

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07141

研究課題名(和文) 圧縮ストレスがトリガーとなるがん細胞の浸潤能獲得機構

研究課題名(英文) Invasiveness of cancer cells regulated by compressive stress

研究代表者

石原 誠一郎 (Ishihara, Seiichiro)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：10719933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：圧縮ストレスは多くのがんで必然的に生じるストレスである一方、それががん細胞に与える影響はほとんど不明である。本研究では圧縮された細胞において生じる表現型および遺伝子発現の変化を解析した。圧縮ストレスが膵がん細胞株KP4細胞の浸潤を促進し、AsPC1細胞の増殖を抑制することを見出した。圧縮されたがん細胞ではMMP1、IL-8の発現が発現増加することを見出した。がん関連線維芽細胞のモデル細胞であるマウス由来の間葉系幹細胞を圧縮したところ、がん抑制性CAFのマーカーであるMeflinの発現が抑制されることを見出した。以上より圧縮ストレスはがん細胞やCAFに影響を与えることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

圧縮ストレスとがんの進行の関係性を検証し、そのメカニズムを解き明かすことで、関連する分子を阻害する新規のがん治療薬開発への貢献が期待される。また本研究で用いた細胞の圧縮システムは、がん研究のみならず、圧縮ストレスの影響が考えられる他分野の研究(血管の病気、発生時の形態形成、人工臓器作製等)にも活かすことができる。本研究はがん研究の分野のみならず、他の学術領域にも応用可能な知見・実験技術を提供する。

研究成果の概要(英文)：Compressive stress is an unavoidable stress for cancer cells in vivo, however, the effects of this stress on cancer cells are poorly understood. In this study, we analyzed the differences of phenotypes and gene expressions in cancer and non-cancerous cells with or without compressive stress. We found that compressive stress promoted invasion in KP4 pancreatic cancer cells, on the other hand, prevented proliferation in AsPC1 pancreatic cancer cells. Compressive stress also induced the expression of MMP1 and IL-8 in cancer cells. In addition, compressive stress decreased the expression of meflin, a marker of cancer-restraining cancer-associated fibroblasts. These results suggested that compressive stress is critical for cancer progression by modulating the phenotypes and gene expression of cancer cells and cancer-associated fibroblasts.

研究分野：腫瘍生物学、細胞生物学

キーワード：がん 圧縮ストレス メカノバイオロジー MMP1 IL-8 がん関連線維芽細胞 Meflin

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんによる死者数は右肩上がりに増えており治療法の改善が強く望まれている。がん細胞が周囲の組織に浸潤(浸潤)するとがんの治療が困難になることが多い。そのため浸潤の抑制はがんの効果的な治療に繋がると考えられるが、がん細胞が浸潤する能力(浸潤能)を獲得する仕組みには未解明な点が多いため、浸潤を抑制する治療は未だ実現できていない。

生体内でがん細胞は圧縮ストレスを受けることが知られている。がん細胞は無限に増殖するため、腫瘍の体積を増加させて周囲の組織を圧迫する。同時にその反作用でがん細胞は押し返され圧縮ストレスを受ける。圧縮ストレスは様々な細胞種で遺伝子発現を変化させる。特にがん細胞では浸潤能をもたらす遺伝子の発現を誘導する(Kim *et al.*, Cell Death Dis., 2017 等)ため、圧縮ストレスによりがん細胞が浸潤能を獲得する可能性が高いが、これまでの培養法ではその直接的な証明をすることができなかった。

申請者はコラーゲンゲルに細胞を埋め込んだ状態で圧縮ストレスを与え、その前後で細胞の形を観察することが可能な培養法(Compression Culture in Collagen gels (CCC)法)を独自に確立した。コラーゲンゲルはもろく崩れやすいため壊さずに圧縮することが難しかったが、アガロースゲルプレートと適切な重さのおもりを用いることでゲルを崩すことなく圧縮することに成功した。またリング状のおもりを使うことでその穴を通して細胞を観察することを可能とした。

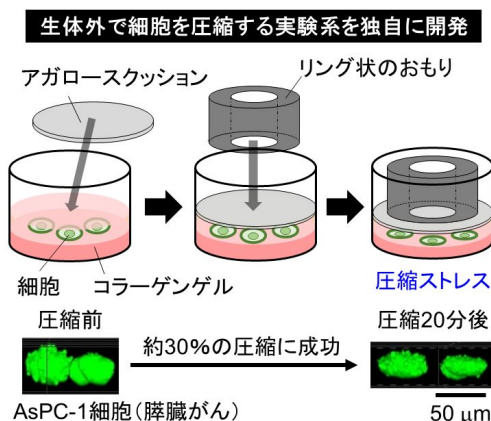
### 2. 研究の目的

本研究では圧縮ストレスによりがん細胞が浸潤能を獲得すると仮定し、圧縮ストレスに対するがん細胞の浸潤能変化を独自の培養法を用いて測定することを目指した。さらに圧縮ストレスにより浸潤能が上昇する場合は、その分子機構を解析することを目指した。

### 3. 研究の方法

既存の培養法ではがん細胞に圧縮ストレスを加える前後で浸潤能を評価することができなかった。なぜなら、がん細胞が浸潤できない物質(アルギン酸ゲル等)中でがん細胞を培養していたためである。申請者は以前に、コラーゲンゲル中にごん細胞を埋め込む方法によりがん細胞の浸潤を経時的に観察することに成功している(Ishihara *et al.*, Oncotarget, 2015 等)。この系では浸潤能の低いがん細胞は丸い形を示す一方、浸潤能の高いがん細胞は尖った形を示しゲル中を浸潤する。そのため細胞の形を観察することで浸潤能を評価できる。

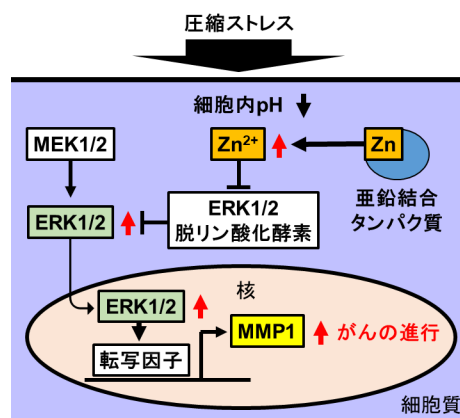
この方法を応用し、コラーゲンゲルに細胞を埋め込んだ状態で圧縮ストレスを与え、その前後で細胞の形を観察することが可能な培養法(Compression Culture in Collagen gels (CCC)法)を独自に確立した(右図)。コラーゲンゲルはもろく崩れやすいため壊さずに圧縮することが難しかったが、アガロースゲルプレートと適切な重さのおもりを用いることでゲルを崩すことなく圧縮することに成功した。またリング状のおもりを使うことでその穴を通して細胞を観察することを可能とした。本方法を用いてがん細胞の浸潤能に対する圧縮ストレスの影響を直接解析することを試みた。



### 4. 研究成果

1. 圧縮ストレスを受けたがん細胞の表現型を解析した。ヒト膵がん細胞株である KP4 細胞は、圧縮後に周囲のコラーゲンゲルに浸潤する様子が観察された。一方別のヒト膵がん細胞株である AsPC1 細胞では、圧縮後に周囲に浸潤する様子は観察されなかった。一方で、AsPC1 細胞は圧縮条件下では細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。さらに増殖マーカーである Ki67 の発現が圧縮ストレスにより低下することを発見した。また圧縮ストレスは膵がん細胞株の Rb タンパク質のリン酸化を抑制することが分かった。そのため、圧縮ストレスは細胞周期の G1/S 移行を抑制することで細胞分裂を阻害している可能性が示唆された。このことから、圧縮ストレスにより膵がん細胞は増殖能を低下させることで薬剤耐性をもつ可能性が示唆された。実際にパクリタキセルを投与したところ、圧縮ストレスを与えられた AsPC1 細胞の方が非圧縮の細胞に比べて薬剤処理後の生存率が高いことを示唆するデータが得られている。

2. 圧縮ストレスにより発現または活性が誘導される分子の同定を目指した。これまでに圧縮ストレスが AsPC1 細胞にて MMP1 の発現を上昇させることを発見した。これは圧縮ストレスにより細胞内の亜鉛濃度が上昇し、シグナル分子である Erk が活性化することにより生じていた。さらに圧縮ストレスが MMP1 発現を上昇させる分子機構についてさらに調べたところ、圧縮ストレスによりアクアポリンを介して細胞内から水分子が細胞外に排出されることで細胞内における pH の低下が起こり、それによって細胞内の亜鉛濃度が上昇することを見出した。これらの結果を通して、圧縮ストレスを受けた膵がん細胞が MMP1 の発現上昇を引き起こすメカニズムを明らかにした（右図）。



さらに CRE を介した経路の検証を行った。膵がん細胞株 (AsPC1 細胞) においてプロモーター領域に CRE をもち、かつ膵がん患者の予後不良に相関する 10 の遺伝子を同定した。次に、圧縮ストレスによってこれらの遺伝子発現が上昇するメカニズムの同定を目指した。CRE には主に AP-1 ファミリーの転写因子が結合し転写を制御することが知られているため、RNAi でそれらの転写因子をノックダウンし上記 10 遺伝子の発現が減少するかどうかを定量 PCR で確認した。これまでに約 10 種類の AP-1 ファミリーの転写因子についてノックダウンを行い qPCR で遺伝子発現を確認したが、上記 10 遺伝子について発現は変化しなかった。

また、圧縮された KP4 細胞では IL-8 が MAPK 経路依存的に発現上昇することを発見した。このことから KP4 細胞では圧縮によって IL-8 依存的に浸潤能を獲得していることが示唆された。

3. 圧縮ストレスががん関連線維芽細胞 (CAF) に与える影響についても検証を行った。マウスの間葉系間質細胞に圧縮ストレスを与えたところ、がん促進性 CAF のマーカーである Grem1 や CCL2 の発現が増加することを見出した。一方、がん抑制性 CAF のマーカーである Meflin の発現は圧縮ストレスにより減少した。このことから、圧縮ストレスはがん抑制性 CAF を減少させ、がん促進性 CAF を増加させることでがんの進行に寄与する可能性を見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kumagai Yuji, Nio-Kobayashi Junko, Ishihara Seiichiro, Enomoto Atsushi, Akiyama Masashi, Ichihara Ryosuke, Haga Hisashi	4. 巻 11
2. 論文標題 The interferon- /STAT1 axis drives the collective invasion of skin squamous cell carcinoma with sealed intercellular spaces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogenesis	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/s41389-022-00403-9	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 Kusumastuti Ratih, Kumagai Yuji, Ishihara Seiichiro, Enomoto Atsushi, Murakami Takashi, Yasuda Motoaki, Haga Hisashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Mammaglobin 1 mediates progression of trastuzumab resistant breast cancer cells through regulation of cyclins and <scp>NF B</scp>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1797 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13468	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 Onishi Katsuya, Ishihara Seiichiro, Takahashi Masayuki, Sakai Akihiro, Enomoto Atsushi, Suzuki Kentaro, Haga Hisashi	4. 巻 597
2. 論文標題 Substrate stiffness induces nuclear localization of myosin regulatory light chain to suppress apoptosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 643 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14592	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 Ishihara Seiichiro, Kurosawa Haruna, Haga Hisashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Stiffness-Modulation of Collagen Gels by Genipin-Crosslinking for Cell Culture	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 148 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gels9020148	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12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二瓶 達也、石原 誠一郎、榎本 篤、芳賀 永
2. 発表標題 Compressive stress triggers zinc signaling and progression of pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 誠一郎、芳賀 永
2. 発表標題 「硬さ」を認識したがん細胞が転写因子ATF5を介して悪性化するメカニズム
3. 学会等名 令和4年度北大細胞生物研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 誠一郎、芳賀 永
2. 発表標題 メカニカルな刺激により引き起こされるがん悪性化
3. 学会等名 第1回北海道がん若手研究者交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 誠一郎、芳賀 永
2. 発表標題 がん細胞における転写因子ATF5を介したメカノレスポンス
3. 学会等名 第7回日本メカノバイオロジー学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二瓶達也, 石原誠一郎, 榎本篤, 芳賀永
2. 発表標題 膵がんにおいて圧縮ストレスが駆動する亜鉛シグナルと悪性化
3. 学会等名 第23回日本亜鉛栄養治療研究会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二瓶達也, 石原誠一郎, 芳賀永
2. 発表標題 圧縮刺激を受ける膵臓がん細胞における細胞内遊離亜鉛イオンを介した MMP1発現亢進
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二瓶達也, 石原誠一郎, 芳賀永
2. 発表標題 膵臓がん細胞における 圧縮刺激に誘導される細胞内遊離亜鉛イオンを介したシグナル伝達
3. 学会等名 2021年度先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二瓶達也, 石原誠一郎, 榎本篤, 芳賀永
2. 発表標題 圧縮ストレスを受けた膵臓がん細胞におけるメカノトランスダクション
3. 学会等名 第6回日本メカノバイオロジー学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二瓶達也, 石原誠一郎, 芳賀永
2. 発表標題 膵臓がん細胞において圧縮刺激はアクアポリン及び細胞内亜鉛イオンを介して MMP1 の発現を亢進させる
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 二瓶達也, 石原誠一郎, 芳賀永
2. 発表標題 圧縮刺激は膵臓がん細胞において細胞内遊離亜鉛イオンを介したシグナル伝達を引き起こす
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二瓶達也, 石原誠一郎, 榎本篤, 芳賀永
2. 発表標題 膵臓がん細胞における細胞内遊離亜鉛が媒介するメカノトランスダクション
3. 学会等名 メカノバイオ討論会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二瓶達也, 石原誠一郎, 榎本篤, 芳賀永
2. 発表標題 細胞に圧縮刺激を加える三次元培養系の開発と膵臓がん細胞の遺伝子発現変化
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会2021
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
---------	---------