

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07685

研究課題名(和文) 生体内イメージングを用いた多様ながん転移巣形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the various mechanisms of cancer metastasis using in vivo imaging

研究代表者

上田 善文 (UEDA, Yoshibumi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：60391877

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)：転移巣形成メカニズムの解明は、原発巣から離れた数個のがん細胞の動態を追う必要があるために、一細胞レベルで、がんの動態を観察する必要がある。本研究を通して、悪性リンパ腫の肝臓への転移巣形成メカニズムを明らかにし、肝臓の血管に存在する脂質分子(スフィンゴミエリン)がその転移巣形成に影響を与えることが明らかになった(FASEB J. 2020 Mar;34(3):3838-3854.)。また、このスフィンゴミエリンは、生体内の大腸の陰窩の表面に存在することが明らかとなった(Biochem Biophys Res Commun. 2022 Jun 30;611:14-18.)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝臓での悪性リンパ腫の転移巣形成メカニズムの一端を明らかにした。以前に明らかにした大腸での転移巣形成メカニズムと合わせて、転移巣形成には多様な様式が存在する。単純に一つのがん細胞から転移巣を形成するだけでなく、その他のがん細胞と集合し、転移巣を大きくすることによって、周りの免疫細胞や抗がん剤からのダメージを少なくしていることが示唆される。今後、創薬の戦略として、転移巣を個々に分解することによって、抗がん剤などへの暴露効率を上げて転移巣を撲滅するなどの戦略が上げられる。

研究成果の概要(英文)：Since cancer metastasis includes the movement of single cancer cells to form metastasis foci, observation with a single cell resolution is needed. Through the present study, we found the mechanism of malignant lymphoma metastasis in the liver, and a lipid, sphingomyelin, on the surface of blood vessels in the liver affects the formation of metastatic foci(FASEB J. 2020 Mar;34(3):3838-3854.). Additionally, it was discovered by in vivo imaging using two-photon microscopy that sphingomyelin is localized at the crypts in the colon and small intestine (Biochem Biophys Res Commun. 2022 Jun 30;611:14-18.).

研究分野：生体内イメージング

キーワード：がん 転移 生体内イメージング 2光子顕微鏡 脂質 蛍光イメージング 悪性リンパ腫

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、2人に1人ががんに罹患し、3人に1人ががんで生命を落とす。その9割は転移が要因とされる。従って、がんの転移のメカニズムを調べることは、がん患者の生存率を上げること、さらには、がんの治療、創薬に繋がる。現在行われている原発巣から他臓器への転移の研究は、動物レベルでは、組織を固定化し、パラフィン包埋し、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を基に判断される。臨床の現場であっても、組織切片に加えてMRI、PETなどが用いられているものの、その場所に転移巣が「あるか否か」という判断を主とする。しかしながら、現在、モデルとなっているがんの転移は、変異を起こした一つの細胞が増殖し、その中の性質の変わったがん細胞が、血管やリンパ管に入り込み、血流の流れに乗って、然るべき場所へ行きつき転移巣を形成するというものであり、一細胞レベルの動きを追うことによってはじめてより詳細に理解できるが、従来の一般的な蛍光顕微鏡技術では困難である。

2光子顕微鏡は、生体内の蛍光を有した細胞を一細胞レベルで、かつ、動きを込みにして観察ができる他のシステムにはない特徴を持っている。申請者は、現在、がん細胞の生体内での動態可視化の研究を行っている(Ueda Y. et. al. Sci Rep. 2018 Mar 5;8(1):3978.)。この論文においては、定常的に蛍光タンパク質 GFP を発現する細胞を樹立し(EL4-EGFP 細胞)、c57BL6/J マウスに EL4-EGFP 細胞を尾静脈より注入し、7日後、大腸粘膜層上皮下の毛細血管において、一つ一つの EL4-EGFP 細胞が集簇している様子が観察できた。さらに、2週間後に、絨毛の中に数個からなる EL4-EGFP 細胞が存在し、転移巣の形成が確認された。興味深いことに、このような数個からなる転移巣は、絨毛内だけでなく、血管内にも存在した。このデータは、**がんの転移巣の形成が、従来の血管から内皮細胞に入ってから形成されるという説とは異なっている。**このように、申請者のシステムは一細胞レベルで観察することによってはじめて明らかなる現象を明らかにすることができる。さらに、申請者は、大腸以外にも、骨髄および肝臓で EL4-EGFP 細胞の浸潤を観察している。大腸の絨毛周りの毛細血管は、わずか2-3 μm であり直径 10 μm の EL4-EGFP 細胞にとって極めて窮屈な環境である。一方で肝臓の類洞血管は、5-7 μm であり、大腸に比べて広い。また、骨髄の類洞血管に EL4-EGFP 細胞が詰まっていることは無く、骨髄腔の中に既に浸潤している様子が観察できる。これらの予備実験から、**転移巣は、環境によって、形成する様式も変わってくると考えられ、多様性があるのではないかと**の問いに至った。

2. 研究の目的

「がん細胞の転移巣形成メカニズムの多様性」を明らかにする。

具体的には、

- 1) 一つの細胞の増殖・分裂による効果、
- 2) 積み重なりにより形成される効果が、肝臓および骨髄で起きる転移巣の形成において、どれほど影響を及ぼすのか、さらに、その他の効果があるのかを検証していく。

3. 研究の方法

- A. 肝臓、骨髄での EL4-EGFP および EL4-mCherry 細胞の経日変化の観察
- B. 細胞分裂の影響の検証(Fucci プローブ)
- C. 積み重なり効果を検証する (EL4-EGFP 細胞および EL4-mCherry 細胞)

4. 研究成果

肝臓での EL4-EGFP 細胞の経日変化を観察した。EL4-EGFP 細胞の接種 4 日後と 10 日後を比較すると、10 日後で転移巣が結節を作り出し、かつ、個々の EL4-EGFP 細胞の動きは 10 日後の方が活発であった。これは、EL4-EGFP 細胞が作り出す環境が液性因子を放出し、EL4-EGFP 細胞を活発化させていると考えられる。この結果を **FASEB J. 2020 Mar;34(3):3838-3854.**に報告した。さらに研究を進

め、EL4-EGFP 細胞および EL4-mCherry 細胞を、マウスに接種し 7 日後、両者混合の結節が観察された。これは、転移巣結節を形成する際に、細胞増殖のみならず、細胞同士の積み重なり効果もあることを示している。EL4 細胞が集合するメカニズムを探るために、In vitro で集合していない EL4 細胞群と集合している EL4 細胞群の間の mRNA プロファイルを比較した。細胞間接着に関与するタンパク質の mRNA の増加が多数見られた。候補となる接着因子が結節部位において高発現しているかを免疫組織染色の実施を試みる予定だったが、かなり多くの因子が変動しており、確認するための抗体の存在しない因子が多くあり同定までには行きつかなかった。クラスター解析を行った結果、むしろ、様々な接着因子が全体的に上昇している傾向にあったため、EL4 細胞が集合するメカニズムは、全体的な接着因子の増加によるものと結論付けた。この結果に関しては、現在、論文を作成中である。

まとめ) 本研究では、肝臓での悪性リンパ腫の転移巣形成メカニズムの一端を明らかにした。以前に明らかにした大腸での転移巣形成メカニズムと合わせて、転移巣形成には多様な様式が存在する。単純に一つのがん細胞から転移巣を形成するわけではなく、その他のがん細胞と集合し、転移巣を大きくすることによって、周りの免疫細胞や抗がん剤からのダメージを少なくしていることが示唆される。今後、創薬の戦略として、転移巣を個々に分解することによって、抗がん剤などへの暴露効率を上げて転移巣を撲滅するなどの戦略が上げられる。また、2 光子顕微鏡を用いて並行して行っていたマウス生体内イメージング研究において、腸を生きたままで観察し、がんの形成および進展に関与するスフィンゴミエリンの分布を調べた。大腸および小腸においては、粘膜層の陰窩の表層に、スフィンゴミエリンが分布していることがわかり、代表者を筆頭著者、研究責任著者として、**Biochem Biophys Res Commun. 2022 Jun 30;611:14-18.**に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi Makoto, Ueda Yoshibumi, Matsushita Michiko, Nagaya Shingo, Hashizume Chieko, Arai Kenta, Kabayama Kazuya, Fukase Koichi, Watanabe Ken, Wardhani Lusi Oka, Hayashi Kazuhiko, Okazaki Toshiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Deficiency of sphingomyelin synthase 2 prolongs survival by the inhibition of lymphoma infiltration through ICAM 1 reduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3838 ~ 3854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901783RR	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 Shinji Seiichi, Sasaki Norihiko, Yamada Takeshi, Koizumi Michihiro, Ohta Ryo, Matsuda Akihisa, Yokoyama Yasuyuki, Takahashi Goro, Hotta Masahiro, Hara Keisuke, Takeda Kohki, Ueda Koji, Kuriyama Sho, Ishiwata Toshiyuki, Ueda Yoshibumi, Murakami Takashi, Kanazawa Yoshikazu, Yoshida Hiroshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Establishment and characterization of a novel neuroendocrine carcinoma cell line derived from a human ascending colon tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3708 ~ 3717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14221	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 Sugimoto Naotoshi, Ishibashi Hiroaki, Ueda Yoshibumi, Nakamura Hiroyuki, Yachie Akihiro, Ohno Shosaku Takako	4. 巻 18
2. 論文標題 Corticosterone inhibits the expression of cannabinoid receptor γ 1 and cannabinoid receptor agonist γ 1-induced decrease in cell viability in glioblastoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1557 ~ 1563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10456	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 Nihongaki Yuta, Otabe Takahiro, Ueda Yoshibumi, Sato Moritoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 A split CRISPR/Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 882 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0338-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 Kuwasaki Yuto, Miyake Keita, Fushimi Keiji, Takeda Yuka, Ueda Yoshibumi, Nakajima Takahiro, Ikeuchi Masahiko, Sato Moritoshi, Narikawa Rei	4. 巻 20
2. 論文標題 Protein Engineering of Dual-Cys Cyanobacteriochrome AM1_1186g2 for Biliverdin Incorporation and Far-Red/Blue Reversible Photoconversion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2935 ~ 2935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20122935	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 Fushimi Keiji, Miyazaki Takatsugu, Kuwasaki Yuto, Nakajima Takahiro, Yamamoto Tatsuro, Suzuki Kazushi, Ueda Yoshibumi, Miyake Keita, Takeda Yuka, Choi Jae-Hoon, Kawagishi Hirokazu, Park Enoch Y., Ikeuchi Masahiko, Sato Moritoshi, Narikawa Rei	4. 巻 116
2. 論文標題 Rational conversion of chromophore selectivity of cyanobacteriochromes to accept mammalian intrinsic biliverdin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 8301 ~ 8309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1818836116	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 Yamamoto Shota, Iwamaru Yoshifumi, Shimizu Yoshihisa, Ueda Yoshibumi, Sato Moritoshi, Yamaguchi Kazuo, Nakanishi Jun	4. 巻 88
2. 論文標題 Epidermal growth factor-nanoparticle conjugates change the activity from anti-apoptotic to pro-apoptotic at membrane rafts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 383 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.02.026	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 Sugimoto Naotoshi, Matsuzaki Kentaro, Katakura Masanori, Nakamura Hiroyuki, Ueda Yoshibumi, Yachie Akihiro, Shido Osamu	4. 巻 33
2. 論文標題 Heat attenuates sensitivity of mammalian cells to capsaicin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biochemical and Molecular Toxicology	6. 最初と最後の頁 e22288 ~ e22288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbt.22288	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 Tachibana Sean R., Tang Longteng, Zhu Liangdong, Takeda Yuka, Fushimi Keiji, Ueda Yoshibumi, Nakajima Takahiro, Kuwasaki Yuto, Sato Moritoshi, Narikawa Rei, Fang Chong	4. 巻 22
2. 論文標題 An Engineered Biliverdin-Compatible Cyanobacteriochrome Enables a Unique Ultrafast Reversible Photoswitching Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5252 ~ 5252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105252	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 Fujii Yoritaka, Taniguchi Makoto, Nagaya Shingo, Ueda Yoshibumi, Hashizume Chieko, Watanabe Ken, Takeya Hiroyuki, Kosaka Takeo, Okazaki Toshiro	4. 巻 5
2. 論文標題 A novel mechanism of thrombocytopenia by PS exposure through TMEM16F in sphingomyelin synthase 1 deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 4265 ~ 4277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002922	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 Shinji Seiichi, Shichi Yuuki, Yamada Takeshi, Takahashi Goro, Ohta Ryo, Sonoda Hiromichi, Matsuda Akihisa, Yonaga Kazuhide, Iwai Takuma, Takeda Kohki, Ueda Koji, Kuriyama Sho, Miyasaka Toshimitsu, Ueda Yoshibumi, Sasaki Norihiko, Takahashi Kimimasa, Ohashi Ryuji, Ishiwata Toshiyuki, Arai Tomio, Yoshida Hiroshi	4. 巻 Not specified
2. 論文標題 Establishment and characterization of a novel anorectal melanoma cell line derived from primary human rectal tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 Not specified
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2022_89-402	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 Fujita Jun, Taniguchi Makoto, Hashizume Chieko, Ueda Yoshibumi, Sakai Shota, Kondo Tadakazu, Hashimoto-Nishimura Mayumi, Hanada Kentaro, Kosaka Takeo, Okazaki Toshiro	4. 巻 101
2. 論文標題 Nuclear Ceramide Is Associated with Ataxia Telangiectasia Mutated Activation in the Neocarzinostatin-Induced Apoptosis of Lymphoblastoid Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 322 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/molpharm.121.000379	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 Ueda Yoshibumi、Abe Mitsuhiro、Ishiwata Toshiyuki、Ozawa Takeaki	4. 巻 611
2. 論文標題 Sphingomyelin localization in the intestinal crypt surface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 14～18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.128	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 上田善文、小澤岳昌
2. 発表標題 マウス生体内イメージングを用いた一つ一つのがん細胞のユニークな振る舞いの可視化
3. 学会等名 第 13 回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田善文、小澤岳昌
2. 発表標題 マウス生体内蛍光イメージングを用いた 脂質ドメインの探索
3. 学会等名 第70年会 日本分析化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし

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