

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290042

研究課題名(和文) 間質細胞による癌の牽引作用と排除のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of cancer guidance and elimination by stromal cells

研究代表者

田中 正光 (Tanaka, Masamitsu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20291396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：間質細胞による癌浸潤のガイド機能と、癌細胞による間質細胞の教育的分子を同定した。中皮細胞蛍光可視化マウスの作製等により、癌関連線維芽細胞(CAF)と腹膜中皮細胞(PMC)がリードする癌の浸潤モードを示した。CAFが分泌するAsporinは胃癌の浸潤を促す新規細胞外基質を形成し、Tks5活性化はPMCの浸潤に必須であった。またマクロファージのポドソーム形成と癌部への集積に必要な事を見出したSKAP2は肺転移の形成を大きく左右し、胃癌細胞の分泌するAgr2はCAFの浸潤活性化分子である。一方で、CAFは癌細胞の適度なアポトーシスを誘導する事で、CAF牽引型の癌浸潤を促進する一面を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified mechanisms that cancer associated fibroblasts (CAFs) and peritoneal mesothelial cells (PMCs) have high invasion property, and they lead cancer cell invasion. CAFs secrete Asporin, which creates a novel extracellular matrix that activate invasion by gastric cancers. Phosphorylation and activation of Tks5 was required for invasion by PMC. In addition, SKAP2 is essential for macrophages to infiltrate into tumors by forming podosomes, which regulates the size and incidence of lung metastasis. Gastric cancer cells secrete Agr2 that activates CAF invasion, and is an instructive molecule for stromal fibroblasts. On the other hand, CAFs also induce cancer cell apoptosis, which produces apoptotic vesicles that activate CAFs and establish CAF-leading mode of cancer invasion. The molecules and mechanisms identified here may become useful targets for the development of drugs aimed at manipulating cancer stromal cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 がん間質細胞 中皮細胞 CAF TAM 癌細胞死

1. 研究開始当初の背景

間質細胞の牽引による癌細胞の浸潤機構:

先行研究において様々な癌組織の浸潤先端部の病理標本を観察していると、癌組織の先進部には必ずしも癌細胞自身が存在するわけではなく、むしろ線維芽細胞などの間質細胞がフロントを形成している様子を多く認めた。間質細胞が癌細胞集団を先導しているパターンは *in vitro* の培養実験系でも観察された。そこで、癌細胞の浸潤を牽引する間質細胞の分子メカニズムをテーマに設定した。癌と間質細胞の接触による両者の協調した浸潤の分子機構を明らかにし、癌浸潤をリードする間質細胞をターゲットとした治療開発に繋げる事を考えた。

癌の間質への侵入を排除する機構:

先行研究で、癌の間質への浸潤をモニターするため、癌細胞と間質細胞間の接触に基づく移動変化をイメージングしてきた。その過程で、癌細胞と間質線維芽細胞の共培養中に、癌細胞死が有意に高頻度で誘導される事を観察した。そこで、免疫応答とは別に間質細胞が本来有する生体防御機構として、癌細胞死を誘導するメカニズムを第二のテーマに設定した。研究開始時においても、癌組織の線維芽細胞は癌の増殖や移動能などに促進的に作用する報告が集積しつつあり、癌細胞死を誘導する事が癌の進展全体においてどのような比重、意味を持つのかを検討課題とした。

2. 研究の目的

主要目的として以下の4つを掲げた。

(1) 癌組織に含まれる間質細胞として、癌関連線維芽細胞 (CAF)、腫瘍随伴マクロファージ (TAM)、腹膜中皮細胞 (PMC) を解析対象に設定し、其々の癌組織に対する浸潤促進作用に関わる分子経路を同定する。

(2) 上記間質細胞が癌細胞の浸潤において引き込み役として働く事や、間質の流動性を *in vitro* および *in vivo* で評価するシステムを構築する。

(3) 動く間質細胞として新規性の高い、腹膜中皮細胞の癌組織中での動態を明らかにする。

(4) CAF による癌細胞死の検証と、その腫瘍生物学的意義を明らかにする。

解析対象にした間質細胞の中で、腹膜中皮細胞は癌の腹膜播種において、癌細胞と接触を持ちその生着や浸潤に深くかかわる事が知られているが、その動態は未解明である。

中皮細胞は腹膜表面に留まるものではなく、中皮細胞や CAF が癌を牽引する分子機構を生体内で明らかにする事は、新しい癌の浸潤機構の捉え方となる。また、CAF が癌細胞死を誘導する一面を検証できれば、その賦活化により癌の新規治療に有用である。一方で、癌の進展に対して促進的な作用が多く報告されている CAF において癌細胞死の誘導活性はどう位置づけられるのか、総合的に判定する。

3. 研究の方法

細胞: 癌細胞は最も難治性の胃癌であるスキルス型胃癌細胞株を複数 (共同研究体制で国立がん研究センターと大阪市立大学から分与されている) 用いた。CAF はスキルス胃癌患者の外科手術サンプルから採集し樹立した細胞株を、同一検体の非癌部線維芽細胞 (NF) とセットで複数ペアを大阪市立大学から供与された。腹膜中皮細胞 (PMC) は、マウス腸間膜から採取したもの、および上記外科サンプルから採取したヒト PMC を供与されたものを用いた。マクロファージはマウス腹腔から採取し、サイトカイン刺激により活性化 (TAM 変換) を適宜加えたものを使用した。

(1) 癌組織の浸潤を促進する CAF, TAM, PMC の分子経路の同定:

上記胃由来 CAF と NF の発現差異解析 (マイクロアレイ解析)、癌組織のリン酸化蛋白質の精製と質量分析による同定から候補分子を選別し、解析に進めた。

(2) 間質細胞が牽引する癌浸潤のモニター:

In vitro: 三次元ゲル浸潤アッセイによるイメージング。胃癌細胞と間質細胞の浸潤に最適化したコラーゲン、マトリゲル混合のゲルを用い、血清濃度勾配に従ったゲル内浸潤の様子を共焦点顕微鏡で 3D 再構築して観察した。必要に応じゲルをスライスして観察する。

In vivo: 蛍光標識胃癌細胞と CAF の混合を免疫抑制マウス胃の粘膜下層に移植し、定期的に胃スライス切片を作成して胃壁内浸潤を共焦点顕微鏡下に観察した。マクロファージの腫瘍部への集積能を評価する実験では、肺癌細胞のマウス尾静脈注射による肺転移巣中に取り込まれているマクロファージを定量した。PMC の動態観察は、マウス腹腔内に移植した蛍光標識 PMC の追跡と、PMC 蛍光可視化トランスジェニックマウス (次項 3) への癌細胞移植によりイメージングを行った。

(3) PMC の動態観察: Lineage tracing

赤色蛍光 tdTomato の ROSA レポーターマウスと中皮細胞に発現特異性の高い WT1 遺伝子プロモーター制御下の Cre マウスを交配し、さ

らにヒト胃癌細胞の移植実験のためヌードマウスとの交配を進め、Wt1^{CreERT2}-tdTomato^{nu/nu} (Wt1^{Cre}-tdT^{nu}と略)を作成した。タモキシフェン誘導下に中皮細胞が赤色蛍光で可視化される。

(4) CAF による癌細胞死誘導 :

癌細胞のアポトーシスを核の形態変化からライブで判定するため、ヒストン H2B-EGFP 融合遺伝子を安定発現した胃癌細胞を作成した。CAF との共培養、(2)のゲルアッセイで癌細胞のアポトーシスを経時的に判定した。

4 . 研究成果

(1) 癌組織の浸潤を促進する CAF, TAM, PMC の分子経路の同定 :

CAF: 癌関連線維芽細胞

スキルス胃癌患者組織から採取された CAF と NF のマイクロアレイ解析から、CAF 特異的分子である Asporin を同定した。低分子量プロテオグリカンである Asporin はスキルス胃癌の細胞外基質の新規な主要成分である事が分かった。CAF から分泌された Asporin は CD44 との結合に基づくシグナル経路に依存して線維芽細胞、癌細胞双方の Rac 経路を活性化しているメカニズムを明らかにし、この事は間質を含めた癌組織の流動性を高める事により、スキルス胃癌の局所浸潤の原因として重要だと考えられる。また癌細胞は Asporin の濃度勾配に走化性を示す事から CAF リード型の癌細胞浸潤の責任分子としても可能性が高く、治療標的分子となり得る。

(*Oncogene* 2015;29 発表)

PMC: 腹膜中皮細胞

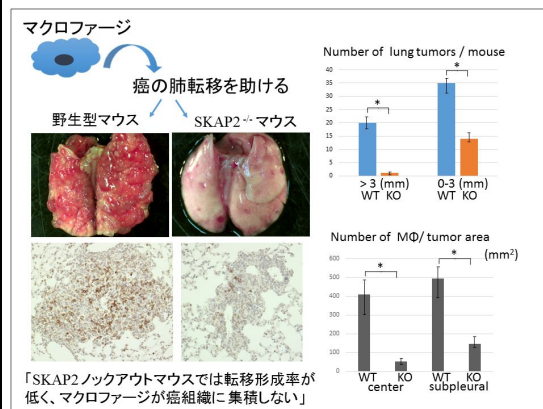
スキルス胃癌の腹膜播種に際して腹膜中皮細胞 (PMC) は癌細胞に先行して組織内に侵入している事をヒト胃癌播種症例で確認した。蛍光ラベルした癌細胞と外来 PMC のマウス腹腔内移植実験から、腹壁内で PMC が癌細胞を牽引する画像が取得でき、その機序として PMC における Tks5 の発現上昇とリン酸化による活性化が、PMC 自身の浸潤性の獲得と、それによる癌細胞の浸潤ガイドに必要であることを明らかにした。Tks5 は細胞の浸潤突起 (invadopodia) の形成に重要な分子である。この事はスキルス胃癌の腹膜播種先進部が PMC の Tks5 活性依存性に形成される事を示唆する。 (*Oncogene* 2015;34 発表)

TAM: 腫瘍随伴マクロファージ

マクロファージは腫瘍部に集積し、腫瘍内部に侵入する事で癌細胞に対して増殖促進作

用などの補助的な機能を示す。このマクロファージの腫瘍部への集積に不可欠な分子として SKAP2 を同定した。SKAP2 のノックアウトマウスを用いた解析から、同分子はマクロファージの浸潤突起 (podosome) の形成に必須であることを明らかにした。その機序として SKAP2 はポドソームリングに局在しており、また WASP との分子間結合により、WASP のポドソームへの集積に必要である事が分かった。SKAP2 欠損マウスのマクロファージはこの機能の欠如により、ポドソーム形成が著しく不良で浸潤能が低下している結果、癌の転移巣などの腫瘍組織への集積が見られない。そのため、SKAP2 欠損マウスに尾静脈投与で作成した肺転移腫瘍は、対照群マウスのそれに比較して増殖能が低下しており、転移結節のサイズ、数が顕著に抑制されていた。SKAP2 は TAM を対象とした転移抑制目的の治療標的分子となり得るという結論を得た。

(下図 : *Cancer Res* 2016;176 発表)



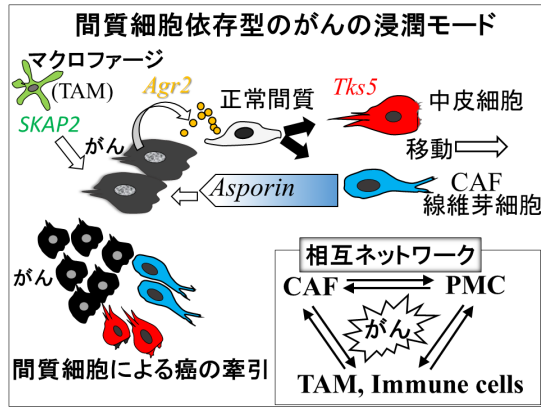
癌細胞による間質細胞の教育分子 :

間質細胞が浸潤性を獲得し、癌細胞の牽引役を果たすようになるには、元来正常であったこれらの間質細胞を癌細胞が教育している事が想定される。その教育的分子の候補として、スキルス胃癌に随伴して高頻度に観察される胃印環細胞癌が産生する Agr2 について解析した。

Agr2 は主に小胞体に局在し、小胞体ストレス応答に関わる蛋白質であるが、いくつかの癌では患者血清中や尿中にも検出され、細胞外にも分泌されている。この Agr2 が印環細胞癌から分泌され周辺の線維芽細胞に取り込まれ、同線維芽細胞を活性化して高い浸潤能を付与している事を明らかにした。SKAP2 は線維芽細胞を CAF 化する教育的分子に相当する事が示唆され、癌間質細胞を鎮静化するための治療標的分子となる事を示した。

(*Cancer Res* 2015;75 発表)

下図：上記(1)の内容を示した模式図



(2) 癌・間質細胞の協調的浸潤をモニターする評価系の作成：

上記(1)の浸潤評価で用いた三次元ゲル浸潤アッセイは、これらの間質細胞と胃癌細胞の協調的な浸潤を観察するのに最適化した細胞外基質成分の混合ゲルを使用し、血清濃度勾配をゲル内に形成するためにトランスウエルを応用した独自の方法である。

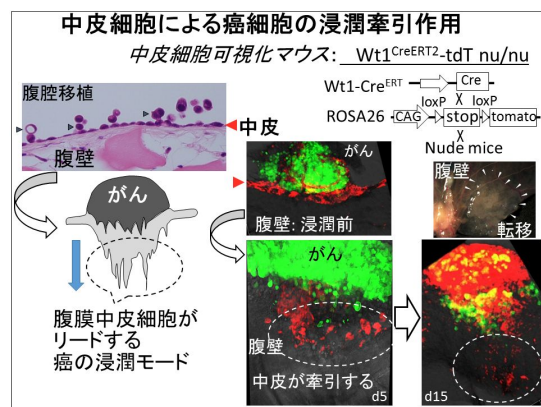
(Bio-Protocol 2016;6に発表)

また、これによる観察から下記(4)に繋がる知見を得た。

(3) PMCの動態観察：Lineage tracing

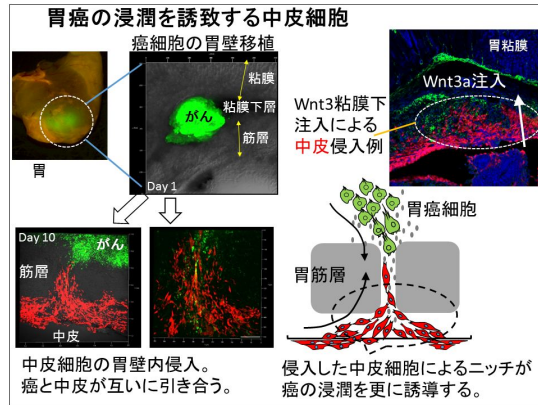
中皮細胞牽引型の癌細胞浸潤の上記結果をさらに検証するため、内在性の腹膜中皮細胞を生体内で可視化したヌードマウス (Wt1^{Cre}-tdT^{nu}) を作成した。

まずヒトスキルス胃癌細胞を同マウス腹腔に移植すると、腹壁転移部で移植後5日目にはPMCが先行して腹壁に浸潤を開始し、癌細胞は腹膜表面にほとんど留まっている状態が見られる。その後、PMCの浸潤範囲は常に癌細胞の浸潤領域より広範囲であり、Lineage tracingの手法により中皮細胞先導型の癌細胞浸潤様式を確認した(下図)。



また、胃癌細胞の Wt1^{Cre}-tdT^{nu} 胃壁内移植において、漿膜中皮細胞が胃壁内に侵入し癌

細胞の深部浸潤を誘致する作用を見出した。癌細胞・CAFと中皮細胞は互いに胃壁内で引き合い、胃の外表から胃壁内に侵入した中皮細胞は癌・線維芽細胞を引き寄せる事で癌の深部浸潤を促進する。PMCが癌の進展を促進する新たな作用として、担癌胃壁内部に侵入して癌の深部浸潤を誘致するニッチを形成する事を明らかにした。(下図、論文投稿中)



PMCが臓器内に侵入し、組織形成に参加する事は発生学分野では確認されていたが、生体内癌組織では初めて明らかにした。これらの結果は、胃癌などで早期癌から進行癌、播種へと加速する新たな進行様式を示唆し、PMCが間質細胞ネットワークのキーステーションとして治療標的対象になる事を示す。

(4) CAFによる癌細胞死誘導とその意義：

胃癌細胞とCAFによる浸潤を(2)で作成したゲル浸潤アッセイで観察している過程で、癌細胞死がCAF存在下で増加する知見を得た。使用したCAFは胃癌細胞の増殖を促進するサイトカイン(IL6など)を産生する一方で、癌細胞との接触によりデス受容体、Caspase-8経路依存性に癌細胞にアポトーシスを約20-30%の頻度に誘導した。

ヒストン H2B-EGFP 融合遺伝子を安定発現した胃癌細胞株の作製により、クロマチン形態からアポトーシスを経時的に観察する手法で、癌・CAFの浸潤様式と癌細胞死の関連性について検討した。

その結果、CAF依存性の癌細胞死を完全に阻害すると、癌細胞の増殖は顕著に増加し、それに基づく癌細胞の圧排性浸潤モードが増加した。その一方で(1)で解析したCAFリード型の癌細胞浸潤モードはほとんど見られなくなり、CAFによる癌細胞死は癌・CAFの協調した浸潤様式を調節している事が示唆された。CAF牽引型の癌浸潤モードは、癌細胞の自律的増殖による圧排性浸潤モードと比較して短時間に遠隔地に癌細胞を送り込む特性があるため、適度な癌細胞死の誘導は

CAF 牽引型浸潤モードの形成に必要で、むしろ癌組織の進展に有利に作用し得ると考えられた。癌組織は置かれた微小環境に応じて両者の浸潤モードを使い分け、進展している可能性がある(論文投稿中)。

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 9 件)

- 1 Tanaka M., Kuriyama S., Itoh G., Kohyama A, Iwabuchi Y, Shibata H, Yashiro M, Aiba N. (2016) Identification of anti-cancer chemical compounds using *Xenopus* embryos. *Cancer Science* 10.1111/cas.12940 査読有
- 2 Tanaka M. (2016) 3D Gel Invasion Assay of Gastric Cancer cells with Fibroblasts. *Bio-Protocol* 6 (9) <http://bio-protocol.org/e1798> 査読有
- 3 Tanaka M., Shimamura S, Kuriyama S., Maeda D, Goto A and Aiba N. (2016) SKAP2 promotes podosome formation to facilitate tumor associated macrophage infiltration and metastatic progression. *Cancer Research* 176 (2), 358-369 10.1158/0008-5472.CAN-15-1879 査読有
- 4 Kuriyama S., Yoshida M., Yano S., Aiba N., Kohno T., Tanaka M. (2016) LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination. *Oncogene* 35 (8), 952-964 10.1038/Onc.2015.155 査読有
- 5 Sugiyama S., Yoshino Y., Kuriyama S., Inoue M, Komine K, Otsuka K, Kohyama A, Yamakoshi H, Ishioka C, Tanaka M., Iwabuchi Y, Shibata H. (2016) A curcumin analog, GO-Y078, effectively inhibits angiogenesis through actin disorganization. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 16 (5), 633-647 10.2174/1871520615666151013125559 査読有
- 6 Tsuji T., Satoyoshi R., Aiba N, Kubo T, Yanagihara K, Maeda D, Goto A, Ishikawa K, Yashiro M, Tanaka M. (2015) Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric signet-ring carcinoma cells. *Cancer Research* 75 (2), 356-366 10.1158/0008-5472.CAN-14-1693 査読有

- 7 Satoyoshi R., Aiba N., Yanagihara K., Yashiro M., Tanaka M. (2015) Tks5 activation in mesothelial cells creates invasion front of peritoneal carcinomatosis. *Oncogene* 34 3176-3187 10.1038/onc.2014.246 査読有
- 8 Satoyoshi R., Kuriyama S., Aiba N., Yashiro M., Tanaka M. (2015) Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer associated fibroblasts. *Oncogene* 29, 650-660 10.1038/onc.2013.584 査読有
- 9 Kuriyama S., Theveneau E., Benedetto A, Parsons M, Tanaka M., Charras G, Kabla A, Mayor R. (2014) In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity. *J Cell Biol* 206, 113-127 10.1083/jcb.201402093 査読有

[学会発表](計 17 件)

- 1 田中正光 第74回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場) 2015年10月8日-10月10日 SKAP2 is required for macrophages in cancer progression.
- 2 栗山 正 田中正光 第74回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場) 2015年10月8日-10月10日 LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination.
- 3 伊藤 剛 田中正光 第74回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場) 2015年10月8日-10月10日 Removal system of gastric cancer invasion by stromal cells.
- 4 黄 明国 小泉 淳 成田伸太郎 土屋順彦 田中正光 羽淵友則 第74回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場) 2015年10月8日-10月10日 The role of fatty acid binding protein 4 in prostate cancer progression.
- 5 田中正光 第104回日本病理学会総会(名古屋国際会議場) 2015年4月30日-5月2日 Coordinated invasion of macrophages and cancer cells.
- 6 田中正光 第38回日本分子生物学会年会(神戸ポートアイランド) 2015年12月1日-12月4日 アフリカツメガエル初期胚を利用した癌細胞の集団浸潤を抑制する化合物のス

クリーニング

7 田中正光 第73回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2014年9月25日-9月27日
Paracrine effect of Agr2 on stromal fibroblasts promotes tumor invasion of gastric signet-ring cell carcinoma

8 栗山 正 田中正光 第73回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2014年9月25日-9月27日
LPP inhibits collective cell migration during lung cancer metastasis

9 島村真太郎 田中正光 第73回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜) 2014年9月25日-9月27日
SKAP2 suppresses breast cancer progression

10 田中正光 第37回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜) 2014年11月25日-11月27日
Paracrine effect of Agr2 on stromal fibroblasts promotes tumor invasion of gastric signet-ring cell carcinoma

11 Tanaka M. The 4th JCA-AACR special joint conference (Dec 16- Dec 18, 2013)
Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer associated fibroblasts.
Tokyo Bay Maihama Hotel

12 田中正光 第72回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2013年10月3日-10月5日
Coordinated invasion of scirrhous gastric carcinoma with mesothelial cells

13 里吉梨香 田中正光 第72回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2013年10月3日-10月5日
Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer associated fibroblasts.

14 島村真太郎 田中正光 第72回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜) 2013年10月3日-10月5日
SKAP2-expressing macrophages lead the invasion of tumors.

15 栗山 正 田中正光 第72回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜) 2013年10月3日-10月5日
Lipoma Preferred Partner regulates N-cadherin shedding by MMP15 during lung adenocarcinoma metastasis.

16 杉山俊輔 田中正光 柴田浩行 第72回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜) 2013年10月3日-10月5日
Anti-angiogenic potential of newly synthesized curcumin analog.

17 田中正光 第102回日本病理学会総会 (ロイトン札幌) 2013年6月6日-6月8日
がんと間質細胞の協調した浸潤機構の解析

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=seika2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中正光 (TANAKA MASAMITSU)
秋田大学・医学部・教授
研究者番号：20291396

(3) 連携研究者

栗山 正 (KURIYAMA SEI)
秋田大学・医学部・准教授
研究者番号：30398226

伊藤 剛 (ITOH GO)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号：60607563