

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640068

研究課題名(和文) デスタッチによる癌の退縮誘導療法

研究課題名(英文) Analysis of Cancer cell death induced by "Death-touch"

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CAFは増殖刺激性のサイトカインを産生して癌細胞の増殖を促進するが、同時に直接的な接触を経て癌細胞のデス受容体を刺激し、アポトーシスを誘導する事を見出した(デスタッチ)。当初予想に反し、不十分な癌細胞死は逆に組織全体の浸潤モードを変換し、悪性を強める事につながった。逆説的であるが、CAF依存性癌細胞死はアポトーシス小胞を介したフィードバックによりCAFを活性化し、CAF F牽引型の癌浸潤モードを形成する事で、むしろ悪性の高い播種型の腫瘍を造る結論が得られた。これらの結果は、播種型癌の形成機序について新知見を与えると共に、治療後の腫瘍の再発や悪性転化の機序として示唆と喚起を含むものである。

研究成果の概要(英文)：We found that CAFs induce apoptosis in gastric cancer cells, which switches the invasion mode of tumors. Death receptor 4 and activation of caspase-8 in cancer cells mediated cancer cell apoptosis induced by CAFs, which was dependent on contact between cancer cells and CAFs. Apoptotic cancer cells in turn released apoptotic vesicles and stimulated invasion of CAFs. Accordingly, cancer cells followed the migrating CAFs. Treatment with a caspase inhibitor, ZVAD, or forced expression of a death domain (DD) fragment in cancer cells prevented cancer cell apoptosis induced by CAFs and increased expansive invasion by cancer cells in extracellular gel invasion assays, while the rate of cancer cell invasion led by CAFs was decreased. Because CAF-led invasion is characterized by the movement of individual cancer cells away from the tumor, adequate cancer cell apoptosis may promote cancer dissemination.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：スキルス胃癌 癌関連線維芽細胞 CAF アポトーシス

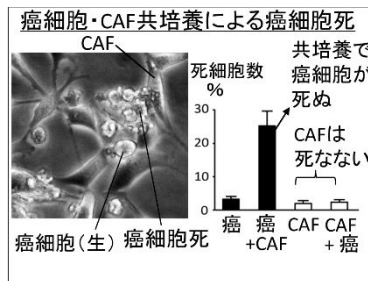
1. 研究開始当初の背景

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、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解析する事にした。

一方で、癌組織の線維芽細胞 (CAF) は癌細胞の浸潤牽引作用を持つ機構についてこれまで報告している。また他グループからも CAF が癌細胞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、新たに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

CAF による癌細胞死のメカニズムと、その腫瘍生物学的意義を明らかにする。

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腫瘍外科学講座との共同研究により使用した。

(1) 線維芽細胞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、NF との共培養、(2) のゲルアッセイにおいて、癌細胞の核の断片化、凝集化などをライブイメージで観察し、アポトーシスの頻度を定量化した。さらに他のアポトーシ

ス測定法を組み合わせるため、TUNEL 法および ELISA による細胞質中のヒストン・DNA 断片複合体検出キットを用いた。

(2) 癌・線維芽細胞の浸潤様式の判定：

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。方法の詳細は発表論文 6 (Bio-Protocol) に報告した。

In vivo: 上記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の様式を共焦点顕微鏡下に観察した。

(3) 細胞外小胞の精製：

胃癌細胞 (44As3) と CAF の共培養により産生される細胞外小胞は、標準的な超速心法により精製し、電子顕微鏡による小胞サイズの測定を行った。

(4) 癌細胞死を誘導する分子経路の同定：

デスリガンド・受容体とそのモジュレーターの発現は RT-PCR と抗体による Western blot で確認した。これらによる外因性アポトーシスの検証は、caspase-8 の活性測定、caspase-3 の断片化の検出、caspase-3 の阻害剤である ZVAD の添加により行った。DR4 を発現抑制したスキルス胃癌細胞を siRNA の導入により作成した。

4. 研究成果

(1) 癌・線維芽細胞の浸潤様式と癌細胞死をモニターする評価系の作成：

胃癌細胞と CAF または NF を混合した共培養、ゲル浸潤過程で癌細胞の細胞死をライブで検出するアッセイ法を最初に確立した。

ヒストン H2B-EGFP 融合遺伝子を安定発現した胃癌細胞は、核形態の経時的観察でアポトーシスを鋭敏に判定可能であった。また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手法である。(発表論文 6: *Bio-Protocol* 2016;6)

(2) CAF による癌細胞死誘導：

スキルス胃癌細胞 44As3 と CAF の直接共培養において、胃癌細胞の 20-30% にアポトーシスが誘導された。また NF との共培養でもほぼ同頻度の癌細胞死がみられ、胃線維芽細胞の

有する生体防御反応と捉えられた。他のスキルス胃癌細胞株、および他患者由来 CAF でも同様な癌細胞アポトーシスが再現された。一方で CAF は一般的に癌細胞の増殖を促進する機能が知られている。確かに CAF 培養上清に含まれるサイトカインは、用いた胃癌細胞(44As3)の STAT3 経路の活性化などにより癌細胞の増殖を促した。しかし、癌細胞と CAF の共培養においてアポトーシス阻害薬 ZVAD を添加すると癌細胞はさらに増加する。その差分に相当する約 25%の癌細胞が、CAF によるアポトーシスを示すものであった。細胞集団同士の Confrontation アッセイにおいて、この癌細胞死は CAF 領域との接触面において最も効率に観察され、一方 CAF の培養上清では誘導されないことから、癌細胞と CAF の直接接触依存性であると判断された。また CAF/癌細胞比が高いほど、癌細胞死が高率に観察された。

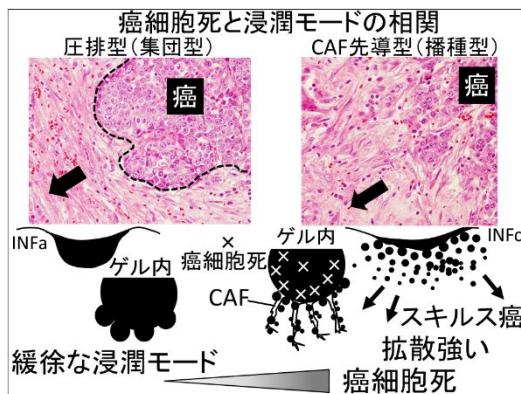
(3)CAF による癌細胞死と癌の浸潤モード：
CAF による癌細胞死は、腫瘍の進行にブレーキをかけていると予測して浸潤スピードを(1)で作成したゲルアッセイで検討した。このゲル浸潤アッセイでは、ほとんど癌細胞だけからなる結節による圧排性の浸潤様式と、CAF がリードする癌・間質細胞の協調的な浸潤様式が観察される。CAF 依存性の癌細胞死を ZVAD で完全に阻害すると、癌細胞の増殖は顕著に増加し、それに基づく癌細胞の圧排性浸潤モードが増加した。その一方で CAF リード型の癌細胞浸潤モードはほとんど見られなくなり、CAF による癌細胞死は癌・CAF の協調した浸潤様式を調節している事が示唆された。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に比較して短時間に遠隔地に癌細胞を送り込む播種型の浸潤特性がある。従って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判定された。

(4)癌細胞死による CAF リード型浸潤モードの形成機構：

CAF による癌細胞死が、CAF 自体の移動/浸潤を活性化し、CAF 牽引型の浸潤様式を形成する機構を検討した。アポトーシスに陥った細胞はアポトーシス小胞(Apoptosis vesicles: ApoV)を産生する事が知られているため、44As3/CAF 共培養から精製した ApoV (CAF の細胞死はほとんど生じないため、癌細胞由来 ApoV が主体)を CAF に添加すると、その浸潤が著明に活性化された。一方で CAF の増殖能については大きな効果を示さなかった。

(5)CAF による癌細胞アポトーシスの経路：
CAF との共培養で 44As3 胃癌細胞の caspase8 の活性が上昇した事からデス受容体を介したアポトーシス経路が示唆された。検討範囲では DR4 が胃癌細胞で発現が高く、同受容体のアダプターである FADD の高発現も確認された。胃癌細胞において DR4 のノックダウン、および DR4/FADD 結合を阻害するデスドメイン断片(DD)の発現により、CAF との共培養によるアポトーシスは抑制された。それに伴い癌組織の浸潤様式は、ゲルアッセイでは圧排性浸潤モードにシフトし、マウス胃壁への移植実験でも圧排性の局所限定型の腫瘍が主体となり、浸潤性の強い播種型の腫瘍は見られなくなった。

以上の結果を発表論文 1 に報告した。

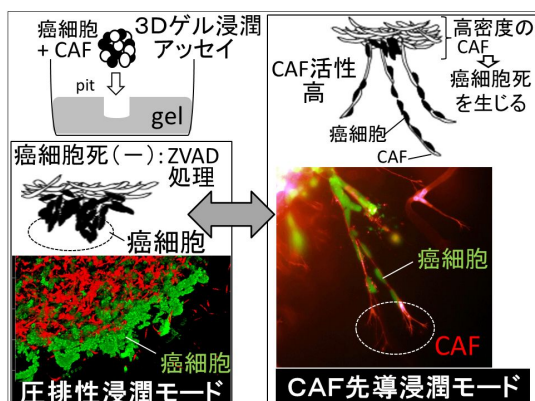


まとめと考察

CAF は増殖刺激性のサイトカインを産生して癌細胞の増殖を促進する(IL-STAT3 経路)が、同時に直接的な接触を経て癌細胞のデス受容体を刺激し、アポトーシスを誘導する(デスタッチ)。

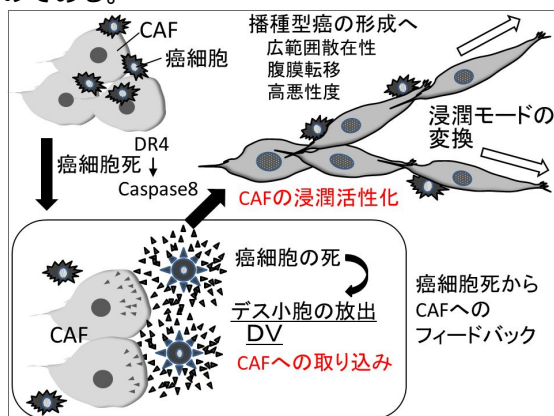
当初は単純に、癌細胞死を賦活する同経路の増強で腫瘍抑制可能と予想したが、不十分な癌細胞死は逆に組織全体の浸潤モードを変換し、悪性度を強める事につながった。

CAF/癌細胞数の比率を調整し検討すると、少



なくても 50%以上の癌細胞死がないと、腫瘍全体としての浸潤範囲を抑制できなかった。

逆説的であるが、CAF 依存性癌細胞死はアポトーシス小胞などのフィードバック作用により CAF を活性化し、CAF 牽引型の癌浸潤モードを形成する事で、むしろ悪性度の高い播種型の腫瘍を造る結論が得られた。これらの結果は、播種型癌の形成機序について新知見を与えると共に、治療後の腫瘍の再発や悪性転化の機序として示唆と喚起を含むものである。



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 11 件)

1. Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumors.

Itoh G., Chida S., Yanagihara K., Yashiro M., Aiba N., Tanaka M. *Oncogene* (doi; 10.1038/onc.2017.49), 2017 査読有

2. Mesothelial cells create a novel tissue niche that facilitates gastric cancer invasion.

Tanaka M., Kuriyama S., Itoh G., Maeda D., Goto A., Tamiya Y., Yanagihara K., Yashiro M., Aiba N. *Cancer Research* 77 (3), 684-695, 2017 査読有

3. Spatiotemporal expression of UPK3B and its promoter activity during embryogenesis and spermatogenesis. Kuriyama S., Tamiya Y, Tanaka M. *Histochem Cell Biol* 147 17-26, 2017 査読有

4. SKAP2 promotes podosome formation to facilitate tumor-associated macrophage infiltration and metastatic progression.

Tanaka M., Shimamura S., Kuriyama S. Maeda D., Goto A., Aiba N. *Cancer Research* 76 (2), 358-369, 2016 査読有

5. LPP inhibits collective cell migration

during lung cancer dissemination. Kuriyama S., Yoshida M., Yano S., Aiba N., Kohno T., Minamiya Y., Goto A., Tanaka M *Oncogene* 35, 952-64, 2016 査読有

6. 3D gel invasion assay with Fibroblasts. Tanaka M *Bio-protocol* 6 (9), 2016 <http://bio-protocol.org/e1798>, 査読有

7. Identification of anti-cancer chemical compounds using Xenopus embryos.

Tanaka M., Kuriyama S., Itoh G., Kohyama A, Iwabuchi Y, Shibata H, Yashiro M, Aiba N. *Cancer Science* 107 (6), 803-811, 2016 査読有

8. A curcumin analog, GO-Y078, effectively inhibits angiogenesis through actin disorganization. Sugiyama S., Yoshino Y., Kuriyama S., Inoue M, Komine K, Otsuka K, Kohyama A, Yamakoshi H, Ishioka C, Tanaka M., Iwabuchi Y, Shibata H. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 16 (5), 633-647 査読有

9. Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric signet-ring carcinoma cells. Tsuji T., Satoyoshi R., Aiba N., Kubo T., Yanagihara K., Maeda D., Goto A., Ishikawa K., Yashiro M., Tanaka M. *Cancer Research* 75 (2), 356-366, 2015 査読有

10. Tks5 activation in mesothelial cells creates invasion front of peritoneal carcinomatosis.

Satoyoshi R., Aiba N., Yanagihara K., Yashiro M., Tanaka M. *Oncogene* 34(24) 3176-3187, 2015 査読有

11. Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer associated fibroblasts. Satoyoshi R., Kuriyama S., Namiko A., Yashiro M., Tanaka M. *Oncogene* 29, 650-660, 2015 査読有

[学会発表](計 15 件)

1. 田中正光 第75回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2016年10月6日-10月8日

Mesothelial cells create a novel niche that facilitates gastric cancer invasion.

2. 栗山 正 田中正光 第75回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2016年10月6日-10月8日 PLEKHN1 is required for Bax oligomerization in cancer cell line.

3. 田中正光 第105回日本病理学会総会(仙台国際センター会議場) 2016年5月12日-5月14日 Mesothelial cells create a novel

niche that attracts cancer invasion and peritonitis.

4. 伊藤 剛 田中正光 第39回日本分子生物学会総会 (パシフィコ横浜) 2016年11月30日-12月2日 CAF (癌関連線維芽細胞)は癌細胞の細胞死を誘導する事で癌浸潤モードを制御する

5. 栗山 正 第39回日本分子生物学会総会 (パシフィコ横浜) 2016年11月30日-12月2日 アフリカツメガエル頭部神経堤細胞の集団的細胞遊走

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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

12. 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

13. 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

14. 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

15. 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

〔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 (ITO GO)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：60607563