

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21019

研究課題名（和文）メカノバイオロジーから迫る血中循環腫瘍細胞クラスターの特性の解明

研究課題名（英文）Clarification of the characteristics of circulating tumor cell cluster from the perspective of mechanobiology

研究代表者

前城 学（Maeshiro, Manabu）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：40906145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：原発巣から循環腫瘍細胞（circulating tumor cells: CTCs）として遠隔臓器に播種し生着した癌細胞は、一定期間休眠状態で潜伏し、転移巣形成のシードとなる。申請者らは、転移性休眠を再現する担癌マウスモデルに高解像度トラッキング法を応用し、特定の癌細胞集団のみが血中の流体剪断応力に適応可能なCTCクラスターを形成することで、効率的に遠隔臓器に生着することを見出した。そしてこの知見をもとに、転移過程における癌細胞の力覚応答能の違いに基づくクローン選択の存在を世界に先駆けて提唱した。これを“メカノセレクション”と名付け、メカノバイオロジーの観点から癌の転移について病態を捉えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の知見は、転移過程でのクローン選択の基盤にメカノバイオロジカルな機構が存在することを示している。近年、足場の硬さや力といった力学的環境が癌細胞の悪性形質と関連することが示されている。また本研究結果から、特殊な力覚応答性は原発巣で既に付与されている可能性が示された。特に癌細胞におけるゲノム異常のメカノセレクションへの関与は診断学的に重要であると考えられる。近年、医用画像の撮影解析技術の発展から、心血管系や臓器・組織の微細な力学的特性の違いを捉えることが可能となりつつある。今後は、臨床レベルでもメカニカルな観点で病態を捉えていくことが癌の診断治療を開発していく上で重要な一つの課題であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tumor cells that disseminate from the primary lesion to distant organs as circulating tumor cells (CTCs) and engraft, remain dormant for a certain period of time and become seeds for the formation of metastatic lesions. We applied a high-resolution tracking method to a xenograft mouse model that recapitulates metastatic dormancy. We found that only specific tumor cell populations can efficiently engraft distant organs by forming CTC clusters that can adapt to fluid shear stress in blood. Based on this knowledge, he was the first in the world to propose the existence of clonal selection based on differences in the ability of tumor cells to respond to force during metastasis. We named this process "mechanoselection" and understood the pathology of tumor metastasis from the perspective of mechanobiology.

研究分野：癌の浸潤転移

キーワード：CTCs 転移 CTCクラスター メカノトランスダクション DTCs

1. 研究開始当初の背景

原発巣から循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTCs) として遠隔臓器に播種し生着した癌細胞 (disseminated tumor cells: DTCs) は、一定の期間、休眠状態で潜伏し、転移巣形成のシードとなる。申請者は、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) の転移性休眠を再現するマウスモデルに高解像度トラッキング法を応用することで、特定の癌細胞集団のみが血中の流体剪断応力に適応可能な CTC クラスターを形成することで DTCs を占拠することを見出し、個々の癌細胞の力覚応答性がクローン選択に寄与している可能性を世界に先駆けて報告した。この知見に基づき、本研究では、CTC クラスターの形成とその高度転移能を支える分子基盤を力覚応答の観点から解明し、新たな癌の診断・治療戦略を創出することを目指す。

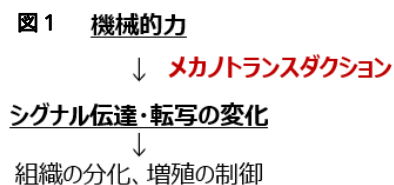
2. 研究の目的

(1) 本研究では、CTC クラスター構成癌細胞が備える特有の力覚応答性を分子レベルで解明し、新たな診断・治療戦略を開発することを目的とする。これまで、メカノストレスが癌の進展にどのように寄与しているかは不明であった。また、CTCs 自体が稀であるため、CTC クラスターの機能的特性についてはほとんど判っていなかった。申請者の提唱する「力覚応答性に基づく転移過程におけるクローン選択」という新しい概念に対して、その分子基盤の構築を試みる本研究は極めて高い独創性を有する。それ故、研究成果は、転移をはじめとした癌進展のメカニズムの理解に新たな枠組みを提供する可能性がある。さらに、癌細胞の力覚応答を攪乱させて血流の機械的力で CTCs を排除するといった、生理的な力を取り入れた合成致死誘導療法を含む、これまでにない革新的な治療戦略の創出に発展する可能性を持っている。この観点では、循環血流という癌種や個人にほとんど依らない力学的環境に着目することで、様々な癌で共通した転移機構の理解や治療法の開発に寄与するかもしれない。

(2) 腫瘍の浸潤の様式に Collective migration という癌細胞集団での集団移動が知られており、低酸素状況では Collective migration が促進される報告がある。さらに、低酸素状況は、CTC クラスターの形成と転移に影響を及ぼすという報告がある (Donato et al, Cell Rep. 2020.)。申請者が樹立し発現解析を行った CTC クラスター起源クローンでは低酸素マーカーである HIF1 や CA IX が高発現であった。現在、原発性腫瘍からの CTC クラスターの脱落を引き起こす生物学的現象は知られておらず、CTC クラスター起源クローンの低酸素状況での浸潤様式やクラスター形成能を調査することは、今後、CTC クラスター形成の予防や阻害に応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 内外の機械的力を察知した CTC クラスターが、それをどのような化学的シグナルに変換しているか(メカノトランスダクション)を明らかにする。申請者は、安定クラスター形成後のアノキス耐性は、細胞種に依らないことを実証している。興味深いことに、CTC クラスター起源クローンは、静置環境ではなく FSS 下でのみアノキス耐性を示したことから、細胞間接着マシナリーとメカノストレスの協調が特有のメカノトランスダクションを誘導することでアポトーシス耐性を含む転移向性プログラムを発揮させていると仮説を立て、その検証を行う (図 1)。



(2) 従来の 2D 培養のシステムは、抗癌剤や試薬への治療に対する腫瘍反応を迅速に評価することができるが、実際の in vivo 構造と比較すると大きく環境が異なる。申請者は、より in vivo 環境に近づけた、生体内の組織環境を模倣する 3D 細胞培養システムを用いることで、より微細な細胞の行動変化をつかむことができる。今回申請者は Hanging drop culture という浮遊培養にて作成した 腫瘍細胞 spheroid をコラーゲンゲル内に封入した 3D 培養の spheroid invasion assay を行い、その細胞集団での浸潤能を評価し、Collective migration の可能性をとした。

4. 研究成果

(1) 流体剪断応力 (FSS) 下で浮遊培養を行い、アノキス耐性凝集体の形成数を評価した。Rac1 阻害では CTC クラスター起源クローン(H)の凝集体形成は阻害されましたが、Rock を阻害しても凝集体安定性に影響はありませんでした (W, EE はその他クローン)。つまり、Rock ではなく Rac1 に依存的なアクトミオシンの調節が FSS 下での安定凝集体形成に必須であることがわかりました (図 2)。

また、ダイナミンを阻害したところ、FSS 下での凝集体数は増加、 γ -セクレターゼ阻害では凝集体数は変化しなかった。カベオリンやクラスリンの抑制は凝集体数増加に働いた (図 3)。つまり、細胞クラスター結合の際に、安定クラスター接合部のアクトミオシン収縮低下が Rho family Rac1 依存的であると仮定するのであれば、GL, H での エンドサイトーシス阻害が γ -セクレターゼ非依存的ななんらかの経路の Rac1 の活性化を引き起こし、接合部でのアクトミオシンの低下に働いているのではと考えました。

図 2

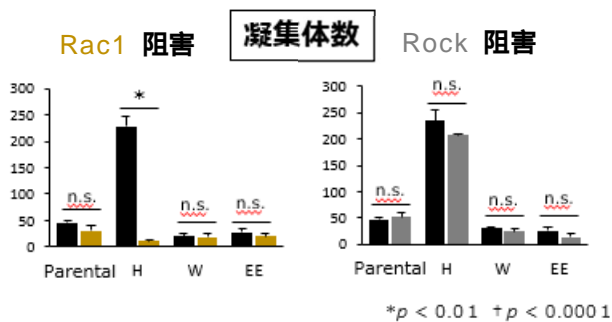
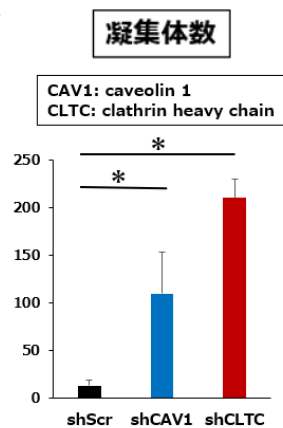
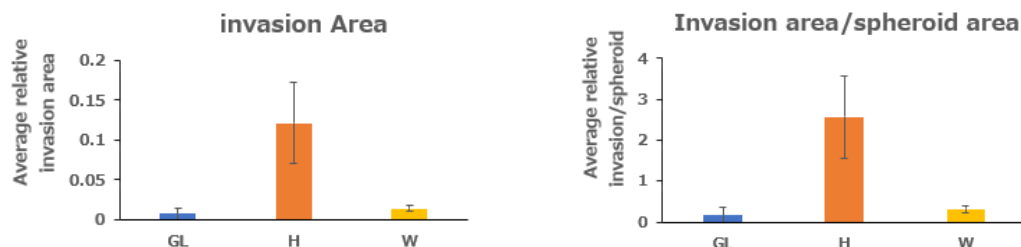


図 3



(2) spheroid invasion assay の結果では、CTC クラスター起源クローン (H) は親株 (GL) やその他クローン (W) と比較して spheroid 形成能は変わらない一方で、浸潤能を高く認めていた (図 4)。CTC クラスター起源クローンは Collective migration を起こしている可能性がある。

図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Liu R, Shinriki S, Maeshiro M, Hirayama M, Jono H, Yoshida R, Nakayama H, Matsui H.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 The Tumour Suppressor CYLD is Required for Clathrin-mediated Endocytosis of EGFR and Cetuximab-induced Apoptosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14010173	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 Yamana K, Inoue J, Yoshida R, Sakata J, Nakashima H, Arita H, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Takeshita H, Maeshiro M, Liu R, Matsuoka Y, Hirayama M, Kawahara K, Nagata M, Hirose A, Toya R, Murakami R, Kuwahara Y, Fukumoto M, Nakayama H.	4. 巻 10(14)
2. 論文標題 Extracellular vesicles derived from radioresistant oral squamous cell carcinoma cells contribute to the acquisition of radioresistance via the miR-503-3p-BAK axis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Extracell. Vesicles.	6. 最初と最後の頁 e12169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jev2.12169	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 Maeshiro M, Shinriki S, Liu R, Nakachi Y, Komohara Y, Fujiwara Y, Ohtsubo K, Yoshida R, Iwamoto K, Nakayama H, Matsui H	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Colonization of distant organs by tumor cells generating circulating homotypic clusters adaptive to fluid shear stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85743-z	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前城学、神力悟、劉隣、仲地ゆたか、菰原義弘、藤原章雄、大坪和明、吉田遼司、岩本和也、中山秀樹、松井啓隆
2. 発表標題 Colonization of distant organs by tumor cells generating circulating homotypic clusters adaptive to fluid shear stress.
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 前城学、神力悟、劉隣、仲地ゆたか、菰原義弘、藤原章雄、大坪和明、吉田遼司、岩本和也、中山秀樹、松井啓隆
2. 発表標題 循環ホモクラスター形成を伴う血中循環腫瘍細胞の遠隔臓器でのコロニー形成
3. 学会等名 第76回 日本口腔科学会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

悪性腫瘍の転移・再発機構の解明 https://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/Mol_Lab_Med/research.html
--

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