

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659276

研究課題名(和文) 癌細胞の形はなぜおかしいのか？ - 癌細胞の形態学的異型性の基盤となる分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism on the basis of morphological atypia in cancer cells

研究代表者

南雲 サチ子 (Nagumo, Sachiko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：80537069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の形態学的異型性のうち、構造異型については接着分子インテグリン、カドヘリンの発現の変化が構造異型に重要な役割を果たすことを明らかにした。細胞異型、特に核の異型に関しては、細胞異型の高度ながん細胞にH3K9me3、HP1 (ヘテロクロマチン関連タンパク)の発現亢進が見られた。また、in vitroでH3K9me3の発現を亢進させると細胞遊走能、細胞浸潤能が増加する結果が得られた。核膜タンパク質LINC complex分子については癌細胞の異型度の著明なものにはSUN1、SUN2、Nesprin2の発現低下が見られた。

研究成果の概要(英文)：Morphological atypia is classified into structural and cellular atypia. We showed that structural atypia is intimately associated with the alteration of expression levels of adhesion molecules cadherins and integrins. As for cellular atypia, upregulation of H3K9me3 and HP1a is found in the cancer cells with high grade atypia. Interestingly cancer cells with increased expression of H2K9me3 reveal elevated migration and invasion activities in vitro. Regarding LINC (Linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton) complex molecules, expression levels of SUN1, SUN2 and Nesprin 2 are decreased in cancer cells with high grade atypia.

研究分野：病理学

キーワード：病理診断 異型性 インテグリン カドヘリン ヒストン修飾 LINC complex

1. 研究開始当初の背景

がんは病理診断により確定診断されており、病理診断の専門家(病理医、細胞検査士)は組織・細胞の形態学的な観察でがんを病理診断している。しかし、病理専門家による形態学的異型性の判断は科学的な裏付けなしに、主観的、経験的なものによっていると言っても過言ではない。近年、細胞接着分子の研究が進んで、細胞間ならびに細胞・細胞外基質間の相互作用が明らかにされてきた。癌の組織学的異型性のうち、構造異型は細胞相互間および細胞と細胞外基質の接着性の異常に基づくと考えられる。構造異型により「組織学的分化度」という言葉がしばしば用いられるが、細胞と隣接した細胞の接着性の乱れおよび細胞と基底膜との接着性の異常が組織学的分化度の低下に一致すると考えられる。一方、組織学的異型性のもう1つの柱である「細胞異型」は細胞そのものの異常、もっと言えば核の異常が最も大きな要素を占めている。核の形、大きさ、クロマチンの状態を見て、「細胞異型が著明である」と判断されている。近年、核およびクロマチン構造と機能の制御機構が飛躍的に進歩してきた。これらの新しい分子の制御機構に基づいて構造異型、細胞異型が形作られ、異型性を示す細胞には必ずそれを説明できる分子レベルの異常が存在することが想定され、それを明らかにすることができる時代になってきた。

2. 研究の目的

本研究は癌の細胞異型、構造異型を分子レベルで明らかにするものである。これまでの知見で接着分子、極性制御分子の解明の方が進んでいるので、まず構造異型をこれらの分子に焦点をあてて明らかにする。ついで、核・クロマチン制御分子に着目して、細胞異型を分子レベルで説明していく。

1) 癌の構造異型の分子レベルでの解明 学術的背景でも述べたように、癌の腺管形

成、乳頭状構造、充実性パターンなど、癌細胞の集団が形成する構造パターンは癌細胞相互間の接着性および癌細胞と細胞外基質・基底膜との接着性に規定され、これらが乱れると極性の喪失という状態になると考えられる。そこで、細胞間接着に重要な接着分子カドヘリンファミリー、細胞・細胞外基質の接着に重要な接着分子インテグリンファミリー、極性を制御する分子であるaPKC/PARシステム、細胞外基質の中で最も癌細胞と密接に相互作用している基底膜のラミニン分子などの発現レベルと癌の構造パターンとの関連性を分子生物学的、生化学的、形態学的な面から明らかにする。

2) 癌の細胞異型の分子レベルでの解明

組織診、細胞診で観察される細胞異型の大部分は核を観察して得られる情報である。最近明らかにされてきたクロマチン制御にかかわるヒストンおよびその修飾に関わるタンパク、DNA結合タンパク、またセントロメアクロマチン・キネトコアの形成と染色体分配に預かる分子、核ラミナ、転写因子などにより核のダイナミクスが制御され、その結果、核の形態が決定されることが考えられる。これらの分子の発現と細胞の異型性との関連性を分子生物学的、生化学的、形態学的な面から明らかにする。

3) 当該分野における本研究の学術的な特色 及び予想される結果と意義

本研究は分子生物学、生化学の分野でめざましい進歩をとげている接着分子、極性制御分子、核・クロマチン制御分子と形態学的な「形」との間をつなぐ研究である。これらの分子を扱っている研究者は日常の実験で細胞の形の異常を認識しているが、そのことを病理診断に用いられる「異型性」に結びつけた研究は見られず、本研究のユニークな着眼点と考えられる。「形」はアナログの世界であり、ある意味で主観的な判断ではあるが、大部分の病理医、細胞検査士は同じ一定の基

準で異型性の判断をして悪性の診断を行っている。必ずや形の基盤を作る分子機構が存在するはずであり、この分子機構の解明は形の異常という癌の本質的な所を明らかにしてくれると考えられる。構造異型、細胞異型は多様であり、それに預かる分子も多数存在することから、複数の分子が異型性の決定に関わると予想される。この解明は病理診断の客観化につながるのみならず、形態のとらえ方に一石を投じて、物の見方を変える可能性もある。また、これらの分子機構の破綻が癌の本質と関係するなら、その制御により癌の予防や治療につながる可能性も期待される。

3. 研究の方法

1) 培養癌細胞の構造パターンと接着分子との関連性の検討

大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌などの腺癌細胞株、子宮頸部癌、食道癌、口腔癌、肺癌などの扁平上皮癌細胞株およびそれぞれの正常細胞株を対象に構造パターンと接着分子インテグリン、カドヘリンの遺伝子レベルおよびタンパク質レベルでの発現との関連性を検討する。

2) ヒト癌組織における構造異型と接着分子との関連性について接着分子

大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌などの腺癌組織、子宮頸部癌、食道癌、口腔癌、肺癌などの扁平上皮癌組織およびそれぞれの正常組織における組織構造パターンと接着分子インテグリン、カドヘリンの遺伝子レベルおよびタンパク質レベルでの発現との関連性を検討する。免疫組織学的検索、電子顕微鏡、Laser capture microdissection を用いて、癌の組織の heterogeneity の部分についても十分な検討を行う。

3) 培養癌細胞の細胞異型性と核・クロマチン制御分子との関連性の検討

大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌などの腺癌細胞株、子宮頸部癌、食道癌、口腔癌、肺癌など

の扁平上皮癌細胞株およびそれぞれの正常細胞株を対象に通常の二次元培養における細胞の形態像と核・クロマチン制御分子の遺伝子レベルおよびタンパク質レベルでの発現との関連性を検討する。変化を示した分子の発現レベルを操作して形態の変化の観察も行う。

4) ヒト癌組織における癌細胞の異型性と核・クロマチン制御分子との関連性の検討

大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌などの腺癌組織・細胞、子宮頸部癌、食道癌、口腔癌、肺癌などの扁平上皮癌組織・細胞、およびそれぞれに正常組織・細胞における癌細胞の形態像と核・クロマチン制御分子の遺伝子レベルおよびタンパク質レベルでの発現との関連性を検討する。免疫組織学的検索、電子顕微鏡、Laser capture microdissection を用いて、癌の組織の heterogeneity の部分についても十分な検討を行う。

4. 研究成果

1) *in vitro* における種々の培養細胞株、および手術で切除された種々の癌組織を用いて、接着分子を中心に細胞形態との関連を中心に検討を行った。細胞外マトリックスとの細胞接着に重要なインテグリン各 subunit の発現を RT-PCR、フローサイトメトリー、免疫蛍光染色で検討したところ、各インテグリン subunit の発現は多様であり、腺癌・扁平上皮癌、あるいは癌細胞の分化度との一定の相関関係は見られなかった。全体を通じて発現レベルの高いものは 2、3、5、6、

1 subunit であった。低分化な接着性の悪い浮遊細胞でもインテグリンの発現が見られたことから、これらの細胞に対してはインテグリンからのシグナル伝達の検討が必要と考えられた。一方、細胞と細胞の間の接着に重要なカドヘリンを検討したところ、腺癌・扁平上皮癌の間に著明な差は見られなかったが、分化度が下がるにつれて、E-カドヘ

リンの発現の減弱および N-カドヘリンの発現増加の傾向が見られた。次に、ヒト癌組織を用いた同様の検討で、インテグリンの各 subunit の発現は細胞株同様に多様であり、分化度、組織型との一定の関連性は見られなかった。カドヘリンの検討では低分化癌細胞で E-カドヘリンの発現の減少傾向は細胞株と同様であるが、癌組織での発現レベルの方が全体的によく保持されていた。また、N-カドヘリンの発現は細胞株に比べて少なく、少数の癌細胞で陽性を認めるのみであった。以上の結果から、癌細胞の組織構築にはインテグリン自体が直接的に作用しているよりは、下流のシグナルが重要であること、カドヘリンは細胞間の接着を通じて、形態に影響を及ぼしていると考えられた。

2) 病理診断に重要な細胞異型、特に核の異型に着目して、癌細胞のクロマチン制御、ヒストン修飾、核膜タンパク質などの検討を中心に実施した。癌組織の均質性の観点からまず大腸癌、乳癌について免疫組織学的に検討した。ヒストン修飾、クロマチン制御に関わる分子として H3K9me3 (ヒストン 3 リジン 9 トリメチル化)、H3K27me3 (ヒストン 3 リジン 27 トリメチル化)、H3S10P (ヒストン 3 セリン 10 リン酸化)、HP1 (ヘテロクロマチン関連タンパク) を検討したところ、細胞異型の高度ながん細胞に H3K9me3、HP1 の高発現が見られた。H3K27me3 は異型度と関係せずに癌細胞全般に要請であり、H3S10P は M 期と考えられる癌細胞に特異的に発現が認められた。ついで、核膜タンパク質として LINC complex (Linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton) の中で laminA/C、Nesprin2、SUN1、SUN2 について主として乳癌組織に対して免疫組織学的な検討を行った。その結果、癌細胞の異型度の著明なものには Nesprin2 の発現低下が見られた。他の分子については有意な結果を得られなかった。上記の結果を踏まえて、H3K9me3 発現の亢進して

いる癌細胞は浸潤部に多く見られることから、H3K9me3 と癌の浸潤について in vitro で検討を行った。その結果、H3K9me3 を誘導する酵素 SUV39H1 (H3K9 methyltransferase) を癌細胞に遺伝子導入することで細胞遊走能、細胞浸潤能が増加する結果が得られた。

3) 以上の結果を踏まえて in vitro での細胞実験を行った。ヒト乳腺細胞株 MCF10A に対して SUN1 をノックダウンして細胞形態の変化をすると細胞診で重要な所見 pair cell 出現数の有意な増加が認められた。SUN1 ノックダウンによる接着能の変化を調べたところ、細胞外基質に対する接着能は SUN1 ノックダウンにより有意に増加し、接着分子 integrin 1 および活性型 integrin 1 の発現量の増加が見られた。SUN1 はインテグリンを介して、細胞形態に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1) Yokoyama Y, Hieda M, Nishioka Y, Matsumoto A, Higashi S, Kimura H, Yamamoto H, Mori M, Matsuura S, Matsuura N: Cancer associated up-regulation of H3K9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. Cancer Sci 104(7):889-95,2013.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南雲 サチ子 (NAGUMO, Sachiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・
特任教授
研究者番号：80537069

(2) 研究分担者

松浦 成昭 (MATSUURA, Nariaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・
特任教授
研究者番号：70190402

河口 直正 (KAWAGUCHI, Naomasa)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70224748

森 誠司 (MORI, Seiji)
大阪大学・大学院医学系研究科・
特任准教授
研究者番号：90467506

(3) 連携研究者 なし