

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：72609

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15518

研究課題名（和文）細胞クラスター形成を介した癌の腹膜播種機構

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms of cell clustering-mediated peritoneal dissemination

研究代表者

宮崎 允（MIYAZAKI, Makoto）

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員

研究者番号：20804131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：スキルス胃癌や卵巣癌で見られる腹膜播種は患者のQOL悪化および予後不良の直接的な原因であるが、未だ有効な治療法は確立されていない。本研究では癌細胞が腹腔内においてクラスターを形成するという現象に着目し、腹膜播種の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。癌細胞は腹腔内において組織因子を介して血液凝固系活性化およびフィブリン形成を誘導し、そのフィブリンを介してクラスター形成および腹膜へ接着することで転移巣を形成することを発見した。腹腔内におけるフィブリンを介したクラスター形成が腹膜播種に対する新規治療標的とな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

本研究では、未だ有効な治療法が確立されていない腹膜播種について、その分子メカニズムの一端を明らかにし、新規治療標的となる分子を発見した。具体的には、腹腔内における癌細胞による血液凝固系活性化およびフィブリンを介したクラスター形成が腹膜播種に重要であり、新規治療標的となることを示した。これにより、抗凝固薬により腹膜播種を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Peritoneal metastasis is the cause of worse QOL and poor prognosis in scirrhous gastric cancer and ovarian cancer, but no effective treatment remains established. This study investigated how cancer cells form clusters in the peritoneal cavity and how this contributes to peritoneal metastasis. We found that cancer cells activate coagulation cascade via tissue factor and induce fibrin formation in the peritoneal cavity to form fibrin-mediated cell clusters and accelerate peritoneal attachment, resulting in the development of peritoneal metastasis. Our findings identify a novel mechanism of peritoneal metastasis that may be a potential therapeutic target.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腹膜播種 スキルス胃癌 血液凝固系 組織因子 フィブリン

1. 研究開始当初の背景

転移は癌による主な死亡原因であり、その克服は癌治療において最も重要な課題である。転移には血行性転移、リンパ行性転移、腹膜播種の主に3つの様式があるが、この中でも腹膜播種は詳細な分子機構について不明な点が多く、癌種に依らない共通の分子メカニズムについてもわかっていない。腹膜播種は胃癌、膵臓癌、大腸癌、卵巣癌等で認められ、患者のQOL低下、予後不良の最も大きな要因であるため、有効な治療法の開発が急務である。

乳癌の血行性転移においては、クラスターを形成した血中循環癌細胞が高い転移能を持つこと、ポリクローナル転移巣の起源であることが報告されている（文献①、文献②）。一方、腹膜播種では癌患者の腹水中で癌細胞の一部がクラスターを形成していることが知られている（文献③、文献④）。しかし、そのような腹水中に存在する癌細胞クラスターの形成機構や腹膜播種巣の形成への寄与については不明な点が多い。

申請者はこれまでに、①ヒト癌細胞株を用いたマウス腹膜播種モデルにおいて、胃癌、膵臓癌、大腸癌、卵巣癌の単一の腹膜播種巣は複数細胞に由来するポリクローナルな腫瘍であること、②腹水中でクラスターを形成した胃癌細胞が腹膜に接着することで転移巣を形成していることを明らかにした。さらに興味深いことに、*in vitro*でマウス由来腹水をヒト癌細胞株（胃癌、膵臓癌、大腸癌、卵巣癌）の培養液中に添加すると、顕著な細胞凝集が誘導されることを発見した。申請者はこれらの結果からは、「癌細胞の腹水中におけるクラスター形成は腹膜播種に重要な現象であり、共通の分子メカニズムが存在するのではないか？」と考えるに至った。そこで本研究では、申請者らがこれまでの研究で得た知見をもとに、腹膜播種に共通するメカニズム、特に腹水中癌細胞クラスターの形成機構および腹膜播種におけるクラスター形成の意義に焦点を当て解析することとした。

2. 研究の目的

(1) 腹腔内における癌細胞クラスターの形成機構の解明

腹膜播種の分子メカニズムを解明するために、腹水中における癌細胞のクラスター形成の分子メカニズムおよび腹膜播種における役割を明らかにする。特に、複数の癌種を用いて横断的に解析することで腹膜播種に共通する分子メカニズムを明らかにすることを目標とする。

(2) クラスター形成阻害による腹膜播種抑制効果の検証

癌細胞クラスター形成の阻害による腹膜播種に対する影響を明らかにする。この結果から腹膜播種の治療戦略として、クラスター形成阻害という新たな概念を提案する。

3. 研究の方法

(1) クラスター形成阻害剤の探索

癌細胞（スキルス胃癌、卵巣癌、膵臓癌、大腸癌）をトリプシン処理後培地で懸濁し、細胞低接着プレートに播種した。そこへマウスあるいは癌患者由来腹水を阻害剤と共に添加した。37℃で0.5から1時間インキュベーション後、位相差顕微鏡を用いて細胞を観察し、クラスター形成状態を判別した。

(2) クラスター形成に関与する分子の解析

まず、CRISPR-Cas9により*F3*(TF)遺伝子をノックアウトするためのコンストラクトを作成した。lentiCRISPRv2(Addgene, Plasmid #52961)に*F3*遺伝子を標的とするための配列を挿入した。作成したコンストラクトを用いてレンチウイルスを産生し、それを癌細胞に感染させた後シングルセルクローニングを行った。各クローンのTF発現をウエスタンブロットにより解析した。樹立したTFノックアウト(TFKO)癌細胞について、(1)と同様の方法で*in vitro*におけるクラスター形成を評価した。

(3) TFKOによる腹腔内クラスター形成への影響の解析

(2)で樹立したTFKO癌細胞およびTF野生型(TFWT)癌細胞をヌードマウス腹腔内へ移植し、4時間後に腹腔洗浄液を回収した。回収した腹腔洗浄液へ1/3容量の16% formaldehydeを加えて固定した後、35 μm セルストレーナーを用いてクラスターを分離した。回収したクラスターをPBS(-)で懸濁した後24-wellプレートへ移し、顕微鏡下で個数を数えた。

(4) TFKOによる腹膜播種への影響の解析

TFWT癌細胞およびTFKO癌細胞をヌードマウス腹腔内へ移植し、2週間後に転移巣を採取して大網腫瘍重量および腸間膜腫瘍数を測定した。腸間膜腫瘍については直径1 mm以上の転移巣の個数を数えた。

(5) 血液凝固系を介した癌細胞クラスター形成メカニズムの解析

① ウェスタンブロット法によるフィブリンの検出

(1)と同様に *in vitro* において癌細胞のクラスター形成を誘導した後、癌細胞クラスターを回収して PBS(-) で洗浄し、1x Urea SDS sample buffer で溶解した。ウェスタンブロット法によるフィブリンの検出には、抗フィブリノーゲン γ 鎖抗体 (Santa Cruz 社) および抗フィブリン (β 鎖) 抗体 (Merck 社) を用いた。

② 免疫蛍光染色によるフィブリンのイメージング

(3)と同様に蛍光標識した癌細胞を移植したマウス腹腔内から腹腔洗浄液を回収し、セルストレーナーを用いて癌細胞クラスターを回収した。iPGel1 (GenoStaff 社) を用いて癌細胞クラスターをゲル中に包埋した後、凍結切片を作成して免疫蛍光染色を行った。フィブリノーゲンの染色には抗フィブリノーゲン α 鎖抗体 (proteintech 社)、核染色に DAPI を用いた。

(6) 細胞クラスター形成及びフィブリンの癌細胞-中皮細胞間接着に与える影響の解析

まず GFP を発現させたスキルス胃癌細胞 (44As3-GFP 細胞) を 96-well U 底プレートで培養し、クラスターを形成させた。次に 96-well プレートで単層培養したヒト中皮細胞 (MeT-5-dTomato 細胞) 上に癌細胞クラスターを播種した。この際、①ピペッティングにより分散させる (シングルセル)、②処理なし (クラスター)、③ヘパリン添加 (クラスター+ヘパリン)、④腹水添加 (クラスター+腹水)、⑤腹水およびヘパリン添加 (クラスター+腹水+ヘパリン) を行った (図 3D)。37°C で 30 分間インキュベーション後、PBS(-) で 3 回洗浄し、細胞溶解バッファーを加えて細胞を溶解した。プレートリーダーにより GFP の蛍光を測定することで、中皮細胞に接着した癌細胞数を定量した。

4. 研究成果

(1) 抗凝固薬は腹水により誘導される癌細胞のクラスター形成を阻害する

最初に、*in vitro* において、腹水により誘導される癌細胞のクラスター形成に対する阻害剤の小規模スクリーニングを実施した。その結果、EDTA、ヘパリンおよびフィブリン重合阻害ペプチド GPRP によりスキルス胃癌細胞のクラスター形成が阻害された (図 1A)。一方で、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 阻害ペプチドである cyclo(RGDfV) ではクラスター形成は阻害されなかった。さらに、抗凝固薬である Edoxaban および Argatroban でも同様にスキルス胃癌細胞のクラスター形成が阻害された (図 1B)。さらに、卵巣癌細胞 (SK-OV-3)、膵臓癌細胞 (MIA PaCa-2)、大腸癌細胞 (HT-29) のクラスター形成についても同様にヘパリンにより阻害された。

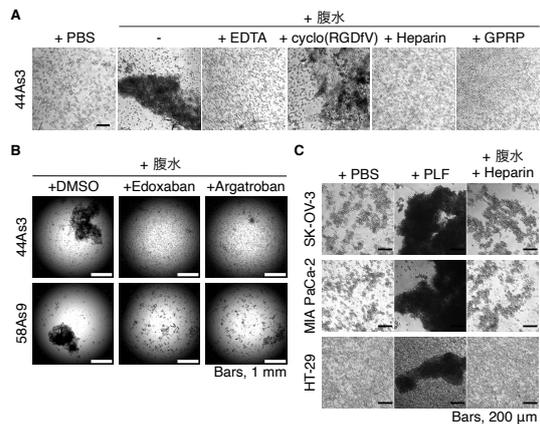


図1 クラスター形成阻害剤の同定

これらの結果から、血液凝固系の活性化およびフィブリン形成が、腹水により誘導される癌細胞のクラスター形成に関与することが示唆された。

(2) TF は癌細胞の腹水により誘導されるクラスター形成に関与する

過去の研究により、癌細胞による血液凝固系の活性化には組織因子 (TF) が関与していることが知られている (文献⑤)。そこで CRISPR-Cas9 システムを用いて TFKO 癌細胞株 (スキルス胃癌) を樹立した (図 2A)。TFKO 癌細胞株に対して腹水処理を行なった結果、クラスター形成は認められなかった (図 2B)。よって、腹水により誘導される癌細胞のクラスター形成には、TF を介した血液凝固系の活性化が必要であることが示唆された。

(3) TF は癌細胞のマウス腹腔内におけるクラスター形成に関与する

次に、TFKO 癌細胞および TFWT 癌細胞をヌードマウス腹腔内へ移植し、腹腔内におけるクラス

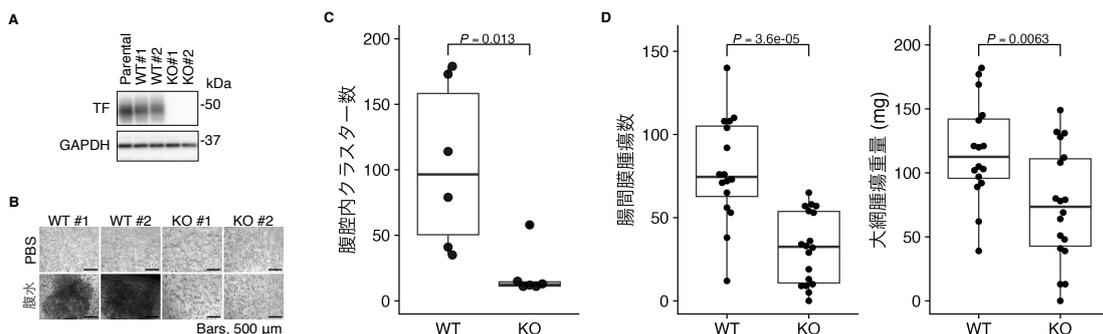


図2 TFKOによるクラスター形成および腹膜播種への影響

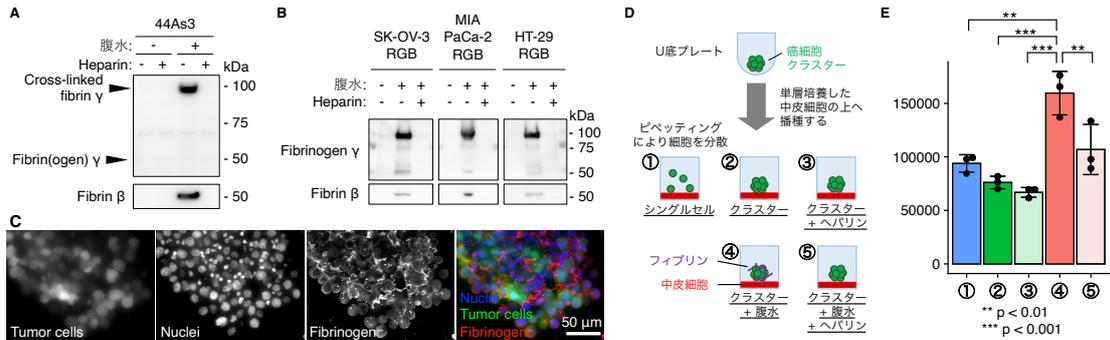


図3 腹膜播種におけるフィブリンの機能解析

ター形成を比較した。その結果、TFKO 癌細胞は TFWT 発現癌細胞に比べ、有意にクラスター数が減少していた(図 2C)。よって、in vitro の結果と同様に、マウス腹腔内における癌細胞のクラスター形成にも TF が関与することが示唆された。

(4) TFKO により腹膜播種が抑制される

次に、TFKO 癌細胞と TFWT 癌細胞の転移能を比較した。癌細胞をヌードマウス腹腔内へ移植し、2 週間後に腹膜播種巣を調べた。その結果、TFKO 癌細胞では TFWT 癌細胞に比べ、腸間膜腫瘍数および大網腫瘍重量が有意に減少していた(図 3D)。(3)において TFKO によりクラスター形成が抑制されたことと合わせると、腹腔内におけるクラスター形成が腹膜播種に重要であることが示唆された。

(5) 癌細胞のクラスター形成にはフィブリン繊維が関与する

(1)において GPRP によりクラスター形成が阻害されたことから、血液凝固系活性化により生じたフィブリン繊維が癌細胞のクラスター形成に関与することが予想された。そこで in vitro における腹水処理および腹腔内で形成した癌細胞クラスター中にフィブリンが含まれるかを調べた。まず、腹水により形成した癌細胞クラスターについてウエスタンブロットにより解析した結果、フィブリンが含まれることがわかった(図 3A, B)。さらに、ヘパリン処理によりフィブリン形成が阻害された(図 3A)。次に、マウス腹腔内において形成した癌細胞クラスターの免疫蛍光染色を行った。その結果、クラスター内でフィブリン繊維が癌細胞に絡まるように存在している様子が観察された(図 3C)。このことから、癌細胞は腹腔内においてフィブリン繊維を介して集結しクラスター形成していることが示唆された。

(6) フィブリンは癌細胞-中皮細胞間接着を促進する

癌細胞-中皮細胞間の細胞接着におけるクラスター形成およびフィブリンの影響について in vitro 接着アッセイにより評価した。図 5D に示すように、5 つの条件下においてスキルス胃癌細胞の中皮細胞への接着を比較した。その結果、クラスター形成は細胞間接着に影響しないが、一方でフィブリンは癌細胞と中皮細胞の接着を促進することがわかった(図 3E)。

(7) 総括

本研究の結果をまとめると、癌細胞は腹腔内において TF を介してフィブリン形成を誘導し、そのフィブリンを介してクラスター形成および腹膜へ接着することが明らかになった(図 4)。このことからフィブリンを介したクラスター形成が腹膜播種に対する新規治療標的となることが示唆された。申請者は、これまでにマルチカラー蛍光イメージングを用いた腹膜播種の解析から、腹膜播種巣が多細胞に由来するポリクローナル腫瘍であることを見出していた。今回の研究によって、そのような転移巣は腹腔内においてフィブリンを介して集合した癌細胞クラスターに由来することが明らかになった。一方で、腹膜播種における癌細胞のクラスター形成の意義は未だ不明である。今後は、クラスター形成に伴う遺伝子発現変化等の癌細胞の性質変化に着目し研究を進めていく予定である。

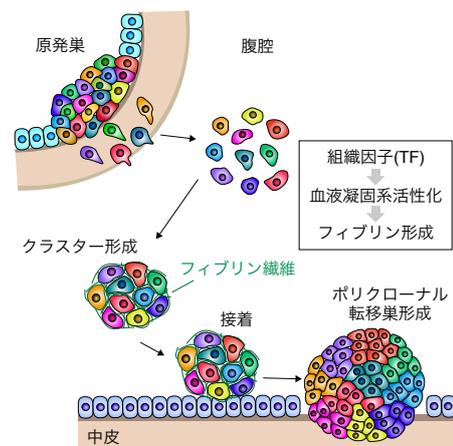


図4 血液凝固系を介したポリクローナル転移

<引用文献>

- ① Cheung KJ et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14- expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016.
- ② Aceto N et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014.

- ③ Majima T et al. Prognostic significance of the cytologic features of free cancer cells in the peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *Surg Today* 2002.
- ④ Park CK et al. Diagnostic algorithm for determining primary tumor sites using peritoneal fluid. *PloS One* 2018.
- ⑤ van den Berg YW et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood* 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Miyazaki Makoto, Nakabo Ayaka, Nagano Yoshiko, Nagamura Yuko, Yanagihara Kazuyoshi, Ohki Rieko, Nakamura Yoshikazu, Fukami Kiyoko, Kawamoto Jun, Umayahara Kenji, Sakamoto Masaru, Iwaya Keiichi, Yamaguchi Hideki	4. 巻 553
2. 論文標題 Tissue factor-induced fibrinogenesis mediates cancer cell clustering and multiclonal peritoneal metastasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 215983 ~ 215983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2022.215983	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮崎 允、永野 佳子、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 スキルス胃癌における凝固系活性化によるクラスター形成を介した腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第31回 がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 允、柳原 五吉、大木 理恵子、山口 英樹
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanisms underlying peritoneal metastasis mediated by coagulation-induced cell-clustering
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 允、柳原 五吉、深見 希代子、大木 理恵子、山口 英樹
2. 発表標題 がん細胞による血液凝固系活性化はクラスター形成および多細胞性転移に関与する
3. 学会等名 第45回 日本分生生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 允、永村 ゆう子、山口 英樹
2. 発表標題 Tissue factor-induced fibrinogenesis and cancer cell clustering contribute to polyclonal peritoneal metastasis in diffuse-type gastric carcinoma
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎 允、永野 佳子、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 スキルス胃癌における腹腔内クラスター形成を介した腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第30回 がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 允、永野 佳子、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 Analysis of intraperitoneal cell clustering-mediated dissemination of scirrhous gastric carcinoma
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
---------	---------