

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15513

研究課題名（和文）間質圧の上昇が肺癌の病態に果たす役割の解明とその治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the role of the increase of interstitial pressure on the pathophysiology of lung cancer and the development of novel treatment

研究代表者

徳田 深作（Tokuda, Shinsaku）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：00433277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：間質圧の上昇が癌の病態において果たす役割を明らかにするため、肺癌細胞に基底側から静水圧を加えた影響を調べた。基底側からの圧力によって細胞増殖の亢進、細胞極性の異常、細胞運動の亢進や上皮の重層化が引き起こされ、間質圧の上昇は腫瘍の促進に寄与しており、肺癌の病態において重要な役割を果たすことが明らかになった。

肺癌細胞が圧力を感知するメカニズムを解析するため、圧が直接的に加わると考えられるタイトジャンクション構成タンパク質の一つであるZO-1を遺伝子ノックアウトしたクローンを作成したが、上皮シートを形成できなくなり実験的に圧力の影響を検討することができなかつたため、解決方法について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行期の肺癌に対する治療は近年進歩しており、細胞障害性抗がん剤に加えて分子標的薬や免疫治療の開発が進み、治療成績も向上している。しかし、未だに進行期の肺癌は根治が難しい状況である。腫瘍の周囲では物理的な圧力が高くなっているが、本研究では物理的な圧力が肺癌の促進に重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後、癌細胞が圧力を感知するメカニズムの詳細がさらに明らかになれば、肺癌の新たな治療法の開拓につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The role of increased interstitial pressure on cancer cells is unknown. We investigated the effects of hydrostatic pressure on lung cancer cells. The pressure from basal side promoted cell proliferation, induced abnormal cell polarity, accelerated cell migration, and induced stratification of the epithelia. These results revealed that the increased interstitial pressure contributes tumor progression and plays an important role in the pathophysiology of lung cancer. In addition, we investigated the mechanism by which lung cancer cells sense the pressure from basal side. The pressure from basal side is thought to generate the mechanical force to tight junctions. Therefore, we established knockout cell clones of ZO-1, one of the major tight junction proteins. However, ZO-1 knockout cell clones did not form epithelial sheet and we could not test the effect of pressure from basal side experimentally. We developed the method to study the effect of pressure to overcome this technical problem.

研究分野：がん細胞生物学

キーワード：肺癌 間質圧 細胞極性 腫瘍微小環境 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は癌の危険因子であることが知られており、炎症に対する免疫応答で分泌されるサイトカインなどが発癌促進に働くことがその一因であると考えられている (Balkwill and Mantovani. *Lancet*. 2001; Coussens and Werb. *Nature*. 2002)。一方、慢性炎症は間質の圧を上昇させることが知られており、ほとんど全ての癌組織でも間質圧の上昇を認めることが報告されている (Heldin et al., *Nat Rev Cancer*. 2004; Tokuda et al., *Int J Mol Sci*. 2019)。しかし、間質圧が上皮細胞に及ぼす直接的な影響を調べた報告はほとんどなく、癌の病態において果たす役割はよく分かっていなかった。

申請者は基底側からの物理的な圧力が上皮細胞に及ぼす影響を調べるため、培養上皮細胞である MDCK 細胞を多孔メンブレンに培養して管腔側と基底側の培地の高さを変えることによって静水圧を加えてその影響を検討した。その結果、基底側から管腔側への静水圧によって上皮の重層化が引き起こされ、細胞増殖の亢進などの細胞機能の変化が認められた (Tokuda et al., *PLoS One*. 2015)。

これらの結果から、間質圧の上昇によって引き起こされる基底側からの圧力は細胞増殖の亢進など腫瘍の促進をもたらすと考えられるが、上皮細胞がどのようにして静水圧を感知して様々な細胞応答を示すのか、その詳細なメカニズムは未だによく分かっていない。

タイトジャンクションは細胞間接着装置の一つであり、上皮細胞の細胞間隙の物質透過性を制御しており、基底側からの圧力はタイトジャンクションに物理的な力として加わると考えられる。申請者はタイトジャンクションが静水圧などの細胞外環境の「センサー」として機能している可能性に注目して研究を続けており、これまでの研究結果からタイトジャンクションが浸透圧のセンサーとして機能することや (Tokuda et al., *PLoS One*. 2016) タイトジャンクション構成タンパク質であるクローディン-1 をノックアウトすると上皮の重層化や極性異常が生じることが分かっている。

本研究では静水圧が肺癌細胞に及ぼす影響を解析してタイトジャンクションの「センサー」としての機能を解析し、間質圧の上昇が癌の病態に果たす役割を調べる。

2. 研究の目的

本研究は、基底側からの圧力が肺癌細胞に及ぼす影響を明らかにして、間質圧の上昇が肺癌の病態において果たす役割を明らかにすることを目的としている。さらに肺癌細胞でも基底側からの圧力によって腫瘍の促進に寄与する細胞機能の変化が認められた場合には、細胞増殖の亢進などの細胞応答を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とする。特にタイトジャンクションの細胞外環境センサーとしての役割を解析明らかにすることによって、新たな癌の治療法を開拓するとともにタイトジャンクションの新たな機能の解明やタイトジャンクションを構成する様々なタンパク質の生理的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでの申請者の研究結果から、上皮細胞に基底側から静水圧を加えると癌と共通した形質が引き起こされることが分かっている。しかし、癌細胞を用いてメカニズムを詳細に検討した報告はまだなく、その病態生理学的な意義は未だによく分かっていない。そこで本研究では肺癌細胞を用いて間質圧の上昇が及ぼす影響について検討を行った。

肺癌細胞を多孔メンブレン上に培養して、上皮シートの形成後に管腔側と基底側の培地の高さを変えることによって上皮シートに静水圧差を加え、基底側からの圧力が及ぼす影響を検討した。

細胞・上皮の構造変化は走査型電子顕微鏡やトルイジンブルー染色法を用いた光学顕微鏡によって行った。細胞極性の変化については透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析や免疫蛍光抗体法による解析を行った。

細胞増殖については上皮シートを維持した状態で解析する必要があるため、BrdU 法を用いて解析を行った。アポトーシスの解析は TUNEL 法や cleaved PARP の発現解析によって行った。

細胞運動への影響を調べるため、KEYENCE 社の BZ-X810 顕微鏡を用いて time-lapse imaging を行った。EGFP の恒常発現株を作成し、多孔メンブレン上に逆向けに培養してガラスボトムデ

イッシュとアクリルの筒を用いた装置を作成して観察を行った。

遺伝子ノックアウトは CRISPR/Cas9 法を用いて行った。塩基配列は PCR 増幅産物をサンガーシーケンス法で解析を行った。

4. 研究成果

はじめに、肺癌細胞に対して基底側からの圧力が及ぼす影響について検討を行った。静水圧を加えるため肺癌細胞を多孔メンブレンに培養したところ、HCC4011、HCC827、H1975 の細胞株では上皮シートを形成して培地の水面差を維持することができた。そこで、これらの3つの細胞株で基底側からの圧力が及ぼす影響について検討を行った。

まず静水圧差を用いて管腔側あるいは基底側から圧力を加えてその影響を検討したところ、いずれの細胞株においても基底側からの圧力によって上皮の重層化が引き起こされた(図1)。

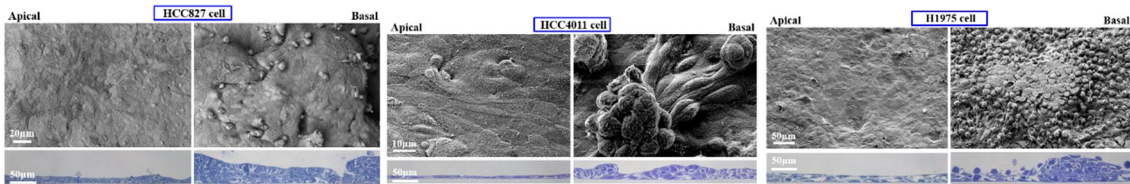


図1：基底側からの圧力が肺癌細胞に及ぼす影響

上図：走査型電子顕微鏡図。下図：垂直切片のトルイジンブルー染色後の光学顕微鏡図

HCC4011、HCC827、H1975 のいずれの細胞株においても基底側からの圧力によって重層化が引き起こされた。

次に、基底側からの圧力によって引き起こされる上皮の重層化の経時変化を調べた。基底側から圧力を加えると、翌日から上皮の重層化が認められ、経時的に重層化が進行する様子が観察された。さらに、4日目に基底側からの圧力をなくすと重層化した上皮が元の単層に近い状態に戻ることが確認された(図2)。

上皮の重層化には細胞極性の変化が関与する可能性が考えられるため、透過型電子顕微鏡による解析を行った。基底側からの圧力によって上皮が重層化した際には内部に腔が形成されており、腔の表面では管腔側に形成される微絨毛やタイトジャンクションが認められた。さらにヒトの肺癌組織を透過型顕微鏡で観察したところ、同様の極性異常はヒトの肺癌組織でも確認された(図3、図4)。

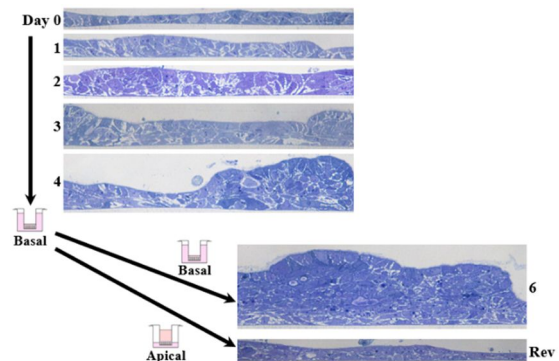


図2：基底側からの圧力による上皮の重層化の経時変化(HCC827細胞)

4日目に基底側からの圧力をなくすと重層化した上皮は元に戻ることが確認された。

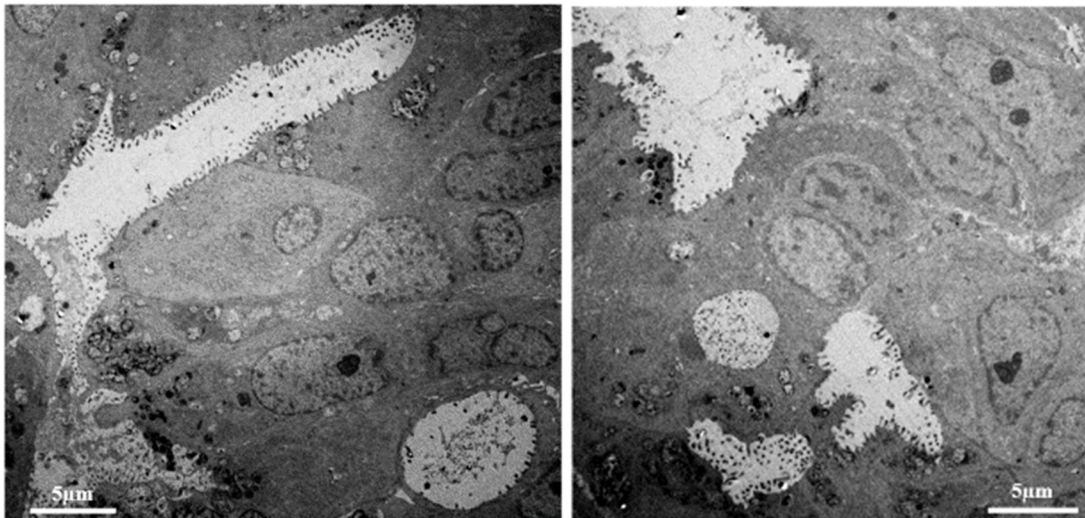


図3：ヒト肺癌組織の透過型電子顕微鏡図

腺管構造の内部から離れた部位に腔が観察された。

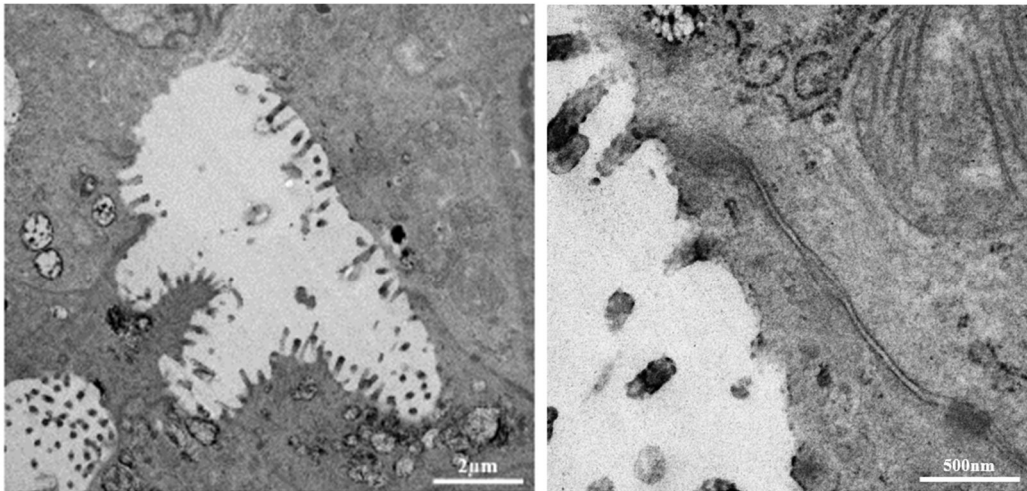


図4：ヒト肺癌組織の腔の部分の透過型電子顕微鏡の強拡大図
腔の表面に微絨毛やタイトジャンクションが観察された。

さらに、透過型電子顕微鏡で認められたタイトジャンクションと考えられる腔の表面の構造にタイトジャンクション構成タンパクが局在するかどうかを確認するため、タイトジャンクション構成タンパク質の一つである ZO-1 の局在を免疫蛍光抗体法を用いて観察した。ZO-1 は細胞間の上皮の管腔側の端の部分だけでなく、腔の表面にも局在を示した（図5）

これらの結果から、肺癌細胞に基底側から圧力が加わると、細胞の極性異常が引き起こされることが明らかになった。

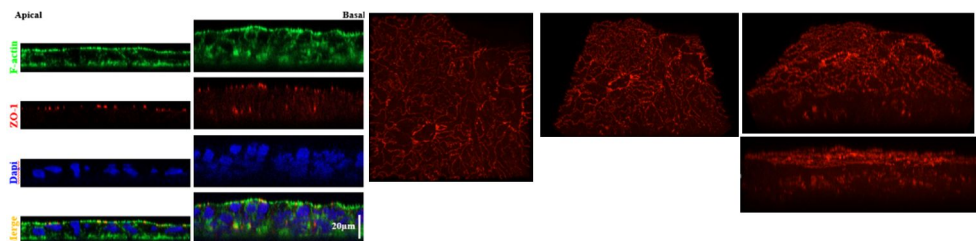


図5：HCC827 細胞の免疫蛍光染色図

左：Z 軸断面図

右：ZO-1 のシグナルを 3D 構築した図

タイトジャンクション構成タンパク質の ZO-1 は重層化内部の腔にも局在した。

次に、基底側からの圧力が細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。基底側から圧力を加えると、12 時間後から細胞増殖の亢進が認められた（図6）。さらにアポトーシスへの影響について TUNEL 法を用いて検討を行ったところ、管腔側から圧力を加えた条件と基底側から圧力を加えた条件で TUNEL 陽性細胞の数に差は認められなかった。そこで基底側の圧力を4日間目になくした際に重層化した上皮が単層に戻る際にアポトーシスが生じているかどうかを確認するため、同条件で TUNEL assay を行ったところ、TUNEL 陽性細胞の著明な増加が認められ、cleaved PARP の発現増加も確認された。これらの結果から、基底側からの圧力によって細胞増殖の亢進、アポトーシスの抑制が引き起こされることが明らかになった。

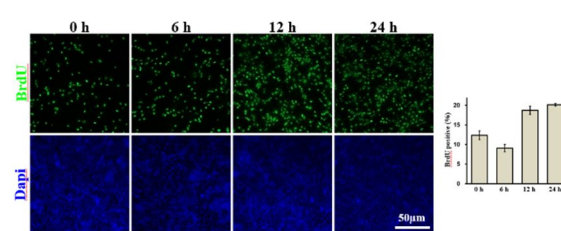


図6：BrdU 法による細胞増殖の解析

基底側から圧力を加えた条件で BrdU 陽性細胞の数・割合が増加していることが確認された。

さらに、基底側からの圧力が細胞運動に及ぼす影響について検討を行った。基底側から圧力を加えると、2 時間から細胞運動が亢進することが確認された（図7）

これらの結果から、肺癌細胞に対して基底側からの圧力が加わると、細胞増殖の亢進、アポトーシスの抑制、細胞運動の亢進、細胞極性の異常が引き起こされ、上皮の重層化が生じると考えられた。

最後にタイトジャンクションがこれらの反応に関与する可能性を調べるため、タイトジャンク

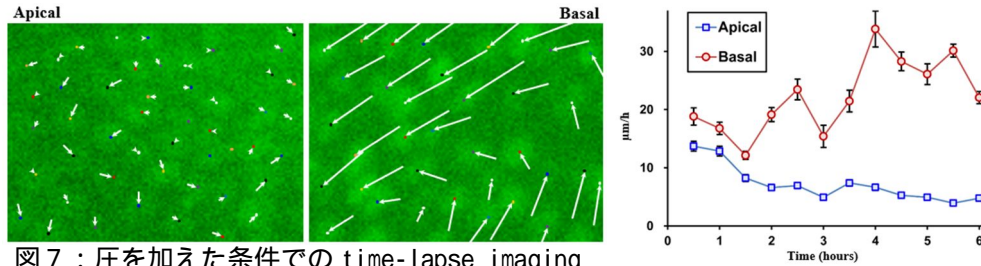


図7：圧を加えた条件での time-lapse imaging
NucSpot を用いて核を染色して time-lapse imaging を行った。
左図：30 分間での移動距離（矢印）
右図：圧を加えた条件での細胞の移動速度の経時的な変化

シオン構成タンパク質の Z0-1 の遺伝子ノックアウトを行った。CRISPR/Cas9 法を用いて Z0-1 ノックアウト細胞を 2 クローン作成して多孔フィルターに培養したところ、いずれのクローンでも上皮シートが形成されなかった。タイトジャンクション構造タンパク質の遺伝子ノックアウトによって上皮のバリア機能が傷害されていると考えられた。

ほとんどすべての癌組織で認められる間質圧の上昇によって、癌細胞には基底側から物理的な圧力が加わっていると考えられる。本研究によって、基底側からの圧力は、細胞増殖の亢進、細胞極性の異常、細胞運動の亢進など様々な細胞機能に影響を及ぼすことが示唆された。これらの細胞機能の変化はいずれも腫瘍増殖、浸潤、転移など腫瘍の促進に寄与すると考えられ、間質圧の上昇が癌の病態において重要な役割を果たすことを示唆していると考えられる。

本研究では基底側からの物理的な圧力を癌細胞が感知するためにタイトジャンクション構成タンパク質の一つである Z0-1 を遺伝子ノックアウトしたクローンを作成したが、Z0-1 ノックアウトクローンでは上皮シートを形成できなくなり、実験的に圧力の影響を調べることができなかった。

現在、上記の実験的な問題点を解決するために予備的な検討をすすめている。基底側か圧を加えた条件では上皮シートを形成した後に上から肺癌細胞を加えたときに細胞が生き残ることが確認されており、今後はこの実験系を用いて、癌細胞が基底側からの圧力を感知して様々な細胞機能の調節におけるタイトジャンクションを含めたセンサーと想定される構造の役割を明らかにする予定である。さらに、圧力を感知した後に様々な細胞機能を調節するメカニズムを明らかにして、新たな方向からアプローチする癌の治療法の開拓を目指す予定である。

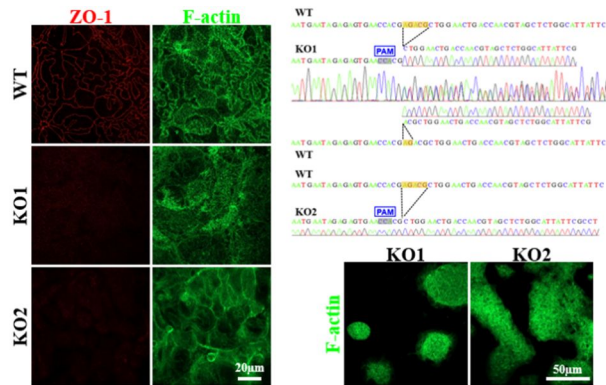


図8：Z0-1 ノックアウトクローン
HCC827 細胞で CRISPR/Cas9 法を用いて Z0-1 ノックアウトクローンを作成した。免疫染色法で Z0-1 シグナルの消失が確認され、DNA シークエンシングですべての allele のフレームシフトが確認された。
いずれのクローンでも多孔フィルターに培養したときに上皮シートが形成されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katayama Y, Yamada T, Tokuda S, Okura N, Nishioka N, Morimoto K, Tanimura K, Morimoto Y, Iwasaku M, Horinaka M, Sakai T, Kita K, Yano S, Takayama K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Heterogeneity among tumors with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors harboring EGFR-T790M mutation in non-small cell lung cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 944-955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4504	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 Katayama Yuki, Yamada Tadaaki, Tokuda Shinsaku, Okura Naoko, Nishioka Naoya, Morimoto Kenji, Tanimura Keiko, Morimoto Yoshie, Iwasaku Masahiro, Horinaka Mano, Sakai Toshiyuki, Kita Kenji, Yano Seiji, Takayama Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Heterogeneity among tumors with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors harboring <i>EGFR</i> T790M mutation in non small cell lung cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 944～955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4504	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinsaku Tokuda, Keisuke Onoi, Tadaaki Yamada, Koichi Takayama
2. 発表標題 Effects of interstitial pressure on lung cancer cells
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------