小環境の変移について言及していく。

3. 研究の方法

巨核・多核 (GMN) となる癌細胞株を特定する。産生した GMN 癌細胞の染色体異常を検討する。マイクロアレイおよびパスウェイ解析を用いて、GMN 癌細胞に特有であるシグナル経路を抽出し、癌悪性化との関連を検討する。マウス皮下へ GMN 癌細胞を移植し、腫瘍形成を検討する。また、腫瘍内の癌細胞を抽出して、遺伝子発現の変化を解析する。GMN 癌細胞の培養上清により刺激した線維芽細胞での遺伝子発現の特異性および癌悪性度への関連を示す。

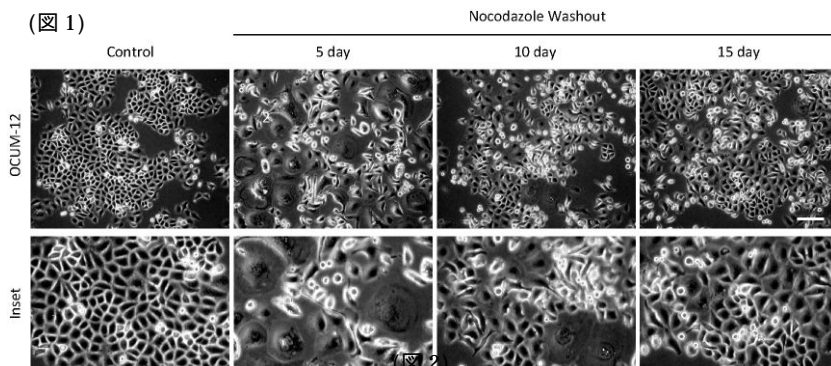
4. 研究成果

巨核・多核 (GMN) となる癌細胞株の同定およびその染色体異常を検出した。また、GMN 癌細胞の性質を調べた結果、細胞分裂による増殖、移動、浸潤性が確認できた。単核の通常癌細胞と GMN 細胞の遺伝子発現の差異解析をマイクロアレイと qPCR により行った。細胞周期因子・腫瘍関連因子・サイトカインの発現向上が確認され、それらの発現誘導シグナル経路をパスウェイ解析により進めた。またマウス皮下へ GMN 癌細胞を移植した結果、生体への高い生着性と腫瘍形成を確認できた。マウス腫瘍から癌細胞を単離し、その分子発現をマイクロアレイにより解析できる状況にある。GMN 癌細胞の培養上清により刺激された線維芽細胞におけるサイトカイン発現変動を明らかにした。

1) 口腔扁平上皮癌細胞株 SAS に微小管重合阻害剤ノコダゾールを添加することで GMN (巨核・多核) 癌細胞を産出した。通常線維芽細胞はヒト胎児肺由来である TIG-1-20 を用いた。さらに、GMN 細胞による胃癌悪性化モデルを検討するため、

癌患者から単離したスキルス胃癌由来 CAF と胃癌細胞との相互作用を用いた。ノコダゾールは癌アポトーシスを引き起こすが、OCUM-12 胃癌細胞に添加した場合、アポトーシスをスキップした巨核の癌細胞となった。ノコダゾール除去後、異常な染色体分配と細胞質分裂を繰り返しながら増殖し、GMN 癌細胞となった (図 1)。

CAF 培養上清と反応させた GMN-OCUM-12 では細胞間接着の減衰や移動速度の向上が明らかと

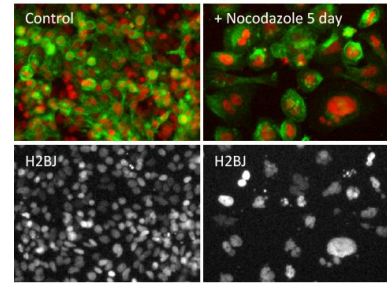


(図 2)

なった。

2) 染色体分配や細胞形態を継時的に観察するため、CENP-A-EGFP (キネトコア)、MyrPalm-EGFP (細胞膜)、H2BJ-pmCherry (染色体) を単独もしくは複数発現する SAS や OCUM-12 株を樹立した (図 2)。GMN 細胞の細胞分裂や移動、もしくは異数性 (1 細胞あたりの染色体数がランダムな状況) における細胞構造の解析に活用することで、GMN 細胞の特性を抽出している。

H2BJ-pmCherry / MyrPalm-EGFP-OCUM-12

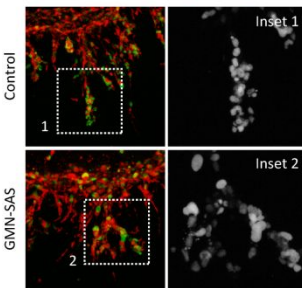


3) 単核もしくは GMN 細胞と CAF との相互作用を解析した。2) で樹立した細胞株を用いて細胞運動を解析した。CAF との共培養や CAF 由来の培養上清に反応後、癌細胞は細胞間接着を解除して細胞運動を上昇させることがわかった。Fiji software Truacking により、細胞重心の座標を測定し、移動速度・規則性などを数値化していった。

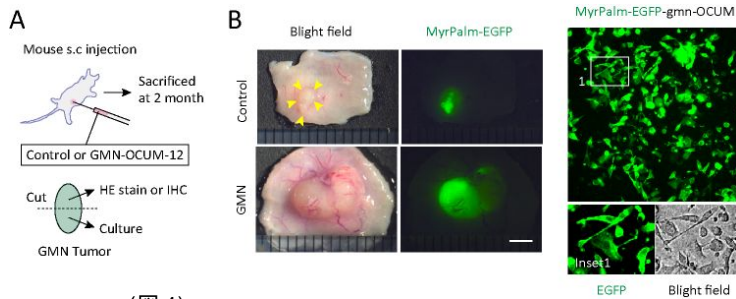
(図 3)

4) 3D ゲル浸潤アッセイにより、GMN-SAS や OCUM-12 における浸潤性を確認した。コラーゲンゲル上で CAF と GMN 細胞を共培養した結果、CAF に先導される CAF 依存型の癌浸潤を示した。また、GMN 細胞は細胞分裂を通じて増殖しながら、癌浸潤を拡大していく様子が認められた。GMN 細胞は CAF を介して組織を拡散することが想定された (図 3)。

H2BJ-EGFP-SAS + MyrPalm-pmCherry-CAF37



5) GMN-OCUM12 細胞 (MyrPalm-EGFP 安定発現株) をヌードマウス皮下へと移植した。移植から 2 か月後、通常の OCUM-12 単核細胞と比較して、GMN 細胞における腫瘍サイズは増大した。GFP 陽性癌細胞は FACS を用いて、この腫瘍から単離された (図 4)。

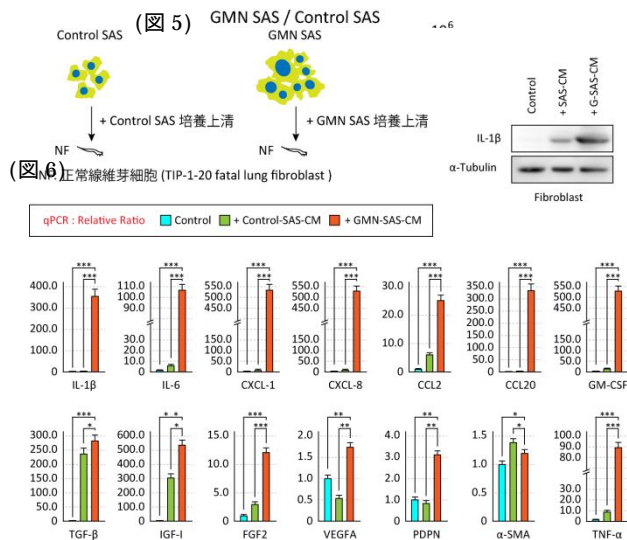


6) ヌードマウス胃への同所性移植を試行した。OCUM-12 と CAF の組み合わせで、マウス胃への移植テストを行った。移植

(図 4)

14 日後、OCUM-12 が CAF 依存的に胃壁深部へと浸潤している様子が認められた。今後、GMN 癌細胞でも同様の検討を進め、癌浸潤や転移について比較する予定である。

7) 通常の SAS と GMN-SAS との遺伝子発現の差異をマイクロアレイにより測定した。GMN 癌細胞では 200 種以上の遺伝子での発現上昇が認められた (図 5: 通常細胞に対して 2 倍以上の発現上昇)。8) GMN-SAS の培養上清により刺激した線維芽細胞におけるサイトカイン発現を qPCR により測定した。通常 SAS で刺激後の線維芽細胞との比較により、GMN-SAS は炎症性サイトカイン産生型の CAF を算出することを明らかとした (図 6)。9) 癌細胞と CAF で産生されるサイトカイン量を比較した。GMN-SAS と GMN-SAS 刺激により産出された CAF (gCAF) のサイトカイン発現を qPCR を用いて測定した。gCAF によるサイトカイン産生量は GMN-SAS より多量となることが想定され、腫瘍内に含まれる gCAF の割合が患部の炎症性に重要であると考えられた。



(図 6)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Sasaki Y, Takagane K, Konno T, Itoh G, Kuriyama S, Yanagihara K, Yashiro M, Yamada S, Murakami S, Tanaka M.	4. 巻 112
2. 論文標題 Expression of asporin reprograms cancer cells to acquire resistance to oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1251-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14794	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 Talukder MSU, Pervin MS, Tanvir MIO, Fujimoto K, Tanaka M, Itoh G, Yumura S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Ca ²⁺ -Calmodulin Dependent Wound Repair in Dictyostelium Cell Membrane.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9041058	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 Fujimoto K, Tanaka M, Rana AYKMM, Jahan MGS, Itoh G, Tsujioka M, Uyeda TQP, Miyagishima SY, Yumura S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Dynamin-Like Protein B of Dictyostelium Contributes to Cytokinesis Cooperatively with Other Dynamins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8080781	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 Umakoshi M, Takahashi S, Itoh G, Kuriyama S, Sasaki Y, Yanagihara K, Yashiro M, Maeda D, Goto A, Tanaka M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0564-x	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 Md Istiaq Obaidi Tanvir, Go Itoh, Hiroyuki Adachi, Shigehiko Yumura	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamics of Myosin II Filaments during Wound Repair in Dividing Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10051229	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 Maho Hino, Kenji Iemura, Masanori Ikeda, Go Itoh, Kozo Tanaka	4. 巻 112
2. 論文標題 Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein CHAMP1 plays a role in cell survival through regulating Mcl-1 expression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3711-3721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.	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 Go Itoh, Kurara Takagane, Yuma Fukushi, Sei Kuriyama, Michinobu Umakoshi, Akiteru Goto,	4. 巻 1
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts educate normal fibroblasts to facilitate cancer cell spreading and T cell suppression.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 166-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13077	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 Kurara Takagane, Michinobu Umakoshi, Go Itoh, Sei Kuriyama, Akiteru Goto, Masamitsu Tanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 SKAP2 suppresses inflammation-mediated tumorigenesis by regulating SHP-1 and SHP-2.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-02153-1	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 Sei Kuriyama, Gentaro Tanaka, Kurara Takagane, Go Itoh, Masamitsu Tanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Pigment Epithelium Derived Factor is involved in the late phase of osteosarcoma metastasis by increasing extravasation and cell-cell adhesion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.818182	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Itoh Go, Tanaka Masamitsu
2. 発表標題 Dynamics of giant cancer cells cooperating with cancer associated fibroblasts
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤剛、佐々木裕都、高金くらら、田中正光
2. 発表標題 マクロファージ、CAF、癌細胞が協調したMMP9産生と活性化および、癌への関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤剛、田中正光
2. 発表標題 間質細胞と協調した巨大癌細胞の増殖と癌浸潤ジオメトリー
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 田中正光、伊藤剛、高金くらら、八代正和
2. 発表標題 CAFにより教育された線維芽細胞はがんの播種を促進する
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 伊藤剛、中村華子、佐々木裕都、田中正光
2. 発表標題 癌関連マクロファージの産生するMMP9が癌浸潤を促進するメカニズムについて
3. 学会等名 第85回日本生化学学会・東北支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Go Itoh, Masakazu Yashiro and Masamitsu Tanaka
2. 発表標題 Dynamics of giant cancer cells in tumor microenvironment
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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