

令和 6 年 5 月 12 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：21K07142

研究課題名（和文）がん細胞に集団浸潤もたらす細胞間接着構造とシグナル経路の探索

研究課題名（英文）Investigation of cell-cell adhesion structures and signaling pathways causing collective invasion in cancer cells

研究代表者

芳賀 永（Haga, Hisashi）

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：00292045

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）：多くのがん細胞は細胞間接着を維持しながら集団で間質に浸潤する。このことを集団浸潤という。本研究は、がん細胞にみられる細胞間接着構造に着目し、それらの構成分子およびシグナル経路を明らかにすることで集団浸潤の機序に迫ることを目的とした。その結果、集団浸潤するがん細胞であるヒト扁平上皮がん細胞（A431細胞）においては、インターフェロンβが細胞間に蓄積しSTAT1が活性化することで集団浸潤が誘引されることが明らかとなった。さらに、分泌タンパク質CCL5が集団浸潤を誘引することを新たに明らかにし、CCL5の受容体であるCCR5の阻害剤を投与する実験によって、集団浸潤を有意に抑制することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞に関する研究は、これまで主に単一の細胞を用いて実験が行われてきた。しかし、実際の生体内では、がん細胞はお互いに接着した状態で浸潤することが知られている。そこで、本研究では、型コラーゲンゲルを用いて、がん細胞が集団で浸潤する様子を観察する実験系を構築し、さらに細胞間の接着構造に着目することで、集団浸潤の分子メカニズムに迫った。本研究の成果として、インターフェロンβなど複数のタンパク質が集団浸潤に関わることを明らかにした。これら結果は、将来的にがん細胞の浸潤を抑える創薬研究および治療法の開発へと展開することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Many types of cancer cells invade the stroma collectively while maintaining intercellular adhesion. This phenomenon is referred to as collective invasion. This study aimed to elucidate the mechanism of collective invasion and identify the associated signaling pathways by focusing on the intercellular adhesion structures. In this study, we have shown that collective invasion in human squamous epithelial carcinoma cells (A431 cells) is triggered by the accumulation of Interferon-beta between cells, leading to the activation of STAT1. Furthermore, we discovered that the secreted protein CCL5 induces collective invasion, and an inhibitor of CCR5, the receptor for CCL5, successfully suppresses collective invasion.

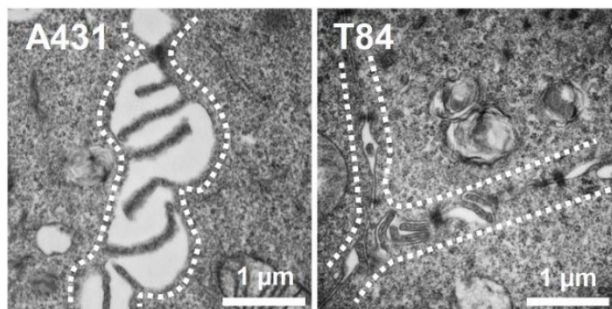
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞・組織 がん細胞 集団浸潤 細胞間接着構造 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

がんは無秩序に無限増殖する細胞(がん細胞)の集合体であり,がんが全身に広がること(転移)は患者の予後を悪化させる.がんが転移する過程で,がん細胞が周囲の間質中に移動することを浸潤という.培養細胞を用いた浸潤に関する研究の多くは,これまで単一の細胞を対象に行われてきた.しかし,実際の生体内においては,多くのがん細胞種は細胞間の接着を維持したまま集団で浸潤する.このことを集団浸潤という.しかし,その機序については不明な点が多い.

多数の細胞が集団で同じ方向に移動するためには,細胞-細胞間の接着を維持しつつ隣接する細胞の動きに同調して個々の細胞が同じ方向に運動する必要がある.これまでに我々は,がん細胞の集団浸潤における分子機構について解析を行ってきた.その結果,集団浸潤するがん細胞株であるヒト扁平上皮がん細胞(A431細胞)では,集団浸潤しないがん細胞株(ヒト大腸がん細胞株 T84細胞)に比べて細胞-細胞間の間隙が有意に広く,細胞外基質成分であるラミニン 332 および 17 型コラーゲンが充填されることで集団浸潤がもたらされることが明らかとなった(右図).さらに,ラミニン 332 が 17 型コラーゲンと結合することで安定化し,その安定化したラミニン 332 がインテグリン 1 の活性化を促すことでがん細胞の集団浸潤が誘引されることが明らかとなった.



さらに,我々は,細胞間接着構造と集団浸潤との関係についても解析を進めてきた.透過型電子顕微鏡による観察の結果,T84細胞のような低浸潤能のがん細胞株ではデスモソームが多数存在するのに対し,集団浸潤する A431細胞ではデスモソームの数が少なく,アドヒレンスジャンクションが多数存在すること,すなわち細胞間の結合が緩く動的であることが分かった.我々はこの細胞間の緩い結合ががん細胞に集団で浸潤するための自由度と推進力を与えているのではと考えて,本研究課題の提案に至った.

2. 研究の目的

がん細胞の浸潤に関する研究の学術的意義は大きいものの,集団浸潤に関する研究はその機序が少しずつ明らかになっている段階であり,全容は明らかとなっていない.本研究課題は,がん細胞が示す集団浸潤における性質を探索し,集団浸潤の機序を解明することを目的とする.具体的には,細胞生物学と解剖学の観点から,がん細胞の細胞間接着構造および仮足構造を観察し,その背後にあるシグナル経路を解析することで,集団浸潤の普遍的機序の解明を目指した.

3. 研究の方法

研究目的に対して,以下の実験を実施した.

(1)集団浸潤をもたらずシグナル経路の探索:我々は,集団浸潤を示すがん細胞株(ヒト扁平上皮がん細胞株 A431細胞)のサブクローニングを実施し,同一のがん種で集団浸潤能の異なるサブクローン株を複数樹立することに成功している.さらに,サブクローン株のマイクロアレイ解析を行ったところ,Kerat in-1,6,14,JAK-STAT 経路などの遺伝子発現に有意な差があることが明らかとなった.これらの結果をもとに,高い集団浸潤能を示すサブクローン株に対して STAT1 の阻害剤を投与したところ,集団浸潤能が有意に抑制されるという結果を得た.本研究では,がん細胞に集団浸潤もたらずシグナル経路の同定を細胞間接着構造の観点から迫った.具体的には,マイクロアレイ解析で有意な差が得られた上記の細胞間接着構造構成タンパク質の免疫染色, RNA 干渉法によるノックダウン,プラスミド導入による強制発現等を行うことで,細胞間接着構造と集団浸潤との関係を調べた.

(2)細胞間に特異的に見られる仮足構造の観察:これまでに行った電子顕微鏡観察の結果,集団浸潤を示す A431細胞では,細胞間に多数の仮足構造をもつことが明らかとなった.そこで本研究では,集団浸潤能の異なる A431細胞サブクローン株を用いて,細胞間に見られる仮足と浸潤能との関係を調べた.さらに,仮足を形成するために必要とされているタンパク質群(Kerat in family など)に着目し,阻害剤投与および RNA 干渉法によるノックダウン下でのタイムラプス観察および電子顕微鏡観察を行うことで,細胞間に特異的に見られる仮足構造の変化と集団浸潤への影響を調べた.

(3)集団浸潤の普遍性の解析:本研究では複数のがん種の細胞株を用いて,集団浸潤の普遍性に

ついて調べた。具体的には、高浸潤能を有する細胞株をコラーゲンゲル中で3次元培養し、集団浸潤に関するシグナル経路に着目して、集団浸潤への普遍性を調べた。

4. 研究成果

集団浸潤をもたらすシグナル経路として INFB- STAT1 を同定し、さらに、研究分担者である小林の指導のもと透過型電子顕微鏡を用いた解析を行うことで、細胞間隙の構造が IFNB の蓄積と STAT1 の活性化にとって重要であることを明らかにした。加えて、榎本篤教授(名古屋大学・医学部)の協力によってヒト臨床検体の解析を行った結果、臨床検体においても STAT1 の活性化が集団浸潤の亢進に関与することが示唆された。これらの結果は、日本癌学会、日本分子生物学会、患者由来がんモデル研究会で発表するに至った。さらに、原著論文としてまとめ、Oncogenesis 誌に出版することができた(プレスリリースに用いた図を右に示す)。

DNA マイクロアレイ解析によって、サブクローン間において keratin-1, 10, 14 の発現に有意な差があることが明らかとな

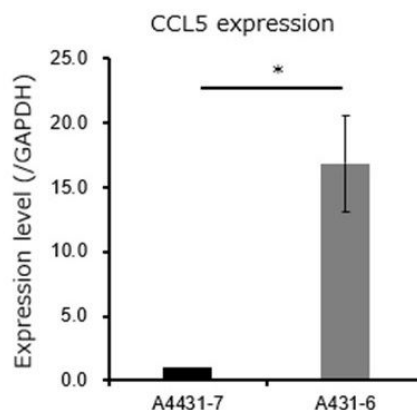
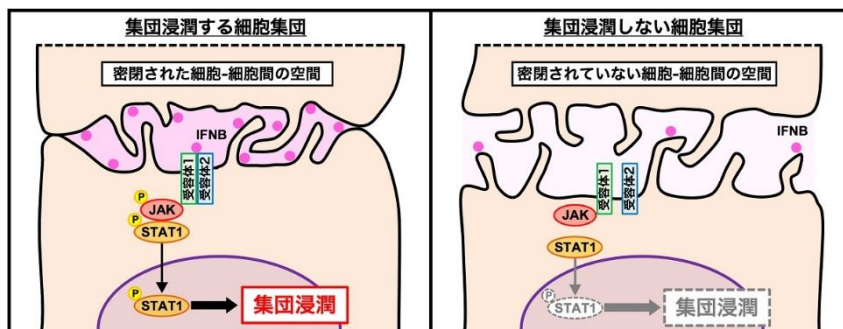
っていた。これらはいずれも低浸潤サブクローン株で高発現しており、RNA 干渉法によってそれらの発現を抑制したところ、細胞間隙が狭くなり、STAT1 が活性化するという結果を得た。つまり、keratin-1, 10, 14 は細胞間隙を広げる働きに関与し、結果として IFNB の蓄積を妨げることで STAT1 の活性を抑制すると考えることができる。しかし、その機序については不明であり、今後詳細な解析が必要である。

同じく DNA マイクロアレイ解析によって、サブクローン間において長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) の発現に有意な差があることが明らかとなっていた。この lncRNA は低浸潤サブクローン株で高発現しており、浸潤能を抑制する可能性がある。そこで、RNA 干渉法によって当該 lncRNA の発現をノックダウンする実験を試みたが、発現抑制に難渋しており、今後実験条件等の検討が必要である。

集団浸潤をもたらすシグナル経路の探索については目覚ましい成果が得られ、集団浸潤を誘引する物質として CCL5 という分泌タンパク質を見出すことができた。CCL5 はこれまで乳がんや前立腺がんにおいて、がん細胞の増殖、浸潤に関与することが知られていた。A431 細胞において CCL5 の mRNA 発現量を調べたところ、高浸潤のサブクローン株では低浸潤のサブクローン株に比べて 15 倍以上も発現していることが明らかとなった(右図)。さらに、高浸潤のサブクローン株において、RNA 干渉法を用いて CCL5 の発現をノックダウンし、3次元コラーゲンゲル包埋下で蛍光観察を行ったところ、集団浸潤が有意に抑制されることが明らかとなった。加えて、CCL5 のノックダウンによって、INFB と STAT1 の発現が抑制されるという興味深い結果を得た。さらに、CCL5 は NF- κ B 経路、PI3K 経路に関与することが報告されているので、これらの経路が集合浸潤に関与する可能性についても調べた。特筆すべき結果として、CCL5 の受容体である C-C motif chemokine receptor 5 (CCR5) の阻害剤を投与する実験を行ったところ、集団浸潤を有意に抑制することに成功した。

細胞間に特異的に見られる仮足構造の解析については、浸潤能の異なるサブクローン間においてケラチンファミリーの発現に有意な差があることが明らかとなったが、集団浸潤に関わる細胞間接着や仮足形成タンパク質の同定には至っていない。マイクロアレイの結果を再度検討することで、仮足形成と集団浸潤の関係を明らかにしたい。

集団浸潤の普遍性の確認については、ヒト臨床検体において、STAT1 の活性が集団浸潤の亢進に関与することを見出すことができた。一方で、浸潤能が高い各種がん細胞株をコラーゲンゲル中に3次元包埋培養したところ、集団浸潤は示さずに、個々の細胞がバラバラに浸潤する様子が観察された。実験で用いたコラーゲンゲルが生体内の間質に比べて軟らか過ぎる可能性があるため、コラーゲンの濃度を上げる、あるいはコラーゲンを架橋するなどの課題が明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4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 27
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 NF B	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 -

1. 著者名 S. Ishihara and H. Haga	4. 巻 14
2. 論文標題 Matrix Stiffness Contributes to Cancer Progression by Regulating Transcription Factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14041049	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 熊谷 祐二, 石原 誠一郎, 芳賀 永
2. 発表標題 I型インターフェロン経路の亢進は扁平上皮がん由来サブクローン細胞の集団浸潤を引き起こす
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 熊谷 祐二, 小林 純子, 石原 誠一郎, 芳賀 永
2. 発表標題 STAT1活性化は皮膚扁平上皮癌の集団浸潤を促進する
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 熊谷 祐二, 小林 純子, 石原 誠一郎, 榎本 篤, 芳賀 永
2. 発表標題 STAT1活性化細胞により誘引される皮膚扁平上皮がんの集団浸潤
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
研究 分担 者	小林 純子 (仁尾純子) (Nio-Kobayashi Junko) (70447043)	長崎大学・高度感染症研究センター・准教授 (17301)	

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