

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08286

研究課題名(和文) 癌転移における癌細胞集団が示す極性転換の機能的意義の解析

研究課題名(英文) The mechanism of polarity switching in the cluster of human colorectal adenocarcinoma during the process of metastasis

研究代表者

小沼 邦重 (Kunishige, Onuma)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：90597890

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)：集団としてのがん細胞の転移メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、大腸がんの細胞集団は、apical-outの極性状態ではapical面の外側に活性酸素を放出し、血管内皮に作用し、血管外への浸潤を促進することを示した。また、apical-in からapical-outへの極性転換を阻害する候補化合物として、CFTR inhibitor172を見つけた。極性転換による転移抑制の観点から、Micropapillary carcinoma(MPC)の治療戦略に焦点を当てたところ、Factor-Xを見出した。Factor-Xを添加して極性転換させた後に抗がん剤で処理すると薬剤感受性が亢進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がん細胞の多くは原発巣・転移巣ともに細胞集団として存在するにも関わらず、単細胞としての研究が多い。近年では癌の浸潤においては病理学的観察に基づいて細胞が集団として浸潤するモデルや、細胞集団が転移の起源となるモデルが提唱されているが、分化型腺癌の集団特性を維持できる培養法がこれまでにほとんど存在しなかったために、集団としてのがん細胞の振る舞いについては、未だ不明な点が多い。本研究で明らかとしたapical-outの極性状態の持つ転移における役割とメカニズムの解析および極性の観点からの治療・転移の抑制に結び付けるための化合物の同定は、癌の転移研究にとって大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The metastatic mechanism of the cancer cells cluster remains unclear. In this study, we showed that the apical-out status of colorectal cancer cells might be advantageous during the extravasation step of metastasis through discharged ROS from the apical membrane of cancer cell clusters. In addition, CFTR inhibitor172 was identified as a candidate compound that inhibits the polarity switching from apical-in to apical-out. In order to focus on the therapeutic strategy to inhibit metastasis through polarity switching, we used MPC-organoids. MPC-organoids exhibited apical-out polarity, even when embedded in the extracellular matrix (ECM). We identified Factor-X, a cytokine that can mitigate the apical-out polarity of MPCs in ECM. Combination of Factor-X and anticancer drugs enhanced drug sensitivity in vitro. In summary, this project is expected to elucidate the metastatic mechanism of cancer cell clusters and to demonstrate the possibility of inhibiting metastasis by polarity switching.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん細胞集団の極性転換 がん細胞集団の転移 大腸癌オルガノイド 血管内皮との接着 活性酸素 micropapillary carcinoma 薬剤感受性と極性転換

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

集団としてのがん細胞が転移に寄与することが報告されているが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。我々は独自に開発したがん初代3次元培養法 (CTOS 法) を利用して、がん細胞集団の特性解析を行ってきた。がん細胞集団であるオルガノイドは、細胞外マトリクスの存在下では、スフェロイド内に apical 面で覆われた管腔を持つ状態 (apical-in) になるが、浮遊培養下では、apical 面がスフェロイドの外周を覆う状態 (apical-out) を示し、培養条件を変えると短期間で相互転換する (極性転換)。がん細胞は集団として血管内へ侵入した場合に apical-in から apical-out へ極性状態を転換させると予想されるが、実際に患者大腸がんでもそのような病変像が観察される。我々はこれまでに大腸がんオルガノイドを門脈内注射する肝転移モデルにおいて、Src 阻害や dynamin 阻害により apical-out から apical-in への極性転換を抑制すると肝転移能が低下することを示し (Okuyama 2016 Am J Pathol)、極性転換が大腸がんの肝転移に関与する可能性が示唆された。しかし、この知見は転移の過程の一局面を捉えたにすぎない。そこで、血管内に浸潤したがん細胞は apical-in から-out へ極性転換することで転移を有利に成立させると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

がん細胞が転移する過程において、apical-out への極性転換が果たす役割を明らかにし、さらにその先にある細胞“集団”のがん浸潤・転移の制御を目指した治療の発展に繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞集団の転移過程を再現した in vitro アッセイモデル

大腸がんがんの血行性転移の場合、がんは血管内へ侵出し、免疫エフェクター細胞の攻撃を避け、転移臓器である肝臓の血管内皮に接着、血管外へ浸潤する過程をとる。がん細胞塊を起源とした転移では、apical-out へ極性を転換させることが、転移の成立過程で重要である可能性がある。大腸がん由来のオルガノイドを用いて、血管内皮細胞との接着能、がん細胞が血管内皮を置換して広がる現象 (クリアランス) を定量評価できる in vitro アッセイモデルを確立した。具体的には、血管内皮細胞との接着能は、mCherry を強制発現させたヒト肝血管内皮細胞 (HHSEC) を単層培養し、PKH67 で蛍光標識したオルガノイドを重層した。3時間後、非接着細胞を除去することで接着したオルガノイド数を、蛍光を指標にして評価した。クリアランス能は、で接着したオルガノイドを、さらに 12 時間培養し、オルガノイドの下に存在する血管内皮細胞が血管内皮を置換して広がった面積を ImageJ で算出し、評価した。

### (2) 転移を成立させる分子メカニズム (活性酸素の役割) の解析

apical-out の際に放出される活性酸素が転移を促進するのであれば、活性酸素の阻害によって転移を抑制できると推測される。上記の in vitro アッセイモデルに対して、NOX1 に対する阻害剤や shRNA を用いた活性酸素の産生阻害、N-Acetyl-L-cysteine の添加による活性酸素の除去を行い、in vitro における転移能が低下するか検証した。shRNA は Tet-on/システムを利用し、タンパク発現量の減少が確認できた、ドキシサイクリン添加 3 日目のオルガノイドを使用した。

### (3) apical-in から apical-out への極性転換を阻害する化合物のスクリーニングと極性を制御する分子の探索

細胞外マトリックス存在下から非存在下に培養条件を変えると、オルガノイドは apical-out へ極性転換する。極性転換を簡便に評価するために、apical 面を蛍光標識したオルガノイド (C45) を使用した。具体的には、Thy-1 の GPI 結合シグナルシーケンスで C 末端を修飾した GFP 発現ベクター (Rhee 2006 Genesis) から PiggyBac ベクターを作製し、大腸がんオルガノイドに導入した。このモデルに、化合物を添加し、apical-in から apical-out への極性転換を阻害する化合物を同定した。

### (4) micropapillary の極性を転換させる化合物の探索

Micropapillary carcinoma (MPC) は、リンパ行性転移と薬剤耐性のため予後不良の病態である。ECM に囲まれているにも関わらず apical-out の構造をとることから、「極性転換不全」であり、apical 面に存在する ABC トランスポーターが薬剤耐性のメカニズムではないかと仮説を立てた。MPC 組織由来のオルガノイド (C166) に (3) と同様のベクターを導入した。このモデルに、化合物を添加し、ECM 存在下で MPC の apical-out の極性状態を転換あるいは喪失させる因子を同定した。

### (5) micropapillary の極性を転換させる化合物による薬剤感受性の評価

ECM 存在下で (4) で同定した化合物によって apical-out の極性を喪失させた。その後、抗がん剤であるオキサリプラチン (L-OHP) とドキシソルピシンを添加し 7 日後に ATP を指標として薬剤感受性を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) がん細胞集団の転移を成立させる分子メカニズムとしての活性酸素の役割

本研究では、apical-out の極性状態が転移過程に及ぼす影響を検討した。はじめに、肝転移における重要な段階である、がん細胞の肝血管内皮細胞への接着能を比較した。蛍光標識したヒト肝血管内皮細胞を単層培養し、蛍光標識した C45 を重層した。播種 3 時間後に非接着細胞を除去し、蛍光を定量することで接着率を算出した結果、apical-in と比較して apical-out の C45 は接着率が有意に増加し、shRNA により活性酸素種産生酵素の一つである NOX1 の発現量を減少させた場合、抑制された。しかし、抗酸化物質の N-Acetyl-Cysteine (NAC) で処理した場合、接着能は抑制しなかった。また、接着後に、がん細胞が血管内皮を置換して広がる現象 (クリアランス) を定量したところ、apical-in と比較して apical-out の C45 はクリアランス率が増加した。NAC で処理した場合、さらに NOX1 の発現量を減少させた場合、この現象は抑制された。以上の結果から apical-out の極性状態では、apical 面の外側に放出された活性酸素が血管内皮に作用し、血管内から血管外への浸潤を促進することが示唆された (図 1、図 2)。

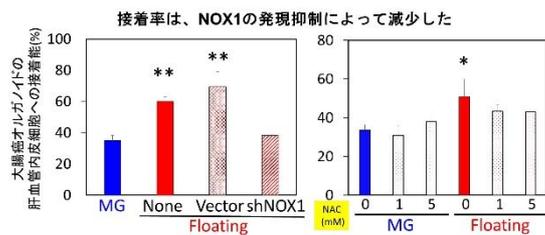


図 1 : 大腸癌オルガノイドの肝血管内皮細胞への接着能と活性酸素の関与

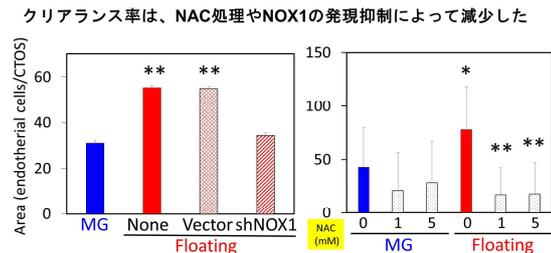


図 2 : 大腸癌オルガノイドのクリアランス能と活性酸素の関与

(2) apical-in から apical-out への極性転換を阻害する化合物の同定  
細胞外マトリックス存在下から非存在下に培養条件を変えると、がん細胞集団は apical-in から apical-out へ極性転換する。このような極性転換を阻害する薬剤を探索した結果、CFTR inhibitor 172(以下 172)を見つけ出した。172 は、溶媒対照である DMSO 添加群と比較して、7.5, 15, 30  $\mu$ M の濃度で apical-in から apical-out への極性転換を阻害した(図 3-1)。一方で、CFTR activator である Forskolin は極性転換を阻害しなかった(図 3-1)。また、172 を上記の濃度で処理しても、apical-out から apical-in への極性転換や、浮遊培養における apical-out の極性状態には影響せず、細胞傷害性もなかった(図 3-2, 図 3-3)。以上の結果から、172 は apical-in から apical-out への極性転換のみを阻害することで転移を抑制する候補化合物である可能性が示唆された。



図 3-1 : CFTR inhibitor-172はapical-inから apical-outへの極性転換を阻害した

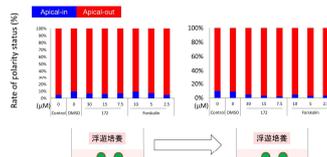


図 3-2 : CFTR inhibitor-172 と Forskolin は浮遊培養では極性状態に影響しない

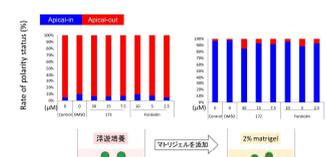


図 3-3 : CFTR inhibitor-172はapical-outから apical-inへの極性転換に影響しない

(3) MPC の apical-out 極性を転換する化合物の同定  
移植モデルを用いた生体における 172 の実効性の検証を予定したが、異なる CFTR 阻害剤である GlyH-101(101)を処理したところ、172 では極性転換を阻害した比率が 40%、101 は 20% であった。この結果から、CFTR 阻害剤は、劇的に極性転換を阻害する化合物ではないことが明らかとなった。そこで、令和 4 年度は、極性転換による転移抑制の観点から、MPC の治療戦略に焦点を当てた。ECM に囲まれた非 MPC の腺がんは、apical-in であるのに対し、MPC では、ECM に囲まれているにも関わらず apical-out の極性を保持する。すなわち、MPC は「極性転換不全」であるといえる。申請者は、MPC 患者腫瘍からオルガノイドを作製し、ECM 包埋下でも apical-out であることを示すとともに、MPC を極性転換させる候補因子 Factor-X を見出した(図 4)。apical 面には ABC トランスポーターが発現しており、apical-out の極性を持つことで薬剤を外側に排出することが報告されている。事実 Factor-X を添加して極性転換させた後に L-OHP あるいは doxorubicine (DOX) で処理すると、薬剤の取り込みは増加し、薬剤感受性も亢進した(図 5)。以上の結果から、Factor-X は、極性転換をメカニズムとした MPC の薬剤感受性増強剤になる可能性があり、今後生体での実効性を検討する予定である。

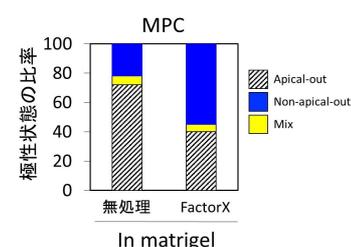


図 4 FactorXはMPC細胞集団の apical-outの比率を減少させる

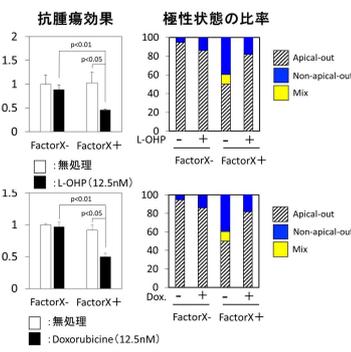


図 5 Apical-out比の減少と薬剤の感受性との関連

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 小沼邦重、井上正宏
2. 発表標題 大腸がん転移におけるがん細胞集団の極性転換の役割
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 大腸がん転移におけるがん細胞集団の極性転換の役割
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 大腸がん転移におけるがん細胞集団の極性転換の役割
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 大腸がん転移におけるがん細胞集団の極性転換の役割
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 1.小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 Micropapillary carcinoma病態における極性転換とその分子機構
3. 学会等名 患者由来がんモデル講演会
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
研究分担者	井上 正宏  (Inoue Masahiro)  (10342990)	京都大学・医学研究科・特定教授   (14301)	
研究分担者	近藤 純平  (Kondo Jumpei)  (80624593)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授   (14401)	

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