

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07118

研究課題名(和文)がん細胞と線維芽細胞の相互教育プログラムの解明

研究課題名(英文)Cross-talk between cancer cells and fibroblasts during cancer progression.

研究代表者

滝野 隆久(Takino, Takahisa)

金沢大学・GS教育系・教授

研究者番号：40322119

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)：本研究では、鉄がMT1-MMPの発現を制御し、MMP-2活性化とがん細胞浸潤を誘導することを報告した。鉄の枯渇はMT1-MMP発現減少とMMP-2活性化抑制を誘導した。鉄添加によるMT1-MMP発現とMMP-2活性化亢進は、siRNAによるMT1-MMPの発現抑制、MMP阻害剤あるいは抗酸化剤処理により抑制されたことから、MT1-MMPと活性酸素種の関与が示唆された。がん細胞の鉄キレート剤処理は、細胞浸潤を抑制した。Deferasiroxは経口の鉄キレート剤であり、半減期が長く、臨床試験で優れた耐用性があることから、抗転移薬として効果的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形がん患者の多くは転移が原因で死亡する。鉄の細胞内流入増加と排出低下は、がんの発生率増加と臨床成績悪化に結びつく。鉄の排出ポンプの過剰発現は、MMP-2、MT1-MMPやIL-6の発現を低下させ子宮がんの腹膜播種を阻害する。これらの研究結果と一致して、本研究ではMT1-MMP発現、MT1-MMPを含む細胞外小胞の分泌と細胞運動の亢進、即ちがん細胞浸潤に細胞内鉄が必要であることを示した。一方、ヒト正常線維芽細胞における鉄は、MT1-MMPを介したMMP-2活性化に大きな影響を及ぼさなかった。鉄キレート剤は、がん細胞周囲の正常線維芽細胞に影響しない抗転移薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that iron upregulates the expression of membrane type1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), which induces MMP-2 activation and invasion of cancer cells. Iron depletion downregulated MT1-MMP expression, resulting in the suppression of MMP-2 activation in cancer cells. On the other hand, iron loading upregulated MT1-MMP expression, which promoted MMP-2 activation. This promotion of MMP-2 activation was inhibited by knockdown of MT1-MMP with siRNA, and treatment with either MMP inhibitor or antioxidant (N-acetyl-L-cysteine), suggesting the involvement of MT1-MMP and reactive oxygen species in iron-mediated MMP-2 activation. Treatment of cancer cells with iron chelator deferasirox resulted in the suppression of cell invasion into collagen gel. Deferasirox is an oral iron chelator with a long half-life and well tolerated in clinical trials. Thus, it may be used as the new anti-metastatic drug and achieved significant effect in different cancers therapy.

研究分野：がん生物学

キーワード：細胞外マトリックス 細胞外マトリックス分解酵素 マトリックスメタロプロテアーゼ がん浸潤 がん転移 細胞運動 がん微小環境 線維芽細胞

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

がん治療の大きな障壁となるのは、がん組織におけるがん細胞の階層性とがん微小環境の不均一性である。がん微小環境は、がん細胞、がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast: CAF)、血液・免疫系細胞等の細胞性成分とがん細胞外マトリックス (ECM) から構成されており、細胞性成分とがん ECM は相互依存的にがん幹細胞維持、がん浸潤・転移や薬剤耐性等のがん悪性化進展に寄与している。がん ECM 構築に中心的な役割を果たしているのは、がん細胞により教育された CAF である。がん組織における ECM の Scrap & Build (改変) は、がん微小環境の不均一性の中核であり、ECM 分解酵素である MT1-MMP による ECM 改変誘導がその引金となる。本研究では、TGF- $\beta$  を中心としたがん細胞-CAF-がん ECM 間の相互教育プログラムを解明し、がん治療効果の増強が期待されるがん微小環境の正常化療法の開発を試みる

## 2. 研究の目的

がん ECM 構築の主役は、多くの ECM 成分を産生する CAF である。CAF はさらに TGF- $\beta$  や HGF 等のサイトカインや MMP を分泌することでがん細胞の悪性進展を支援する。がん細胞と CAF 間には TGF- $\beta$  の発現と活性化の正のフィードバック・ループが存在しており、がん微小環境に大きな影響を及ぼしている。このループ形成にはタンパク分解酵素、 $\alpha$ v $\beta$ 3 や  $\alpha$ v $\beta$ 5 等のインテグリン、ECM の組成と硬度が密接に関与している。MT1-MMP、MMP-2 と MMP-9 は TGF- $\beta$  の活性化因子としても知られている。本研究の目的は、TGF- $\beta$  を中心としたがん細胞-CAF-がん ECM 社会の構築機序とその持続性を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究では、TGF- $\beta$  及び SDF-1 で刺激したがん細胞の培養上清で各種の線維芽細胞を培養する。この際、3次元コラーゲン培養や間葉系幹細胞との共培養も同時に試みる。次にこれらの培養上清をがん細胞に加え、MMP-9 の発現とその活性化が誘導される実験系を確立する。この MMP-9 の活性化を誘導する培養上清刺激が、がん細胞浸潤、コラーゲンゲル収縮、ECM 沈着へ及ぼす影響を iCT 法で検証する。がん細胞と線維芽細胞のシグナル伝達経路、遺伝子発現プロファイル、プロオテオーム等の *in vitro* 解析を駆使して MMP-9 活性化因子の同定とその制御機構の解明、細胞の CAF 化に関わる因子の同定を試みる。金沢大学がん進展制御研究所機能ゲノミクス研究分野 (鈴木健之教授) で作成されたエピジェネティクスに関連する遺伝子発現抑制ライブラリーをがん細胞に導入し、この現象を正負に制御するエピジェネティック因子の同定も試みる。以上の結果を踏まえて、がん微小環境を正常化へと導く方法の開発を目指す。

## 4. 研究成果

### (1) 概要

がん組織におけるがん細胞の階層性とがん微小環境の不均一性は、がん治療の大きな障壁である。細胞外マトリックスの再編成はがん微小環境の不均一性の中核であり、細胞外マトリックス分解酵素の中でも膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) である膜型 MMP (MT1-MMP) が重要視されている。鉄は生体内の酸素運搬の担い手であると同時に、細胞複製、成長や代謝の生体反応にも重要な金属である。がん細胞は、急速な細胞増殖を支えるために正常細胞に比べて高い鉄要求性を示す。鉄の過剰な取込みや排出抑制による細胞内蓄積は、発がんやがん増殖に深く関わっている。近年、鉄の代謝異常は、がん細胞の浸潤・転移などががん悪性化進展にも寄与することが報告されている。本研究では、鉄が MT1-MMP による MMP-2 活性化とがん細胞浸潤に及ぼす影響を検討した。ヒトがん細胞を鉄キレート剤で処理すると MT1-MMP の発現が低下し、MMP-2 の活性化が顕著に抑制された。3次元コラーゲンゲル内で培養したがん細胞を鉄キレート剤で処理すると MT1-MMP の発現低下、MMP-2 の活性化抑制とともに細胞遊走能の低下も認められた。一方、ヒトがん細胞をクエン酸アンモニウム鉄で処理すると MT1-MMP 発現が亢進し、MMP-2 の活性も誘導された。このクエン酸アンモニウム鉄処理による MMP-2 活性化誘導は、siRNA による MT1-MMP の発現抑制、MMP 阻害剤処理、抗酸化剤処理により抑制された。新規の浸潤アッセイ法を用いてマトリゲルからコラーゲンゲルへの細胞浸潤およびコラーゲンゲル間の細胞浸潤を測定した結果、鉄キレート剤は MT1-MMP による MMP-2 の活性化を抑制することで細胞浸潤を顕著に抑制することが判明した。鉄キレート剤は、がん細胞の増殖抑制とともに浸潤・転移抑制にも効果的であることが示唆された。

### (2) 進捗状況

鉄は DNA 合成、細胞周期やエネルギー産生等に関与する酵素群に使用されており、生体の必須金属の一つである。がん細胞の急速な細胞増殖を支えるため、がん組織では正常組織に比べて鉄の蓄積が多いことが知られている。今回、ヒト膵芽腫、線維肉腫と肺小細胞がん由来の細胞株では、MT1-MMP の活性発現に鉄が重要であることが判明した。上記がん細胞の鉄キレート剤処理は、MT1-MMP を介した MMP-2 活性化を抑制した。一方で、細胞培地への鉄の添加は、がん細胞における MT1-MMP の mRNA とタンパク質の発現量を増大させ、その結果 MT1-MMP を介した MMP-2 活性化を亢進した。細胞培地への鉄の添加により活性酸素種の産生が認められ、抗酸化剤 (N-acetyl-cysteine) 処理は鉄添加による MMP-2 活性化を抑制したことから、鉄添加による MMP-2 活性化に活性酸素種が関与していることが示唆された。また、細胞培地への鉄の添加により MT1-MMP を含んだ細胞外小胞 (Extracellular Vesicles) の分泌促進が認められた。鉄添加による細胞外小胞内の MT1-MMP の含有量には変化は認められなかったが、鉄添加による細胞外小胞分泌量増大も MMP-2 活性化と細胞外マトリックス破壊に関与していることが推察された。がん細胞浸潤は、研究代表者が開発した上下二層のゲル間の細胞の垂直移動を測定する細胞浸潤測定法 (invading cell trapping assay) を用いて評価した。がん細胞の鉄キレート剤処理は、コラーゲンゲル間の細胞移動とマトリゲルからコラーゲンゲルへの細胞移動を顕著に抑制した。一方、鉄キレート剤は正常なヒト皮膚、肺、口腔線維芽細胞の運動を抑制したが、MT1-MMP を介した MMP-2 活性化には影響しなかった。鉄は線維芽細胞による細胞外マトリックスの産生や集積の促進に重要であることから、が

ん細胞と線維芽細胞間によるがん細胞外マトリックスの形成には、鉄が情報伝達分子として機能している可能性が考えられた。

### (3) 今後の研究の推進方策

今回の研究から、がん細胞内の鉄が活性酸素種の産生等を介して MT1-MMP 活性発現を亢進し、MMP-2 の活性化を促進することが判明した。また、細胞内に蓄積した鉄は、MT1-MMP を含んだ細胞外小胞の分泌を亢進することによっても局所における MT1-MMP 依存的な MMP-2 の活性化、即ち細胞外マトリックス破壊を促進していることが推測された。一方、がん細胞の鉄キレート剤処理は、MT1-MMP を介した MMP-2 活性化、細胞運動、コラーゲンゲルへの細胞浸潤を抑制した。以上のことから、がん組織内の鉄が MT1-MMP による MMP-2 の活性化を促進し、がん細胞浸潤を促進していることが明らかになった。興味深いことに、鉄キレート剤処理は、がん細胞における MT1-MMP 依存的な MMP-2 の活性化を抑制したが、正常線維芽細胞における MMP-2 の活性化には影響を及ぼさなかった。がん細胞と線維芽細胞をコラーゲンゲル内で共培養し、各細胞のコラーゲンゲルへの浸潤に対する鉄キレート剤の効果を同時に検討した結果、がん細胞浸潤のみが選択的に抑制された。以上の結果から、がん細胞の増殖、浸潤、転移抑制には、鉄キレート剤が効果的であることが示唆された。

がん組織中の高い鉄濃度は、積極的ながん細胞の増殖性とがん細胞外マトリックス形成に寄与していることから、がん細胞と線維芽細胞のシグナル伝達経路、遺伝子発現プロファイル、プロオテオーム等の *in vitro* 解析を駆使して鉄による MT1-MMP 活性発現制御因子の同定とその制御機構の解明を試みる予定である。また、金沢大学がん進展制御研究所機能ゲノミクス研究分野（鈴木健之教授）で作成されたエピジェネティクスに関連する遺伝子発現抑制ライブラリーの中から鉄による影響を受けやすい遺伝子の shRNA をがん細胞に導入し、鉄による MT1-MMP 活性発現を正負に制御するエピジェネティック因子の同定も試みる。以上の結果を踏まえて、がん細胞と線維芽細胞の相互教育プログラムを解明し、がん微小環境を正常化へと導く方法の開発を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shinohara Y, Komiya Y, Morimoto K, Endo Y, Terashima M, Suzuki T, Takino T, Ninomiya I, Yamada H, Uto Y	4. 巻 99
2. 論文標題 Development of UTX-143, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 5 inhibitor, using amiloride as a lead compound	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medical Chemistry	6. 最初と最後の頁 117603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2024.117603	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 Batbayar G, Ishimura A, Lyu H, Wanna-Udom S, Meguro-Horike M, Terashima M, Horike S, Takino T, Suzuki T.	4. 巻 699
2. 論文標題 ASH2L, a COMPASS core subunit, is involved in the cell invasion and migration of triple-negative breast cancer cells through the epigenetic control of histone H3 lysine 4 methylation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 19-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.061	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 Suphakhong K, Terashima M, Wanna-Udom S, Takatsuka R, Ishimura A, Takino T, Suzuki T.	4. 巻 298
2. 論文標題 m6A RNA methylation regulates the transcription factors JUN and JUNB in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102554.	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 Yamahana H, Terashima M, Takatsuka R, Asada C, Suzuki T, Uto Y, Takino T	4. 巻 27
2. 論文標題 TGF-beta1 facilitates MT1-MMP-mediated proMMP-9 activation and invasion in oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101072.	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 Yamahana H, Komiya Y, Takino T, Endo Y, Yamada H, Asada C, Uto Y	4. 巻 69
2. 論文標題 Structure-activity relationships of UTX-121 derivatives for the development of novel matrix metalloproteinase-2/9 inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1017-1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00549	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 Wanna-udom S, Terashima M, Ishimura A, Lyu H, Suphakphong K, Takino T, Suzuki T	4. 巻 296
2. 論文標題 KDM2B is involved in the epigenetic regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lung and pancreatic cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015502	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 滝野隆久
2. 発表標題 鉄はMT1-MMPによるMMP-2活性化と細胞浸潤を制御する
3. 学会等名 第32回 日本がん転移学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本修一、井上裕祥、滝野隆久、幸田泰子、大庭俊一、宇佐美伊保美、川田学、畠山昌則
2. 発表標題 小細胞肺がんの自然転移モデルにおいて遠隔転移形成を促進するクローデインの機能解析
3. 学会等名 第32回 日本がん転移学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 滝野隆久、高塚理沙、鈴木健之
2. 発表標題 鉄はMT1-MMPによるMMP-2活性化を介して細胞浸潤を制御する
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本修一、滝野隆久、川田学、畠山昌則
2. 発表標題 MT1-MMP活性化を介してヒト小細胞肺癌細胞株DMS273の浸潤及び転移形成を促進するクローディン
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石村昭彦、寺島農、滝野隆久、鈴木健之
2. 発表標題 ASH2Lは、ヒストンH2K4メチル化修飾を介して、トリプルネガティブ型乳がん細胞の悪性化形質を調整する
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 滝野隆久
2. 発表標題 鉄はMT1-MMPによるMMP-2活性化と細胞浸潤を制御する
3. 学会等名 第96回 日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田宗太郎、山花啓梨、遠藤良夫、滝野隆久、宇都義浩
2. 発表標題 抗転移リード化合物としてセレコキシブから派生したUTX-121誘導体 構造活性相関
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 小宮悠生、篠原侑成、二宮致、遠藤良夫、滝野隆久、宇都義浩
2. 発表標題 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 交換輸送体 5 (NHE5) 選択的阻害剤であるアミロライド誘導体の構造活性相関によるUTX-143の創薬
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