

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07583

研究課題名(和文) 三次元培養がん細胞に高発現する因子の同定と腫瘍形成メカニズム解明への展開

研究課題名(英文) Identification of factors highly expressed in three-dimensional cultured cancer cells and expansion to elucidation of tumorigenesis mechanisms

研究代表者

横山 智哉子 (Yokoyama, Chikako)

大阪公立大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：50608908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3D培養大腸がん細胞株DLD-1を免疫して樹立したモノクローナル抗体(mAb) 2H7, 7D6および7E11の抗原が細胞骨格分子CK18, 解糖系酵素GPIおよびアドヘレンスジャンクション構成分子IQGAP1であると明らかにした。また、CK18は、3D培養やいくつかの抗がん剤処理による細胞死により分解が起きると明らかにした。さらに、3D培養がん細胞におけるGPI発現量の増加と解糖系の亢進を示した。また、3D培養がん細胞における解糖系の亢進は、低酸素環境に起因する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における3D培養がん細胞の細胞死の誘導および解糖系の亢進は、研究代表者が用いた3D培養大腸がん細胞が生体内の腫瘍のがん細胞の特性を再現し、腫瘍形成メカニズム解明のためのモデルとなつたと示した。また、抗がん剤誘導した大腸がん細胞におけるCK18の分解が抗がん剤の種類により異なつた点について、それぞれの抗がん剤が誘導する細胞死誘導メカニズムに違いがあると示唆され、今後の詳細なメカニズムの解明は抗がん剤の副作用軽減につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the antigens of monoclonal antibodies (mAb) 2H7, 7D6 and 7E11, which were established by immunizing 3D-cultured colon cancer cell line DLD-1, were the cytoskeleton molecule CK18, glycolytic enzyme GPI and adherens junction component molecule IQGAP1. CK18 was found to be degraded by cell death induced by 3D culture or by treatment with some anticancer drugs. Furthermore, we showed that GPI expression was increased and the glycolytic system was upregulated in 3D-cultured cancer cells. The enhancement of the glycolytic system in 3D-cultured cancer cells may be caused by hypoxia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん モノクローナル抗体 三次元細胞培養 サイトケラチン 解糖系酵素 細胞接着因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固形がんにおいては、がん細胞が増殖する過程で周囲の細胞や細胞外マトリックスと相互作用し、立体構造を持つ腫瘍を形成する。また、がん細胞はこの腫瘍形成過程において、低酸素・低栄養環境に適応し、薬剤耐性能や転移能を獲得する。現在、生体内の腫瘍を模した三次元(3D)細胞培養法が注目されている。3D培養は、低酸素・低栄養の内部微小環境を有し、腫瘍モデルとしての実験が可能である。3D培養がん細胞における3D構造形成は、がん細胞同士の細胞接着であり、同種細胞間の接着に関わるカドヘリンスーパーファミリーが重要であると知られている。しかし、その他の3D構造形成に関わる因子はほとんど明らかにされていない。研究代表者は、3D培養がん細胞を腫瘍モデルとし、3D構造形成に重要な因子の同定やその機能解析により、腫瘍形成メカニズムの解明、さらには腫瘍内のがん細胞の薬剤耐性能や転移能獲得のメカニズム解明に挑んでいる。本研究の研究成果は、新たながん治療法の開発に繋がると期待される。

### 2. 研究の目的

研究代表者は先行研究として、3D培養がん細胞を抗原としたモノクローナル抗体ショットガンアプローチ法により、3D培養がん細胞に高発現する因子の網羅的解析を実施した。この結果、3D培養がん細胞において発現量が増加する因子として、細胞骨格分子、代謝関連分子およびアドヘレンスジャンクション構成分子を見出した。本研究では、これらの3D培養がん細胞に高発現する因子が腫瘍の特性や腫瘍形成に関わるメカニズムの解明を目的とした。また、これらの因子の解析により、代謝関連分子の解析では低酸素状態におけるワールブルク効果や薬剤耐性メカニズムの解明、細胞骨格分子やアドヘレンスジャンクション構成分子の解析ではがんの転移メカニズムの解明に繋がると考えられる。

### 3. 研究の方法

研究代表者は本研究の先行研究において、3D培養大腸がん細胞株 DLD-1 を抗原としたモノクローナル抗体ショットガンアプローチ法を実施し、モノクローナル抗体を複数樹立した。これらのモノクローナル抗体を用いて、3D培養がん細胞において抗原の発現量が増加する3つの因子を選出した。これら3つのモノクローナル抗体(mAb) 2H7、7D6および7E11が認識する抗原分子は、それぞれ約45 kDa、約60 kDaおよび約180 kDaの分子量であった。これらの抗原を免疫沈降したサンプルのLC-MS/MSの結果により、それぞれ細胞骨格分子であるサイトケラチン(CK) 18、解糖系酵素であるグルコース-6-リン酸イソメラーゼ(GPI)およびアドヘレンスジャンクション構成分子であるIQモチーフGTPアーゼ活性化タンパク質1(IQGAP1)を抗原分子候補として同定した。

本研究では、(1)これらの抗原分子候補について発現ベクターや市販抗体を用い、抗原同定を確認した。次に、(2)抗原分子の細胞内局在や共役因子を解析した。最後に、(3)CK18およびGPIについて3D培養がん細胞における役割を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 発現ベクターおよび市販抗体を用いた抗原同定の確認

本実験では、3D培養DLD-1細胞を免疫して樹立したモノクローナル抗体mAb 2H7、7D6および7E11の抗原が細胞骨格分子CK18、解糖系酵素GPIおよびアドヘレンスジャンクション構成分子IQGAP1であると確認した。

mAb 2H7について、DLD-1細胞抽出液を用いた抗原の免疫沈降をおこない、mAb 2H7および市販のCK18抗体でプロットした結果、mAb 2H7の抗原はCK18であると確かめた。

次に、mAb 7D6について、3D培養したDLD-1細胞抽出液を用いた抗原をmAb 7D6により免疫沈降をおこない、市販のGPI抗体でプロットした結果、mAb 7D6の抗原はGPIであると確かめた。

最後にmAb 7E11について、大腸がん細胞株LoVo抽出液を用いた抗原の免疫沈降をおこない、mAb 7E11および市販のIQGAP1抗体でプロットした結果、mAb 7E11の抗原はIQGAP1であると確かめた。また、mAb 7E11については、C末端側を欠失したIQGAP1(1-940 a.a.)発現ベクターを293T細胞に導入した細胞を用いた免疫沈降を実施し、mAb 7E11がIQGAP1のN末側を認識すると確認した。

#### (2) 抗原分子の細胞内局在および共役因子の解析

樹立したモノクローナル抗体を用いた免疫細胞染色により、抗原の細胞内局在を解析した。

mAb 2H7およびCK18市販抗体はDLD-1細胞を網目状に染色し、典型的な細胞骨格の染色パターンを示した。

mAb 7D6は解糖系酵素であるため細胞質を全体的に染色した。

最後に、mAb 7E11はDLD-1およびLoVo細胞の細胞接着部位を特異的に認識すると明らかにした。また、IQGAP1は足場タンパク質であり、E-カドヘリンなど多くの共役因子との相互作用が

報告されているため、共免疫沈降により 3D 培養がん細胞特異的な共役因子の同定を試みた。しかし、mAb 7E11 の共免疫沈降物から E-カドヘリンを検出できず、mAb 7E11 による共免疫沈降が可能ではなかった。この理由として、mAb 7E11 のエピトープにより、フリーの IQGAP1 のみが沈降されている可能性が考えられた。今後は異なるエピトープのモノクローナル抗体を作製するなどし、3D 培養がん細胞特異的な共役因子の解析を進める必要がある。

### (3) 3D 培養がん細胞における CK18 および GPI の役割の解析

#### 細胞死誘導における CK18 の分解

3D 培養がん細胞について、CK18 を用いたウェスタンブロットをおこなうと、全長の 45 kDa のバンドの他に 43 kDa のバンドが確認された(図 1)。CK18 は、アポトーシスの誘導により、カスパーゼに分解されると知られている<sup>[1]</sup>。この結果より、3D 培養がん細胞塊内部の低酸素もしくは低栄養環境から 3D 培養がん細胞にアポトーシスが誘導されると推測した。したがって、細胞死誘導による CK18 の分解を調査した。数種類の抗がん剤で細胞死を誘導した DLD-1 細胞において、CK18 の分解が確認された(図 2)。その中でも、ビノレルピンおよびエトポシドで処理した細胞では CK18 の分解が顕著に確認され、24 kDa の分解産物も確認された。これがカスパーゼによる分解と確認するため、カスパーゼ 3 で処理した DLD-1 細胞を用いた mAb 2H7 のウェスタンブロットをおこなった結果、同様の分子量の分解産物が確認されたため、3D 培養がん細胞および抗がん剤処理細胞における CK18 の分解もアポトーシスによるものと結論付けた。また、抗がん剤エトポシドを処理した HeLa 細胞について mAb 2H7 を用いた免疫染色をおこなったところ、CK18 のシグナルが消失した。これらの結果は抗がん剤が誘導する細胞死のメカニズムに違いがあると示唆され、詳細な細胞死誘導のメカニズムの解明は抗がん剤の副作用軽減に繋がると考えられる。さらに、3D 培養がん細胞における細胞死の誘導から、本研究で用いた 3D 培養がん細胞が生体内の腫瘍の特性を示したと考えられ、腫瘍モデルとして適切であると考えられた。今後は、3D 培養がん細胞塊の細胞死を誘導する環境条件について詳細な解析が必要であり、これらの研究成果が腫瘍形成過程における細胞死誘導のメカニズム解明に繋がると考えられる。

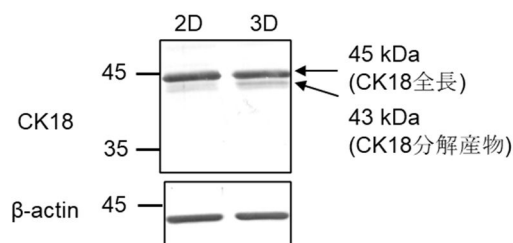


図 1 2D および 3D 培養 DLD-1 細胞を用いた mAb 2H7 のウェスタンブロット

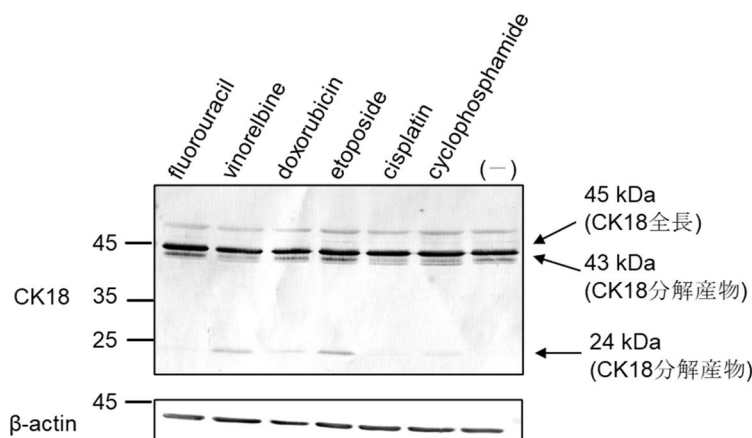


図 2 抗がん剤処理 DLD-1 細胞を用いた mAb 2H7 のウェスタンブロット

#### 3D 培養大腸がん細胞における解糖系の亢進

がん細胞のエネルギー獲得が解糖系に依存する現象をワールブルク効果と呼び、古くから知られている。本研究において、3D 培養 DLD-1 および LoVo 細胞において GPI が増加する傾向を明らかにした(図 3)。また、GPI は細胞株によって発現に差があると確認した。3D 培養がん細胞における解糖系酵素 GPI 発現量の増加は、研究代表者が用いた 3D 培養大腸がん細胞が生体内の

腫瘍のがん細胞の特性を再現し、ワールブルク効果の解明のためのモデルとなると考えられた。さらに、3D 培養がん細胞における GPI の増加は 3D 培養がん細胞塊のどのような環境が反映されたものかを明らかにするため、二次元 (2D) 培養した DLD-1 および LoVo 細胞を低酸素もしくは低栄養培養し、mAb 7D6 を用いたウェスタンブロットを実施した (図 4)。その結果、低酸素培養では GPI 発現量が増加し、低栄養培養では発現量は変化しなかった。したがって、3D 培養における GPI 発現量の増加は低酸素条件が関与していると考えられた。GPI は低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$ により転写制御されている。今後は、HIF-1 $\alpha$ を中心とした発現解析メカニズム解明に挑む。最後に、3D 培養 DLD-1 細胞のマイクロアレイおよびリアルタイム PCR による定量解析の結果から、3D 培養大腸がん細胞において、多くの解糖系酵素の mRNA が増加し、その中でもアイソザイムであるアルドラーゼ C およびエノラーゼ 2 の増加が確認された。現在、これらのモノクローナル抗体を作製し、タンパク質の発現解析を実施している。

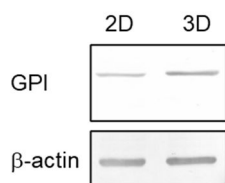


図 3 2D および 3D 培養 DLD-1 細胞を用いた mAb 7D6 のウェスタンブロット

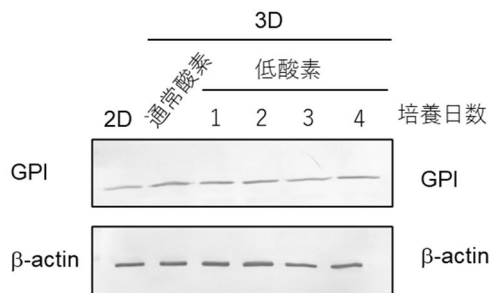


図 4 2D, 3D および低酸素培養 DLD-1 細胞を用いた mAb 7D6 のウェスタンブロット

#### (4) 参考文献

- [1] C Caulin 1, G S Salvesen, R G Oshima: Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997;138:1379-1394.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Soeta Kenta, Iuchi Katsuya, Hisatomi Hisashi, Yokoyama Chikako	4. 巻 39
2. 論文標題 Generation of Rat Monoclonal Antibody for Cytokeratin 18 by Immunization of Three-Dimensional-Cultured Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 199 ~ 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2020.0030	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 Soeta Kenta, Rina Yamaguchi, Iuchi Katsuya, Hisatomi Hisashi, Yokoyama Chikako	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of rat monoclonal antibody for human IQGAP1 by immunization of three-dimensional-cultured cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	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） なし	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田妃奈美、伊原寛一郎、立花太郎、横山智哉子
2. 発表標題 3D培養膵臓がん細胞株における解糖系酵素の発現解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池もも、伊原寛一郎、立花太郎、横山智哉子
2. 発表標題 三次元培養がん細胞における解糖系酵素の発現解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日山智尋、伊原寛一郎、立花太郎、横山智哉子
2. 発表標題 三次元培養がん細胞における足場タンパク質IQGAP1の共役因子の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日山智尋、伊原寛一郎、立花太郎、横山智哉子
2. 発表標題 三次元培養細胞における足場タンパク質IQGAP1の共役因子の探索
3. 学会等名 第68回生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 添田健太、横山智哉子、山口 莉奈
2. 発表標題 腫瘍モデル三次元培養がん細胞を抗原としたモノクローナル抗体の作製と抗原解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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