

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870947

研究課題名(和文)3次元接着環境下でのがん増殖メカニズムと細胞外分泌小胞によるその制御機構の解析

研究課題名(英文)Mechanism of tumor adaptation to the three-dimensional adhesion environment

研究代表者

長野 真(Nagano, Makoto)

東京理科大学・基礎工学部・研究員

研究者番号：50572715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん細胞が浸潤・転移の過程で置かれる3次元接着環境に適応し、増殖する機構の解明を目的とした。本研究で作製した3次元環境適応株は、親株と比較して、定常状態でのSTAT3リン酸化の亢進とこの下流で発現制御を受けるアポトーシス抑制因子Bcl-xの発現上昇、MMP-9やCathepsin Lなどのプロテアーゼの発現亢進とHAI-1/2などの数種類のプロテアーゼ阻害因子の発現抑制が認められた。従って、MKN7株の3次元足場環境への適応制御は、STAT3シグナルを介したアポトーシス抑制とプロテアーゼ分解による細胞外環境のリモデリングなどが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focus on the regulatory mechanism to adapt tumor cells to survive in the three-dimensional cell-extracellular matrix adhesion environment. First, I established the MKN7-derived cell, which has acquired growth activity in the 3D environment. To identify the key proteins in 3D growth of the cells, I compared the levels of the expression or the phosphorylation of the multiple proteins including signal-, oncology- or stress-related molecules, to the parental MKN7 cells. I elucidated that the phosphorylation of STAT3 is promoted and the down-stream target Bcl-x, which has a suppressive role in the apoptosis, is increased. Furthermore, several proteases such as MMP-9, Cathepsin L are increased, whereas some types of protease inhibitors including HAI-1/2, Maspin are decreased. These results suggest that the apoptosis suppression via STAT-3 signaling and the some types of protease activity are crucial for the tumor adaptation to the three-dimensional adhesion environment.

研究分野：がんの細胞生物学

キーワード：がん増殖 がん悪性化 細胞-ECM間接着

1. 研究開始当初の背景

生体内で発生するがん細胞は、80%以上が上皮細胞に由来し、基底膜上の2次元的な接着環境でがん化した細胞は、その一部が基底膜を分解して、間質組織内へと浸潤し、全方位をECMで囲まれた3次元接着環境下に置かれることとなる。このような接着環境の変化は、がん細胞の増殖性に対して抑制的に働く一方で、悪性化したがん細胞は、間質組織内でも高い増殖活性を示すことが知られている (Hanahan and Weinberg, 2000, Cell)。また、間質組織内への浸潤を伴うがん疾患では、抗がん剤治療の効果が著しく減弱することも知られている。このような、がんの間質内増殖は、正常組織を破壊して、がん患者の予後を著しく悪化させる要因であるが、その分子メカニズムは未だ十分には理解されておらず、これに対する有効な治療法も、未だに確立されていない。

2. 研究の目的

近年、細胞-ECM間接着の分子機構とその下流のシグナル伝達経路に関する知見が蓄積し、細胞を平面的な培養ディッシュに播種して行う2次元培養下と、I型コラーゲンゲル中に立体的に包埋して培養する3次元接着環境下では、異なる接着制御機構が存在し、両接着環境下では、細胞増殖や運動のメカニズムが異なっているということが認識されるようになってきた (Berrier and Yamada, 2007, J Cell Physiol, Fraley, et al., 2010, Nat Cell Biol)。そこで本研究では、I型コラーゲン中での3次元培養法を用いて、がん細胞の3次元環境適応を制御する分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本課題の先行研究において、高分化型胃がん由来 MKN7 細胞を3次元培養すると、初期段階では顕著に増殖が抑制され、多くの細胞がアポトーシス様の細胞死に至ることが観察されたが、一部の細胞は生き残り、3次元培養を繰り返すことで、同環境下でも高い増殖性を示す株が濃縮されることが見出された。そこでこれらの3次元適応株 (MKN7-3D 株) を単離した。本研究では、MKN7 株と MKN7-3D 株の性状を比較解析した。さらに、中分化型胃がん由来 MKN74 株および同低分化型 MKN45 株、さらにこれらから作製した3D適応株も適宜用いた。

解析内容は、(1) 2次元培養環境における形態と増殖性の比較、(2) 3次元培養環境における形態と増殖性の比較、(3) リン酸化レベルが異なるタンパク質の網羅的検索、(4) 発現レベルが異なるタンパク質の検索、(5) MKN7-3D 株が分泌する細胞外膜小胞による3D環境適応誘導性の検討を行った。

(1) および (2) では、光学顕微鏡による形態観察と MTT 誘導体である WST-8 の代謝活性を指標とした増殖性解析法を用いた。

(3) では、細胞抽出物からのリン酸化タンパク質の濃縮と定量的質量分析法を組み合わせたリン酸化タンパク質の同定法と、プロテインアレイ法によるリン酸化タンパク質の解析法を検討し、解析には後者を用いた。

(4) では、プロテインアレイ法によるタンパク質発現レベルの解析法を用いた。

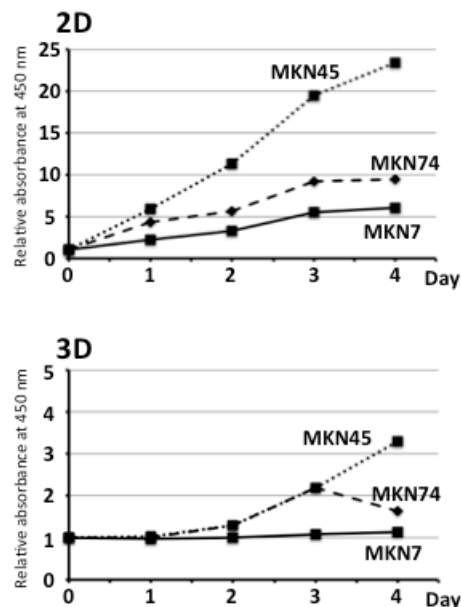
(5) では、MKN7-3D 株の培養上清からの分泌膜小胞の精製法を、遠心分離をベースに検討した。

4. 研究成果

1. MKN7 由来3次元適応株の作製

3次元環境適応を制御する分子群を同定するために、3次元環境での増殖性が低い細胞株を親株として、3次元環境での増殖性が高い細胞集団を作製して解析することとした。そこでまず、3種類の胃がん由来細胞株について、3次元培養条件下での増殖性を比較した。ここでは、高分化型 MKN7、中分化型 MKN74 および低分化型 MKN45 を用いた。これら3種類の細胞株を、それぞれI型コラーゲン中に包埋し、増殖性と形態を観察した (Fig. 1)。この結果、3種類の胃がん由来株の増殖性は、2次元 (2D) と3次元 (3D) のいずれの培養条件においても、悪性度に比例して高くなっていた。特に3次元では、MKN7 株の増殖性が顕著に抑制されていた。

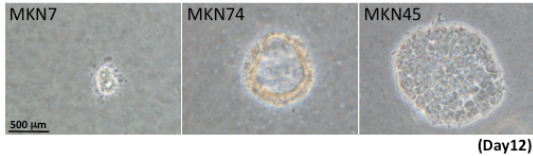
Fig.1. 胃がん由来株の3次元増殖性の比較検討



さらに、3次元環境下での細胞形態を解析した (Fig. 2)。MKN45 と MKN74 は培養開始12日経過時で、細胞塊を形成し、スフェロイド様の増殖形態が認められた (Fig. 2 中央および左側)。一方、MKN7 では顕著な細胞塊は認められなかったが、一部の細胞が増殖している様子が観察された (Fig. 2 左側)。

そこで、MKN7 株を親株として、3次元培養を繰り返し、増殖した細胞集団を3次元適応株 (MKN7-3D) として単離し、解析に用いた。

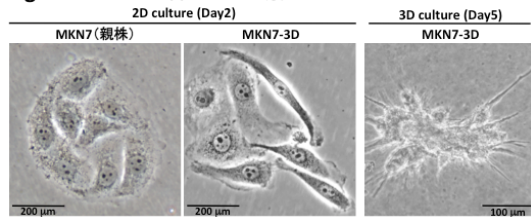
Fig.2. 胃がん由来細胞株の3次元環境での形態解析



2. MKN7-3D株の形態と増殖性の解析

1 で作製した MKN7-3D 株と親株の 2 次元培養環境と 3 次元培養環境における形態と増殖性を比較解析した。2 次元培養環境では、親株では細胞同士が接着した上皮形態が維持されているのに対し、3D 適応株では、細胞間の接着性の低下し、間葉系細胞に近い形態が観察された (Fig. 3 左側および中央)。一方 3 次元環境での MKN7-3D 株は、培養開始 5 日においてすでに、細胞塊の形成と突起状の細胞膜伸展が認められた (Fig. 3 右側)。

Fig.3. MKN7-3D株の形態解析



さらに両細胞の増殖性を、2 次元培養 (Fig. 4) と 3 次元培養 (Fig. 5) で比較解析した。この結果、MKN7-3D 株は、親株と比較して、3 次元環境だけではなく、2 次元環境での増殖性も亢進していることが明らかとなった。

Fig.4. MKN7-3D株の2次元増殖能解析

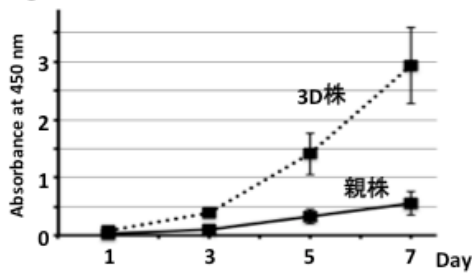
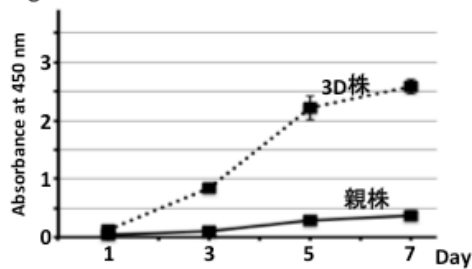


Fig.5. MKN7-3D株の3次元増殖能解析



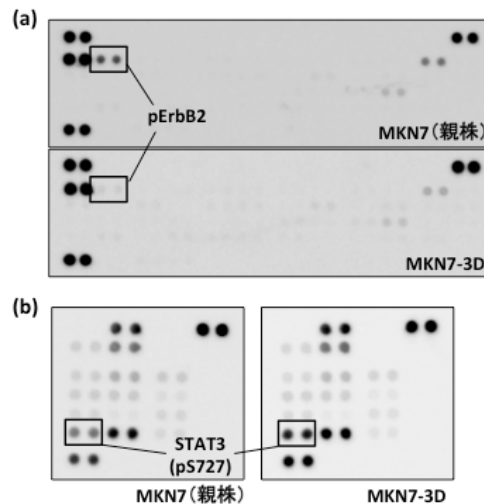
以上より、MKN7 株の 3 次元環境への適応は、上皮形態の消失と間葉系形質の獲得という、がん悪性化とよく似た機構によって誘導されている可能性が示唆された。

3. MKN7-3D 株でリン酸化レベルが変動しているタンパク質の検索

次に本研究では、3D 環境適応を制御する分子群を同定するために、リン酸化レベルが変動しているタンパク質の同定を試みた。手法として、最初に、SLIAC 法による培養細胞の安定同位体標識と Phos-tag アガロースによるリン酸化タンパク質の単離を組み合わせた手法の導入を試みた。しかし、Phos-tag アガロースによるリン酸化タンパク質の精製条件の検討において、親株と 3D 株からそれぞれ phos-tag アガロースを用いてリン酸化タンパク質をプルダウンし、両サンプル間でのリン酸化タンパク質の差を、SDS-PAGE と抗チロシンリン酸化タンパク質抗体を用いたウェスタンブロッティングで比較したが、両細胞間で顕著な違いを見出すことができなかった。

そこで網羅的検索から検索対象を限定して検索する方針に変更して、解析を進めた。この解析では、各種タンパク質の特異的抗体をスポットしたニトロセルロース膜に細胞ライセートを反応させて、発現レベルあるいはリン酸化レベルを検出する抗体アレイである、Proteome profiler™ (R&D 社) を用いた。本研究では、ヒト受容体型キナーゼ (49 種) に対するリン酸化認識抗体、ヒト MAP キナーゼ関連分子 (26 種) のリン酸化認識抗体およびその他キナーゼ関連分子 (43 種) のリン酸化認識抗体をそれぞれスポットした、3 種類の抗体アレイを用いた。細胞は、刺激等の処理はせず、定常状態で恒常的にリン酸化レベルが変動している分子を検索した。この結果、親株と比較して 3D 株では、EGF 受容体ファミリーの ErbB2 のリン酸化レベルの低下 (Fig. 6-a) と、Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 の 727 番目 Ser のリン酸化の亢進 (Fig. 7-b) が検出された。

Fig.6. タンパク質リン酸化レベルの比較解析



この他、Chk2、AMPKα2 および STAT2 のリン酸化亢進も検出された。さらに、STAT-3 の Ser727 のリン酸化は、MKN45 を 3D 環境で継

続培養して作製した MKN45-3D 株においても同様に亢進が認められた。

以上より、MKN7 の 3D 環境での生存・増殖に STAT-3 を介したシグナル伝達が関与する可能性が示唆された。一方、ErbB2 は多くのがん細胞でリン酸化が亢進していることが知られている。この解析では MKN7-3D 株での ErbB2 のリン酸化の低下が検出されたが、次項に示す結果のように、MKN7-3D 株では、ErbB2 の発現自体が低下していたことから、3D 環境への適応の過程で、ErbB2 シグナルから別のシグナル経路を介した増殖機構への変化が生じる可能性も考えられた。

4. MKN7-3D 株で発現レベルが変動しているタンパク質の検索

さらに本研究では、細胞ストレス関連因子 (26 種)、プロテアーゼ (35 種)、プロテアーゼ阻害因子 (32 種)、がん関連因子 (84 種) に対する特異的抗体をスポットした Proteome profiler™ (R&D 社) を用いて、MKN7-3D 株で発現レベルが亢進または低下しているタンパク質の同定を試みた。ここでもリン酸化タンパク質の検索時と同様に、定常状態で恒常的に発現が変動している分子の同定を目的とした。この結果、5 種類のプロテアーゼ (Fig. 7-a)、6 種類のプロテアーゼ阻害因子 (Fig. 7-b) および 5 種類のがん関連因子 (Fig. 7-c) の発現レベルが、親株と 3D 適応株間で異なっていることが明らかになった。

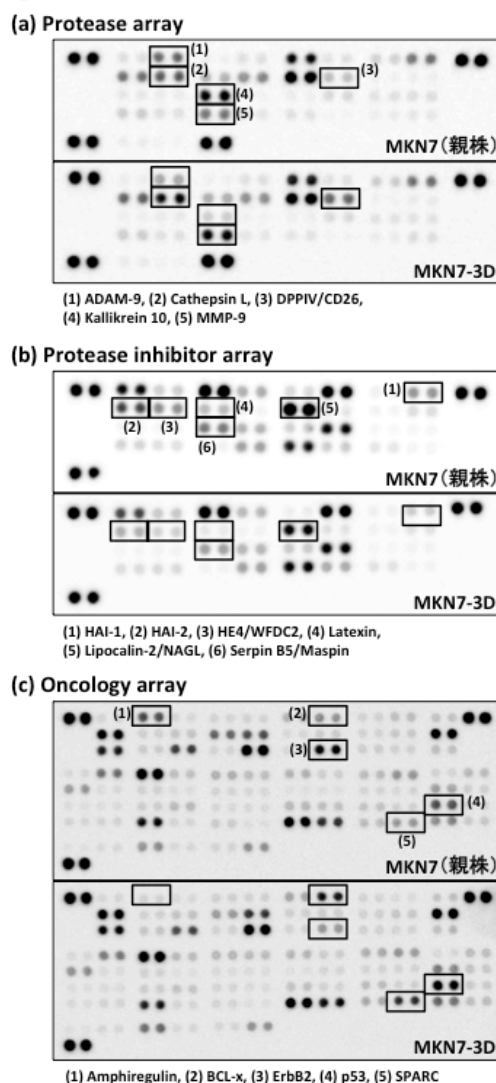
プロテアーゼ群では、Cathepsin L, DPPIV/CD26 および MMP-9 の発現亢進が検出された一方で、ADAM-9 と Kallikrein 10 の発現低下が認められた (Fig. 7-a)。MMP-9 は IV 型コラーゲンや ECM 成分、細胞膜分子のプロセッシングに参与する細胞外プロテアーゼであり、がん悪性化因子としてよく知られている。一方、Cathepsin L はリソソーム局在性プロテアーゼであるが、細胞外に分泌され ECM 成分の分解を介してがん浸潤・転移を亢進する。3D 環境では、I 型コラーゲンやがん細胞自身が分泌する ECM に周囲を囲まれており、増殖のスペースを確保するために、がん細胞は局所的な ECM 分解を活性化させると考えられ、MKN7-3D 株ではこれらの ECM 分解酵素を介して、3D 環境への適応能を獲得している可能性が示唆された。また、ADAM-9 や Kallikrein 10 は発現が低下していたことから、がん細胞の 3D 環境適応過程では、プロテアーゼ発現の取捨選択が生じることが示唆された。

プロテアーゼ阻害因子群では、6 種類のプロテアーゼ阻害因子の発現低下が認められた一方で、発現が亢進しているものは検出されていない。プロテアーゼの活性亢進はがん細胞の特性の 1 つであり、がん細胞の 3 次元環境適応においても、プロテアーゼ阻害因子の発現抑制によるプロテアーゼ活性の亢進が重要な役割を担うと考えられる。

その他のがん関連因子群では、アポトーシス抑制因子である BCL-x の発現亢進が認めら

れた。BCL-x の発現は、STAT-3 を介したシグナル経路の下流で制御されていることから、MKN7 の 3D 環境適応には、STAT-3 リン酸化を介した BCL-x の発現亢進によるアポトーシス抑制機構の獲得が重要な役割を果たすと考えられる。実際、MKN7 株は、3D 培養の初期段階で多くがアポトーシス様の細胞死をきたすことから、BCL-x を介したアポトーシス回避が、がん細胞の 3D 環境適応獲得に重要と考えられる。一方で、EGF ファミリーに分類される Amphiregulin (AR) と EGF 受容体ファミリーに属する ErbB2 の発現低下が認められた。AR は ErbB2 や他の EGFR に結合して増殖シグナルを on にする働きを持つ。MKN7-3D 株では、2D と 3D の両方の培養条件下での増殖性が著しく亢進していたにも関わらず、AR と ErbB2 の発現が抑制されていたことは、予想外の結果であった。今回のスクリーニングでは、他の受容体のリン酸化や発現の亢進は認められていないが、ErbB1 の発現とリン酸化は、親株と 3D 株で共に、高いレベルで維持されていた。従って、3D 環境への適応過程で、EGFR シグナルを介した増殖制御機構に変化が生じている可能性が考えられる。

Fig.7. タンパク質発現レベルの比較解析



以上のように本研究では、MKN7 の 3D 環境適応に重要な役割を担うと考えられるプロテアーゼとシグナル伝達経路の候補が同定された。さらに、プロテアーゼ阻害因子や AR/ErbB2 の発現低下など、がんの 3D 環境適応の過程で生じる変化の全体像の理解に有用な情報が得られた。今後はさらに、今回のスクリーニングで得られた候補分子について、がんの 3D 環境適応における役割を詳細に解析していくことが必要と考えられる。

5. MKN7-3D 株が分泌する膜小胞の精製法の検討と性状解析

本研究ではさらに、MKN7-3D および MKN45-3D、MKN74-3D の各株において、2D と 3D のいずれの培養条件下においても、細胞外分泌小胞が増加することを認めている。これらの膜小胞は、光学顕微鏡下で観察される、比較的大きな構造体であることから、エクソソームよりも大きく、シェディングベシクルに近いものと考えられた。

この分泌小胞のがん悪性化における役割と、性状解析を行うために、その精製・単離法の検討を行った。最初に、培養上清から、遠心分離による回収法を検討した。この結果、3000rpm という低速遠心によって、死細胞や培地由来の不溶性高分子などを除き、続いて、20000rpm という高速遠心で沈殿させることで、一定の純度で膜小胞を濃縮することができた。次にこれを MKN7 株に添加して培養し、経時的な細胞の変化を観察したが、顕著な違いは認められなかった。また、この膜小胞の存在下で、MKN7 株の 2D および 3D 増殖も解析したが、顕著な違いは認められなかった。従って、本研究の中では、MKN7-3D 株が分泌する膜小胞の役割を明らかにすることはできなかった。しかしながら本研究では、この分泌小胞によるがん細胞自身へのオートクライン作用を解析したのみであり、生体内でがん細胞の悪性化を支持するがん関連細胞への影響は不明である。今後はこの分泌小胞によるがん関連細胞へのシグナル伝達などへと解析を拡大する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 真 (NAGANO, Makoto)

東京理科大学基礎工学部・ポストドクトラル研究員

研究者番号：50572715