

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670820

研究課題名(和文) 融合プロテオミクスと動物モデルを用いたヘテロな細胞集団の悪性化進行機構の解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism of malignancy increase in heterogeneous cancer by using integrated proteomics and mouse models

研究代表者

ウィルソン森藤 政代 (MORIFUJI WILSON, Masayo)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90271113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は外的環境などの影響により不均一(ヘテロ)ながん組織が形成され、治療感受性の違いが生じ治療を困難にしているため、ヘテロながんの性状を明らかにすることは重要である。

われわれは高転移性がん細胞と非転移性がん細胞からなるヘテロながん細胞のヌードマウス移植群が、単一転移性がん細胞移植群と比較し予後不良であることを検証し、ヘテロながん細胞集団、各単一がん細胞集団の網羅的遺伝子解析・経時的ビデオ観察などを行った結果、ヘテロながん細胞集団内の転移性がん細胞に、TNF Signalingの亢進および活性型HIF-1の早期発現がヘテロながん細胞集団の悪性化増大に関わっている可能性があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：By adapting to factors in the microenvironment, cancer gains diversity, and this heterogeneity results in various therapeutic responses and failures. It is thus important to clarify the character of heterogeneous cancer.

We transplanted a mixture of equal parts highly-metastatic (HM) and non-metastatic (NM) human tongue cancer cells into nude mice and examined growth and metastatic behavior. The prognosis for mice injected with the mixture was worse than for mice injected with either clone only, evidencing the higher malignancy of the heterogeneous cancer. We performed comparative analyses of the gene expression in heterogeneous and homogeneous cell samples. TNF signaling, which connects with HIF-1, was up-regulated in the HM cells in the heterogeneous sample. By video analyses, we detected the earlier accumulation of active HIF-1 in heterogeneous cancer cells than inhomogeneous cells. These factors may be related to the increased malignancy of the HM cells in heterogeneous cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：がんの不均一性 悪性化進行 細胞間コミュニケーション がん転移 口腔がん 動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞は外的環境の影響により、エピジェネティックな変化・がん幹細胞様の細胞の階層化・ゲノムの不安定性がおり、多様な細胞が生まれ、がん組織の不均一性 (Heterogeneity) が形成される。このがん組織の不均一性のため治療への感受性の違いが生じ、治療を困難にしている。米国がん学会は 2011 年より毎年、がん組織の不均一性に関する基調シンポジウムを設け、2013 年日本がん転移学会のテーマは「がんの不均一性・理解と対応」であり、治療の最大の障壁であるがん組織の不均一性について真剣に取り組む姿勢がとられおり、不均な (ヘテロな) がん細胞の性状を明らかにすることは重要である。

(2) われわれは診断・治療法開発のため、マウスモデルにて浸潤・転移能が異なるヒト舌がん細胞株を同一患者様より樹立した。がん組織がヘテロな細胞集団からなることに着目し、上記各がん細胞を異なった蛍光でラベルし、非転移性と転移性を区別できるようにした後、それらを混和したがん細胞集団をマウスの舌に移植 (同所性移植) し、がん組織類似モデルを作製した。このヘテロながん細胞集団の移植動物モデルの生存率、がん細胞の発育、転移様式を調べた結果、ヘテロな細胞集団では予後不良であることがわかった。われわれは非転移性と高転移性ががん細胞間の網羅的遺伝子質解析とタンパク質解析のデータを統合解析 (融合プロテオミクス法) し、高転移性がん細胞に特徴的なシグナルネットワークおよび転移性がん細胞マーカー候補分子を同定した。ヘテロながん細胞集団の悪性化進行機構を解明するために、ヘテロながん細胞集団および単一ながん細胞集団に発現する分子の検討に取り組んでいる。ヘテロながん細胞集団の悪性化進行機構の解明はがん撲滅法の開発に繋がり重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) ヘテロながん細胞集団、あるいは単一がん細胞集団を移植した動物モデルを作成し、予後・移植部位および転移巣での発育様式を比較検討し、ヘテロながん細胞集団の性状を明らかにする。

(2) ヘテロながん細胞集団内で起こっているがん細胞間コミュニケーションによって亢進する分子シグナルネットワークと重要分子を同定し、ヘテロながん細胞集団の悪性化進行機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) **ヘテロながん細胞集団、各単一がん細胞集団移植動物モデルの生存率、移植部位での各がん細胞の発育様式、転移能の検討:**ヘ

テロながん細胞集団移植動物モデルにて高転移性がん細胞と非転移性がん細胞の区別ができるように、各がん細胞を可視化し (高転移性舌がん細胞株 SQUU-B: GFP 発現・緑、非転移性舌がん細胞株 SQUU-A: RFP 発現・赤) 等量の両細胞を混和したヘテロながん細胞集団をヌードマウスの舌に移植し、実体蛍光顕微鏡を用いて、移植後 11 日 (3 匹) 21 日 (3 匹) 42 日 (5 匹) に舌移植部位における各がん細胞の発育様式、頸部リンパ節転移様式を観察し、42 日の生存率を検討した。また転移性がん細胞および非転移性がん細胞をそれぞれ単独でヌードマウスの舌に移植し、同様の解析を行った。

(2) **ヘテロながん細胞集団にて (がん細胞間コミュニケーションによって) 亢進するシグナルネットワークと重要分子の検討:** 高転移性舌がん細胞と非転移性舌がん細胞を混和したヘテロながん細胞集団および各単一がん細胞集団をそれぞれ培養し、17 時間後、遺伝子を抽出し、網羅的遺伝子解析 (マイクロアレイ: Agilent Microarray Array Ver2, 20738 arrays) を行い、各単一がん細胞集団では発現していない分子で、ヘテロながん細胞集団に発現した分子を同定した。これらの分子に対し、解析ソフトを用いて、分子ネットワーク解析を行い、ヘテロながん細胞集団にて亢進するシグナルネットワークを同定した。

(3) **ヘテロながん細胞集団内の高転移性がん細胞にて亢進するシグナルネットワークと重要分子の検討:** (2) の解析結果のヘテロながん細胞集団発現分子がどの細胞で発現しているかを明らかにするために、まず、培養 17 時間後のヘテロながん細胞集団をトリプシンにてプレートから剥離し、バラバラにした後、各種細胞を選別する機械 (FACS) を用いて、高転移性がん細胞と非転移性がん細胞を分離採取した。その採取細胞の遺伝子を抽出し、(2) と同様の網羅的遺伝子解析を行い、ヘテロながん細胞集団内の高転移性がん細胞に特有に発現する分子を同定した。トリプシン、FACS、操作時間による影響を排除するための資料に、各単一がん細胞集団に対して、FACS を用いて採取した細胞の網羅的遺伝子解析を行った。

(4) **傷つけアッセイ法による遊走能の測定:** ヘテロながん細胞集団では細胞の運動に関係するシグナルネットワークの亢進が認められたので、ヘテロな細胞集団内の高転移性がん細胞と単一転移性がん細胞の動きに相違があるかどうかを傷つけアッセイ法により検討した。ヘテロながん細胞集団と単一転移がん細胞集団をそれぞれ 24 穴プレートにまき、24 時間後にチップの先で細胞表面に

線を描くように傷をつけ、細胞が遊走していく状況（細胞が剥がれた領域が細胞の遊走により埋まっていく様子）をビデオ観察し、所要時間を測定した。

**(5) インベーションアッセイ法による浸潤能の測定**：ヘテロながん細胞集団内の高転移性がん細胞に腫瘍壊死因子 TNF の発現が認められたので、TNF による高転移性がん細胞や非転移性がん細胞の浸潤能の変化を検討した。24 穴用のトランスウェルの下面にマトリゲルをコートし、ヘテロながん細胞集団あるいは単一のがん細胞をトランスウェルの上室にいれ、下室を TNF を添加した培養液あるいは無添加培養液で満たし、24 時間培養後、フィルターを通過した細胞を染色し、顕微鏡下にて計測した。

**(6) タイムラプスビデオカメラによる活性型低酸素誘導因子 HIF-1 (Hypoxia inducible factor) 発現の観察**：われわれは高転移性がん細胞と非転移性がん細胞の遺伝子およびタンパク質発現の網羅的解析（マイクロアレイ・質量分析法）を行い、融合プロテオミクス法にて高転移性がん細胞にて亢進しているシグナルネットワークと重要分子を同定していた。これらのデータと解析(2)(3)のデータから、HIF-1 が高転移性がん細胞に特徴的な分子であり、ヘテロながん細胞集団にて発現する TNF シグナルネットワークが HIF-1 シグナルネットワークにつながるということがわかったので、ヘテロながん細胞集団と単一の高転移性がん細胞集団内における活性型 HIF-1 の発現の相違に着目した。活性型 HIF-1 を可視化するために、活性型 HIF-1 が蓄積すると緑色に光る高転移性がん細胞を作製し、24 穴プレートにヘテロながん細胞集団と高転移性がん細胞集団をそれぞれまき、タイムラプスビデオカメラを用いて、活性型 HIF-1 の発現を培養 24 時間後から 7 日間観察した。

**(7) 動物モデルを用いた HIF-1 ノックダウン細胞の性状解析**：高転移性がん細胞における HIF-1 の発現と浸潤・転移能との関係を調べるために、高転移性がん細胞の HIF-1 をノックダウンした細胞を作製し、ヌードマウスの舌に移植し、生存率、舌および頸部リンパ節の転移について(1)と同様の方法にて解析を行った。またノックダウン細胞と高転移性がん細胞を混和したヘテロながん細胞集団も同様の解析を行った。

#### 4. 研究成果

**(1) ヘテロながん細胞集団移植動物モデル群は単一がん細胞移植群と比較し悪性化が増大した**：各種舌がん細胞を同所性移植したヌードマウスの生存率を比較検討したとこ

ろ、移植後 42 日の生存率は、単一移植群では 100%であったのに対し、ヘテロながん細胞群では 42%で、予後不良となっていた。各がん細胞の発育・転移様式を実体蛍光顕微鏡を用いて経時的に調べると、がん細胞を移植した舌において、単一がん細胞移植群では腫瘍は移植部を中心とした単塊を示したのに対し、ヘテロながん細胞集団移植群では転移性がん細胞の腫瘍塊が移植部および後方に散存し、強い浸潤像を示していた。また頸部リンパ節転移を検討したところ、高転移性がん細胞移植群ではリンパ節転移が全例単発であったのに対し、ヘテロながん細胞群では 75%が多発転移を示していた。以上のことより、ヘテロながん細胞群は単一がん細胞群と比較し、悪性化が増大していることがわかった。

**(2) 高転移性がん細胞と非転移性がん細胞の混合培養(がん細胞間コミュニケーション)により発現する分子がある**：ヘテロながん細胞集団、各単一がん細胞集団の網羅的遺伝子解析を行った結果、各単一がん細胞集団では発現していなかったが、ヘテロながん細胞集団で発現した分子が 424 分子検出できた。これらの分子をネットワーク解析すると、細胞の運動に参与する(Rho)シグナルネットワーク、G タンパク質結合受容体シグナルネットワークなどの分子シグナルネットワークの亢進が認められた。

**(3) ヘテロながん細胞集団内の高転移性がん細胞では腫瘍壊死因子のシグナルネットワーク(TNF Signaling)が亢進していた**：(2)の解析結果より得られたヘテロながん細胞集団にて遺伝子が発現した 424 分子の中で、FACS を用いてヘテロながん細胞集団内から採取した高転移性がん細胞にのみ発現する分子は 55 分子であった。これらの分子のネットワーク解析にて、TNF Signaling、抗酸化タンパク質グルタレドキシニンなどの分子シグナルネットワークが亢進していた。

**(4) ヘテロながん細胞内の高転移性がん細胞は単一高転移性がん細胞より遊走能が上昇していた**：傷つけアッセイ法にて、剥離した領域が遊走細胞で満たされる時間を計測すると、ヘテロながん細胞集団では 24 時間に対し、単一の高転移性がん細胞では 40 時間であった。

**(5) 高転移性がん細胞は TNF により浸潤能が増大した**：インベーションアッセイ法により浸潤能を検討した結果、TNF を添加しない場合は、高転移性がん細胞も非転移性がん細胞もほとんど下面には浸潤しなかったが、TNF を添加すると、高転移性がん細胞は下面に強く浸潤した(22%)が、非転移性がん細胞はほとんど浸潤しなかった。

(6) **ヘテロながん細胞集団では活性型 HIF-1 が早期に発現した**：ビデオ観察にて、ヘテロながん細胞集団では、活性型 HIF-1 を培養 2 日目より検出し、4 日目に最大になったのに対し、単一高転移性がん細胞集団では培養 5 日目より検出し、6 日目に最大となった。

(7) **高転移性がん細胞の HIF-1 をノックダウンすると転移能が消失し、高転移性がん細胞と HIF-1 ノックダウン細胞のヘテロながん細胞集団では浸潤・転移能が増大した**：高転移性がん細胞の HIF-1 ノックダウン細胞、および高転移性がん細胞とノックダウン細胞を混和したヘテロながん細胞集団を移植したヌードマウスの 42 日生存率はともに 100 %であった。移植部の舌では、HIF-1 ノックダウン細胞は単塊を示し、病理組織検査 (HE 染色) にも膨張性発育し、高転移性がん細胞で見られた筋層へのがん細胞の浸潤はなく、非転移性がん細胞と同様の組織像を示していた。ヘテロながん細胞集団では腫瘍塊が移植部および後方に散存し、強い浸潤像を示していた。頸部リンパ節の転移はノックダウン細胞では認められず、このヘテロながん細胞集団では 78 %が多発転移で、単一高転移性がん細胞と比較し、悪性化が増大していた。

以上のことにより、ヘテロながん細胞集団内の高転移性がん細胞の TNF シングルネットワークの亢進と活性型 HIF-1 の早期発現がヘテロながん細胞の悪性化進行機構の一因である可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

ウィルソン森藤政代 井上麻美 園田由華 久原哲 田代康介 転移性がん細胞は非転移性がん細胞の共存により悪性化が増大する 第 74 回日本癌学会総会 2015. 10. 9 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

ウィルソン森藤 政代

(MORIFUJI WILSON, Masayo)

九州大学・大学院連合農学研究科・研究員  
研究者番号：9 0 2 7 1 1 1 3

### (2) 研究分担者

荒木 令江 (ARAKI Norie)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：8 0 2 5 3 7 2 2

田代 康介 (TASHIRO, Kosuke)

九州大学・大学院連合農学研究科・准教授  
研究者番号：0 0 1 9 2 1 7 0

### (3) 連携研究者

入江 厚 (IRIE, Atushi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：3 0 2 5 0 3 4 3