

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19472

研究課題名（和文）悪性中皮腫細胞におけるエントーシスの高度な誘導機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of accelerated induction of entosis in malignant mesothelioma cells

研究代表者

関戸 好孝（Sekido, Yoshitaka）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学分野・副所長兼分野長

研究者番号：00311712

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：エントーシスは中皮腫で高頻度に誘導される。エントーシスの動態観察が可能な蛍光発現中皮腫細胞株を樹立した。サブクローニングを行い、エントーシスにおいてOuter（外側）/Inner（内側）に9割以上の偏った頻度で役割を果たす1対の細胞株を選別した。RNA発現解析から、異所性発現によりエントーシスが誘導され、逆に発現抑制によりエントーシスが抑制される遺伝子を同定した。細胞株を非放射性同位体アミノ酸で標識しリン酸化プロテオーム解析を行ったところ、Outer/Innerそれぞれにおいて異なる反応が認められた。本研究によりエントーシス誘導に関わる新たな分子機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の相互封入の一形態であるエントーシスは、がん細胞で起きる。取り込まれた細胞は細胞死に至るばかりでなく、分裂、生存、さらには脱出といった様々な運命を辿る。極めて興味深い現象であるが、がんにおける意義やその機構の本態は全く明らかではない。本研究によりエントーシスの促進に関わる新たな遺伝子が同定され、その分子機構の一端が明らかとなった。今後、これらをさらに検討してエントーシスのがんにおける役割や診断、治療標的に関する展開が強く期待される。

研究成果の概要（英文）：Entosis is frequently induced in mesothelioma. We established fluorescent-expressing mesothelioma cell lines that enable us to observe the dynamics of entosis. By cell sub-cloning, we selected a pair of cell line that is biased to play a 90% or more biased role for the Outer or Inner cells in entosis. A gene whose ectopic expression induces entosis and whose repression suppresses entosis was identified. Phospho-proteomic analysis of the cell lines labeled with non-radioactive isotopic amino acids revealed distinct responses in the outer and inner cell lines. This study reveals a new molecular mechanism for the induction of entosis.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：悪性中皮腫 エントーシス 相互封入 細胞株 細胞接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、悪性中皮腫細胞株を多数樹立し、精力的にゲノム解析や分子標的薬の開発研究を行ってきた。抗がん剤や分子標的薬は培養条件によって感受性が違うため、通常の平面(2D)培養条件下だけではなく、3Dカルチャーによる薬剤感受性の検討を開始した。その過程で、多くの悪性中皮腫細胞株では細胞の“相互封入所見 Cell-in-Cell (CIC)”が極めて高頻度に認められることに気がついた。他の癌腫の中でも比較的高頻度と報告されている MDA-MB-231 株(乳がん細胞)でさえ ~5%の頻度であるが、Y-MESO-12 や Y-MESO-26 の中皮腫細胞株では 30% もの細胞が CIC を起していた。胸水細胞診で CIC や多核細胞などの所見が中皮腫の特徴的な所見として知られているものの、CIC の成因や病態生理学的な意義については全くわかっておらず、治療応用に対する視点も皆無であることに気がついた。

研究開始時までに、高速タイムラプス、超解像顕微鏡や電顕を用いた解析により、観察した CIC は“Entosis(エントーシス)”であることを明らかにした。驚くべきことに、エントーシスを起こした細胞はその後 24 時間以内に、58%もの Inner cell(取り込まれた細胞)が Escape(脱出)していた。すなわち、悪性中皮腫細胞ではエントーシスが稀な現象ではなく、非常にダイナミックに起きており、かつ、Inner cell の運命が極めて多彩であることを示している。これらの結果は、エントーシスが中皮腫細胞において極めて重要な現象であり、細胞の生存や悪性化に深く関与していることを強く示唆していた。特に時間単位でエントーシスが生じていることを考えると、細胞間接着、細胞間の何等かのコミュニケーション、そして細胞外栄養環境(糖、アミノ酸)からの刺激により、既存の蛋白・分子の modification(リン酸化等の修飾)が本現象をドライブすることを強く示唆するものと考え、本研究計画が立案された。

2. 研究の目的

細胞の相互封入所見 CIC は、複数の全く異なる細胞生物学的な現象から成る。CIC の中でエントーシスと呼ばれる現象は、カドヘリン等を介した細胞接着を契機に特にがん細胞(同種の細胞間)で生じる。Inner cell(取り込まれた細胞)は細胞死に至るばかりでなく、驚くべきことに分裂や再び細胞外に Escape(脱出)するなど様々な運命を辿る。エントーシスの意義は幾つかの仮説が提唱されているものの、がんの進展・悪性化における意義・本態は全く明らかではなく、極めて不思議な現象と考えられている(Fais et al, Nature Cancer Rev 2018)

研究代表者らは悪性中皮腫細胞が他の癌腫に比べ、エントーシスを極めて起し易いことを発見した。悪性中皮腫細胞は胸水・腹水中においても増殖し、エントーシスの高度の誘導性が、細胞の生存・増殖に有利に働く可能性が考えられる。本研究は「極めて高度に見られる悪性中皮腫細胞のエントーシスの誘導機構を明らかにし、新たな治療戦略に応用が可能か否かの知見を得る」ことを目的とする。

3. 研究の方法

エントーシス形成時の Outer /Inner cell 細胞の解析: エントーシスの外側、内側の細胞内蛋白の活性化状態を外側・内側を識別して網羅的に解析する。

(1) 細胞株のクローニング

レンチウイルスを用いて Lifact-GFP あるいは Lifact-mRuby2 の蛍光タンパク質を恒常的に発現した Y-MESO-12 細胞からシングルクローンを単離して培養し、性質の異なる細胞株を複数樹立した。GFP, mRuby2 の蛍光を発する細胞株を 1 種類ずつ混ぜ合わせて超低接着プレート上で浮遊培養し、エントーシス誘導後の細胞を固定して CIC の Outer/Inner 形成頻度を解析した。通常、各細胞は CIC 形成時の Inner:Outer 形成比は 1:1 となるが、Inner もしくは Outer 形成確率が 9 割を超える偏りを示す細胞株の組み合わせを見出し、それぞれの細胞を CIC-In, CIC-Out 細胞株とした。

(2) RNA-seq 解析

CIC-In, CIC-Out 細胞をトリプシンではがし、超低接着プレート上で 1 時間浮遊培養して細胞

を回収した。この細胞から total RNA を回収して QIAseq FastSelect -rRNA HMR Kit (QIAGEN, # 334386) を用いてリボソームを除去した後、QIAseq Stranded Total RNA Lib Kit (QIAGEN, # 180743) を用いて RNA-seq サンプルを作製した。これらの実験を独立して3回行い、RNA シーケンスを行った。得られたデータは QIAGEN RNA-seq analysis portal にアップロードし、発現量差異解析を行った。

(3) リン酸化プロテオーム解析

細胞を非放射性同位体で標識するため、CIC-Out 細胞を L-アルギニン-13C6, 15N4、L-ロイシン-13C6 を含む RPMI 培地中で培養し、CIC-In 細胞は非放射性同位体を含まない培地で培養した。1 週間培養後の細胞を回収してタンパク質を抽出し、質量分析装置で総タンパク質中における非放射性同位体の取り込み率を測定した。さらに 1 週間培養した細胞を超低接着プレート上で 1 時間培養した後、さらに 0, 3, 6 時間浮遊培養した細胞を回収した。これらの細胞からタンパク質を抽出し、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によりリン酸化ペプチドを濃縮した後、質量分析装置にて定量解析を行った。

4. 研究成果

細胞内形態の変化を経時的に解析するため、蛍光蛋白質と融合したチューブリンやヒストンを安定発現させた。同時に、一過性の蛍光ラベル賦与試薬である CytoTracker や NucSpot, Tubulin Tracker 等を検討した。それぞれの条件においてエントーシス誘導効率の測定や細胞形態の経時的観察を行い、解析に最も適したアッセイ条件を決定した。

当初の予定として、細胞膜貫通ドメインを挟んで N 末端側 (細胞外領域) に FLAG, C 末端側 (細胞質領域) に GFP を有するタンパク質を発現させ、エントーシス誘導後の CIC 形成細胞の濃縮、Outer/Inner cell の区別を計画していた。しかし、発現プラスミドを細胞に導入して細胞内局在を免疫染色により検出したところ、FLAG と GFP のシグナルが共局在しないことが明らかとなった。複数の中皮腫細胞株で類似の結果が得られ、発現タンパク質の分解もしくは細胞内領域のシェディングが想定されたため、新たに CIC を形成する 2 細胞それぞれの細胞内シグナルを解析可能な実験系を検討することとした。

Y-MESO-12 細胞株にさまざまな蛍光タンパク質を発現させてアッセイ条件を検討している際に、CIC の形成効率が変動することに気づいた。そこで、異なる蛍光タンパク質を有する Y-MESO-12 細胞を用いてエントーシスを誘導した際に、片方の細胞が Inner、もう片方が Outer に極端に偏る組み合わせが構築できないか検討した。LifeAct-GFP もしくは LifeAct-mRuby2 を発現する Y-MESO-12 細胞のクローニングを行い、CIC の形成頻度の高い各 4-6 種類の樹立細胞株を組み合わせでエントーシスを誘導した。その結果、高い確率で CIC が形成され、また、CIC 形成時において Inner もしくは Outer への偏りが 9 割以上となる細胞株のペアを発見した (図 1)。Inner, Outer の形成効率が高い細胞株をそれぞれ CIC-In, CIC-Out 細胞とし、これらの細胞についてさらに解析を進めた。

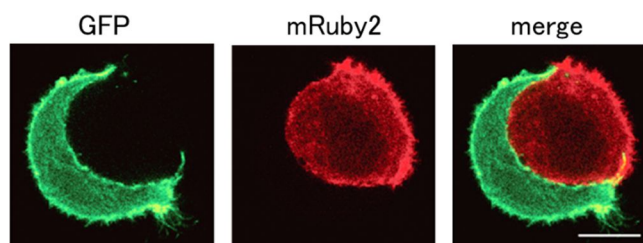


図1. 中皮腫細胞のエントーシス
Y-MESO-12株に Lifeact-GFP(緑) あるいは Lifeact-mRuby2 (赤) を導入して安定発現させた。マイクロチャンバーで混合培養し観察した。

CIC 形成時の Inner/Outer がどのようにして決定するのかを解析するため、CIC-In, CIC-Out 細胞における遺伝子発現量を RNA シーケンスにより解析した (図 2A)。発現量が大きく異なる遺伝子は 967 個、そのうち CIC-In で高発現した遺伝子が 616 個、CIC-Out で高発現した遺伝子が 351 個同定された。CIC-Out 細胞と比較して CIC-In 細胞で強く発現している遺伝子として Fibronectin 1 (FN1) を同定した。Y-MESO-12 細胞を用いて FN1 をノックダウンしたところ、エ

ントーシス誘導時の CIC 形成が有意に抑制された(図 2B)ことから、FN1 が CIC 形成時における細胞内侵入に関与している可能性が示唆された。次に CIC-In, CIC-Out 間の遺伝子発現差異を制御する因子を同定するため、上流シグナルのパスウェイ解析 (IPA)を実施した。その結果、インターロイキン 1 シグナル経路の関与が示唆された(図 2C)。このシグナルは中皮腫において TAZ によって活性化されることが知られている(Matsushita et al, Oncogene, 2019)。TAZ 活性化の原因となる Hippo 経路の破綻は中皮腫患者の予後不良と関連する可能性が指摘されており、高頻度の CIC 形成ががんの悪性化と相関するという報告と一致した。

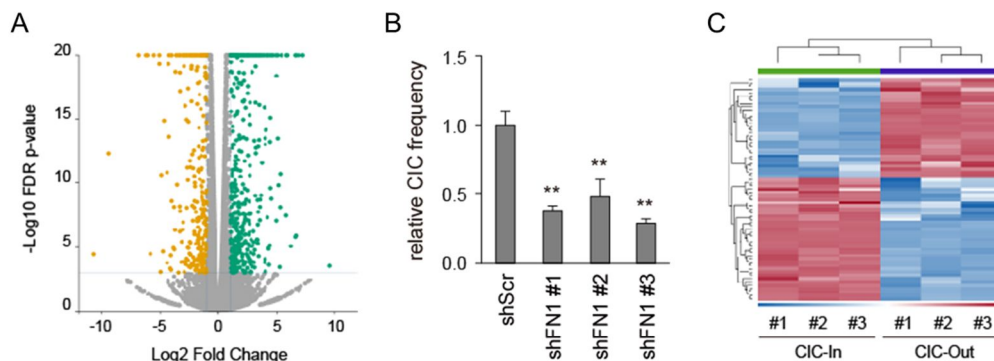


図 2. CIC-In/Out細胞の遺伝子発現量差異解析

(A) CIC-Out発現遺伝子に対するCIC-In発現遺伝子の発現量をボルケーノプロットに示した。CIC-Inで有意に高発現する616遺伝子を緑色で、CIC-Outで有意に高発現する351遺伝子を黄色で示した。(B) Y-MESO-12細胞にレンチウイルスを感染させてFN1のノックダウン (shFN1 #1-3)を行った。コントロールとしてスクランブル配列 (shScr)を発現させた。これらの細胞を浮遊培養してエントーシスを誘導し、6時間後のCIC形成を比較した。(C) 発現量に差のあった計967遺伝子のパスウェイ解析を行い、上流因子として示唆されたIL1Bシグナル関連遺伝子をヒートマップに示した。赤は発現量が増大している遺伝子、青は減少している遺伝子を示す。

次に CIC-In, CIC-Out の各細胞内反応の違いを検出するため、CIC-In 細胞内タンパク質を非放射性同位体で標識してエントーシスを誘導し、CIC 形成 0-6 時間後の各細胞を回収してリン酸化プロテオーム解析を行った。各サンプルについて 4,400 以上のリン酸化ペプチド(部位)を含む 1,600 以上のタンパク質を同定することができた。CIC 形成により変化するリン酸化タンパク質の特徴を把握するため、得られたデータを用いて主成分分析を行った(図 3)。その結果、C-In, CIC-Out 間では主に第一主成分に大きな違いが観察された。また、CIC-In では CIC-Out と比較してエントーシス誘導前後 (0h vs 3h or 6h) において第二主成分に大きな変動が見られ、各細胞において活性化するシグナル伝達経路の相違が示唆された。

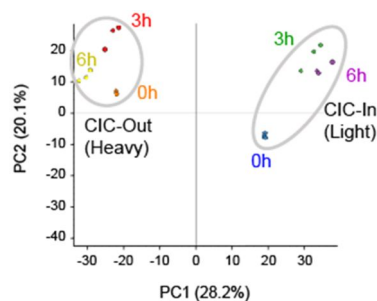


図 3. エントーシス誘導時におけるCIC-In/Out細胞のリン酸化プロテオーム解析

細胞を超低接着プレートで培養してエントーシスを誘導した後の細胞を用いてリン酸化プロテオーム解析を行った結果について主成分分析を行った。

本研究により、CICの Inner/Outer 細胞をそれぞれ解析するのに有用な細胞株を樹立することができた。また、これらの細胞を解析することで、エントーシスに関わる遺伝子とタンパク質リン酸化量の変化について重要な知見を得ることができた。エントーシスはがんの悪性化や予後不良に関わる重要な細胞イベントであるが、これまでの免疫組織染色等による観察では得られる情報に限界があった。本研究で得られた細胞株やデータは、エントーシス解析を促進し、がんの悪性化や新規治療につながる重要な知見を提供すると期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sekido Yoshitaka, Sato Tatsuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 NF2 alteration in mesothelioma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1161995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/ftox.2023.1161995	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 Sato Tatsuhiko, Akao Ken, Sato Ayuko, Tsujimura Tohru, Mukai Satomi, Sekido Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Aberrant expression of NPPB through YAP1 and TAZ activation in mesothelioma with Hippo pathway gene alterations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 13586 ~ 13598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.6056	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 関戸好孝
2. 発表標題 NF2 mutation in mesothelioma
3. 学会等名 世界肺癌学会 2022/WCLC（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤龍洋、関戸好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるNPPB高発現の分子機序の検討
3. 学会等名 第3回日本石綿・中皮腫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井智美、佐藤龍洋、三城恵美、青木正博、藪田紀一、関戸好孝
2. 発表標題 Hippo経路の破綻した悪性中皮腫における O-GlcNAc 修飾の亢進 を標的とした治療の可能性
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 赤尾 謙、佐藤龍洋、向井智美、平野雅規、関戸好孝
2. 発表標題 新規 TEAD 阻害剤の悪性中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討
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 田中一大、佐藤龍洋、佐藤光夫、関戸好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるオキシトシン受容体を標的とした新規治療戦略
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 向井智美、佐藤龍洋、三城 恵美、藪田紀一、関戸好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるO-GlcNAc修飾異常を介した腫瘍進展メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤尾謙、佐藤龍洋、向井智美、平野雅規、関戸好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫に対する新規TEAD阻害剤の増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術総会
4. 発表年 2022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	佐藤 龍洋 (Sato Tatsuhiko) (70547893)	愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学分野・主任研究員 (83901)	

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