

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19594

研究課題名(和文) Cancer-fusion cellによるがん細胞の新たな進化機構

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of cancer cell evolution via cell-cell interaction

研究代表者

榎本 将人 (Enomoto, Masato)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00596174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、2種類のがん遺伝子RasとSrcをそれぞれ活性化させた哺乳類培養細胞を共培養したところ、両細胞集団の中に互いに近接すると細胞融合を起こす細胞がいることが分かった。この細胞融合の分子機構を解析したところ、Src細胞が分泌するグルタミン酸がRas細胞の肥大化を誘発し融合能を亢進させていることが分かった。さらに、肥大化したRas細胞は細胞集団移動のleader cellとして機能することが分かった。これらの結果は、腫瘍細胞が相互作用を介してその性質を変化させてがん化を促すことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、異なる2種類の腫瘍細胞が細胞間相互作用を介して新しい機能を獲得することを哺乳類培養細胞系において明らかにした。このことは、がん組織において近接する2つの腫瘍細胞同士がその機能・役割を制御し合っている可能性を示唆している。将来的には、生体内において細胞間相互作用を介した腫瘍細胞の機能制御の普遍原理を解明しその制御方法を確立することで、新たながん治療戦略や抗がん剤開発の基盤になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although cancer tissues are composed of heterogeneous tumor cell populations, it is still poorly understood how distinct tumor cells contribute to cancer progression. In this situation, I found that two MDCK cells activating oncogenic Ras and Src cause cell fusion when they coexisted. This result suggests that distinct tumor cells drives cancer cell evolution via cell-cell interaction. In this project, I aimed to dissect the mechanism by which Ras and Src cells developed into newly generated tumor cells via cell fusion. I found that Src cells cause cellular hypertrophy of Ras cells via cell-cell interaction. Interestingly, hypertrophic Ras cells have capability of cell fusion and behave as the leader cell in collective cell migration. Furthermore, I found that Src cells secrete glutamate in extracellular space to cause cellular hypertrophy of Ras cells. These findings suggest that Src-activating cells provide additive function to Ras-activating cells for tumor progression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん 細胞間相互作用 Ras Src

1. 研究開始当初の背景

近年、がん進展を促す細胞の出現（がん細胞の進化）には腫瘍内に存在する異なるがん原性細胞の不均一性が重要であると考えられている（*Nat Rev Cancer*, 2012）。このような腫瘍内不均一性は、多段階的な遺伝子変異（がん遺伝子・がん抑制遺伝子）の蓄積や、がん幹細胞の自己複製・多分化能によって生じることが示唆されている（*Annu Rev Pathol*, 2016; *Nature*, 2012）。すなわち、がん細胞の進化は突然変異や幹細胞性質といったゲノムレベルの変化に起因しているといえる（図1）。

一方で、腫瘍組織内に遺伝的背景が異なる細胞集団が不均一に存在しているという事実は、これらの細胞同士が組織内で空間的に近接していることを示しており、腫瘍内部では異なる細胞同士が互いに相互作用していると考えられる。実際に、細胞同士の相互作用が腫瘍

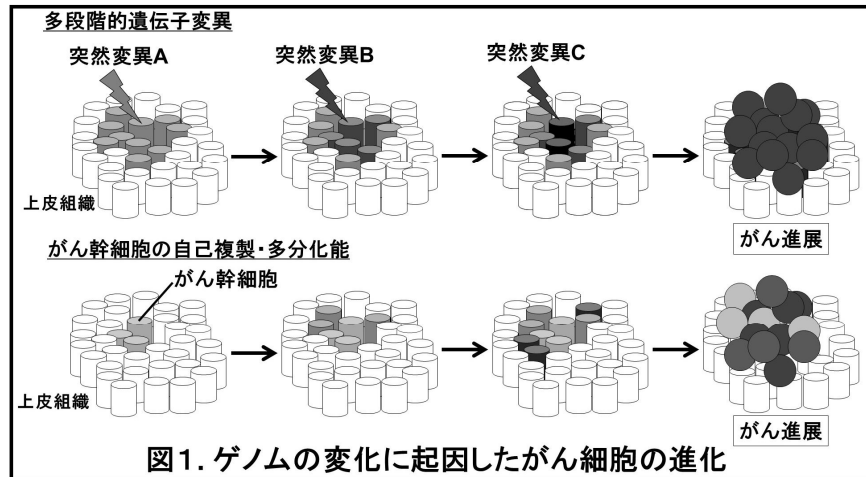


図1. ゲノムの変化に起因したがん細胞の進化

の成長や悪性化を引き起こすことがショウジョウバエやマウスなどモデル生物を用いた解析で明らかになってきたおり、このようながん原性細胞の不均一性が高い増殖能、浸潤・転移や治療抵抗性を獲得したがん細胞の出現（がん細胞の進化）の要因になっていると考えられつつある。しかしながら、細胞間相互作用を介したがん進展メカニズムは、いまだ不明な点が多い。その理由として、ゲノム解析では検出できないがん原性細胞同士の相互作用のアウトプットの解析が遅れていたことが挙げられる。

2. 研究の目的

これまでの解析により、ショウジョウバエ上皮に異なるがん遺伝子（Ras と Src）をそれぞれ活性化した2種類の細胞集団を近接するように誘導すると、両細胞集団の境界上に位置する細胞が細胞間相互作用を介して互いにその性質を変化させて悪性化する（浸潤・転移能を獲得する）ことが分かってきた。これらの知見から腫瘍内不均一性によるがん進展の基本原則を理解するためには、個々のがん原性細胞同士の相互作用を1細胞レベルで解析することが重要であると考えた。そこで、まず哺乳類培養細胞レベルで細胞間相互作用によるがん原性細胞の機能・性質変化を解析した。興味深いことに、Ras と Src を各々活性化した上皮細胞が共存すると、Src 細胞が Ras 細胞の肥大化を引き起こし、肥大化した Ras 細胞は細胞融合能を獲得し周辺細胞と融合することが分かった。このことは、腫瘍細胞が細胞間相互作用によって細胞融合能を獲得し、それによりがん細胞の多様性が生じる可能性を示唆している。そこで、本研究では Ras 細胞と Src 細胞の相互作用による新たながん細胞「Cancer-fusion cell (CFC)」の出現機構を解明することで、細胞間相互作用を介したがん細胞の進化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞間相互作用を介したがん細胞の進化メカニズムを明らかにするため、Ras^{V12}（活性化型 Ras）および Src^{Y527F}（活性化型 Src）をテトラサイクリン誘導性に発現する MDCK 細胞（イヌ腎臓尿管上皮細胞）を用いる。これら2種類の細胞を単独もしくは共培養した際の各細胞の変化を免疫細胞染色やタイムラプスイメージングにより解析する。

4. 研究成果

Cancer-fusion cell (CFC) の出現機構を明らかにするために、Ras 細胞と Src 細胞それぞれを単独・混合培養した時の細胞形態を詳細に観察した。その結果、Src 細胞と共存した時に細胞形態が肥大化した Ras 細胞が増加しており、この肥大化した Ras 細胞が Src 細胞と細胞融合を引き起こしていることが分かった（細胞面積が 4,000 μm² 以上の細胞を肥大化とした）。これらの結果から、Ras 細胞と Src 細胞が細胞融合を引き起こすには Ras 細胞の肥大化が重要であると考えた。そこで Ras 細胞の肥大化メカニズムを明らかにするため、Ras 細胞の肥大化が Src 活性化細胞との直接的な相互作用か分泌性の因子を介した相互作用によるものかを解析した。テトラサイクリン誘導性に Src を活性化した MDCK 細胞を単独で約1日培養した後、その培養上清を回収し Ras 細胞へと添加した。その結果、Src 活性化細胞の培養上清を添加し 48 時間後の Ras 細胞の形態を確認すると、興味深いことに Ras 細胞の肥大化が認められた（図2）。このことは、Src 活性化細胞が分泌する因子が Ras 細胞の肥大化に重要であることを示唆している。

そこで次に、Ras 細胞の肥大化を誘発する Src 活性化細胞の分泌因子を同定する解析を実施した。そのために、Src 活性化細胞の培養上清を回収し、培養上清に含まれる因子を網羅的に探索するメタボローム解析(CE-MS)を実施した。その結果、コントロール細胞 (Src を誘導していない MDCK 細胞) と比較して Src 活性化細胞の培養上清中にはグルタミン酸が約 60 倍多く含まれていることが明らかとなった。そこで、グルタミン酸が Ras 活性化細胞の肥大化を引き起こす因子である可能性を検証した。メタボローム解析から Src 細胞の培養上清に含まれるグルタミン酸の濃度は約 500 μM であったことから、同濃度のグルタミン酸

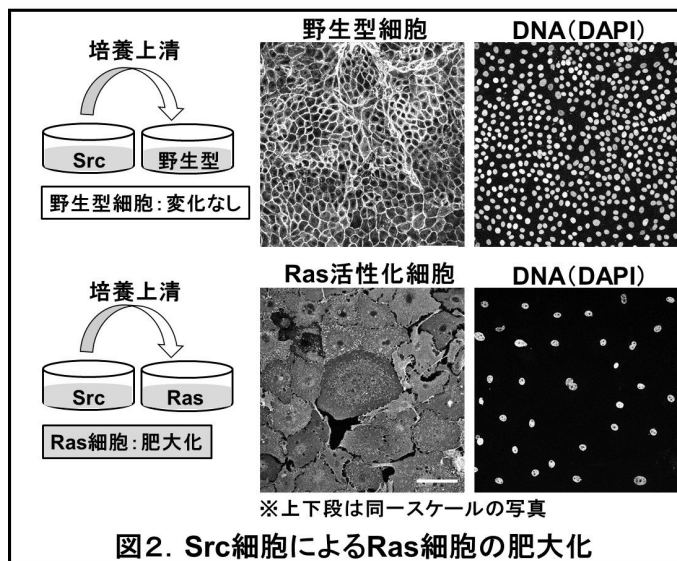


図2. Src細胞によるRas細胞の肥大化

酸を含有させた野生型細胞の培養上清を Ras 活性化細胞へと添加させた。その結果、グルタミン酸の添加によって肥大化した Ras 活性化細胞の数が増加した。これらの結果は、Src 活性化細胞が分泌するグルタミン酸によって Ras 細胞の肥大化が誘導されたことを示している。さらに、Src 細胞内のグルタミン酸の含有量をメタボローム解析で調べたところ、Src 細胞内のグルタミン酸は野生型細胞と比較してグルタミン酸の量に顕著な差異は認められなかった。すなわち、Src 活性化細胞はグルタミン酸を積極的に分泌することで Ras 細胞の肥大化を促していることが明らかになった。さらに、Src 細胞による Ras 細胞の肥大化プロセスをタイムラプスイメージングにより解析した。Src 細胞の培養上清を添加し約 36 時間後には Ras 活性化細胞の肥大化が確認された。興味深いことに、肥大化した Ras 細胞は高い運動能を有しており、leader cell として細胞集団移動を牽引することや、細胞分裂に異常を起こし多核細胞へと変化することが分かった。これらの結果は、肥大化 Ras 細胞が浸潤プロセスにおいて leader cell として働く可能性や細胞分裂異常を起こすことでがん組織の染色体不安性の要因になる可能性を示唆している。

以上の結果より、異なる 2 種類のがん原性細胞 (Ras 細胞と Src 細胞) は互いに近接すると Src 細胞が分泌するグルタミン酸を介して Ras 細胞の肥大化を誘発し、細胞融合能や高い細胞運動能を付加することが明らかとなった。また肥大化した Ras 細胞は細胞分裂異常を起こし、多核細胞としてがん化を促す可能性が示唆された。これらの一連の結果は、がん組織内部では腫瘍細胞同士が細胞間相互作用を介して細胞機能を制御し合うことで、DNA/RNA の変化に依存しない新たながん細胞の進化機構の存在を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masato Enomoto, Carmen Siow, Tatsushi Igaki	4. 巻 1076
2. 論文標題 Drosophila As a Cancer Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 173-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-13-0529-0_10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 榎本将人、井垣達史	4. 巻 -
2. 論文標題 細胞周期とがん	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 京大発! フロンティア生命科学（講談社）	6. 最初と最後の頁 157-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 榎本 将人、井垣 達史	4. 巻 -
2. 論文標題 細胞周期とがん	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 京大発! フロンティア生命科学（講談社）	6. 最初と最後の頁 157-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 辻棕矢、榎本将人	4. 巻 -
2. 論文標題 がんの発生・進展機構の解明と治療薬開発への応用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 動物/疾患モデルの作製技術・病態解析・評価手法（技術情報協会）	6. 最初と最後の頁 147-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎本将人, 小川慶吾, 井垣達吏
2. 発表標題 腫瘍細胞とマクロファージの相互作用によるがん制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Enomoto, Tatsushi Igaki
2. 発表標題 Cell-to-cell propagation of JNK signaling controls tissue remodeling during wound healing
3. 学会等名 第13回日本ショウジョウバエ研究会(JDRC13)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Enomoto, Tatsushi Igaki
2. 発表標題 Cell-to-cell propagation of JNK signaling controls tissue repair and regeneration
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本将人
2. 発表標題 細胞間シグナルネットワークによる創傷治癒制御
3. 学会等名 第3回京都皮膚基礎研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本将人
2. 発表標題 細胞間シグナルネットワークによる創傷治癒制御
3. 学会等名 第3回京都皮膚基礎研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本 将人、本田 直樹、武本 花奈美、竹本 大策、井垣 達吏
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションによるがん進展制御
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本将人、井垣達吏
2. 発表標題 死細胞が発信する細胞間シグナルネットワークによる創傷治癒制御
3. 学会等名 第26回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	及川 彰 (Oikawa Akira)	山形大学・農学部・准教授	