

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02648

研究課題名（和文）がん転移における細胞集塊の細胞極性および極性転換の役割

研究課題名（英文）Role of polarity switching of cancer cell clusters in metastasis

研究代表者

井上 正宏（INOUE, Masahiro）

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：10342990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々の開発した三次元特性を維持した初代がん三次元培養法を用いて、大腸がんや卵巣がんなど分化がんの細胞極性が条件によって転換すること、さらに転移における極性転換の役割を明らかにした。また、予後不良の組織型であるmicropapillary carcinomaの病態が極性転換不全であること、病態は可逆的であること、さらにその分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、極性転換ががんの病態に深く関与していることを明らかにした。特に、予後不良の組織型であるmicropapillary carcinomaの病態とその分子メカニズムを明らかにすることができたことは意義深い。がんの転移能を極性転換能からアプローチした研究はこれまでになく、本研究結果はがんの進展・転移の制御による新たな診断・治療法の発展につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Using our methods for preparing and culturing primary 3D cancer cells, in which 3D structure in the tumor is preserved, we demonstrated that apico-basal polarity switches depending on culture conditions and clarified the role of polarity switching in metastasis. In addition, we revealed that micropapillary carcinoma, a pathological pattern with poor prognosis, is a polarity unswitchable status, and clarified the underlying molecular mechanisms.

研究分野：初代がん細胞培養によるがんの三次元特性および、がんの多様性・可塑性の研究

キーワード：細胞極性 転移 微小乳頭がん

## 1. 研究開始当初の背景

固形がんの特性の中には、細胞-細胞間接着を維持した状態でのみ発揮されるものがあり、腫瘍組織からがん細胞を調製・培養する過程で、単細胞化してしまうとがん細胞本来の性質が失われてしまう可能性がある。我々は、がん組織中のがん細胞を単細胞化することなく、細胞-細胞間接着を維持したまま細胞塊として調製・培養する新しい技術(Cancer tissue-originated spheroid: CTOS 法)を開発した (Kondo 2011 PNAS)。CTOS 法ではがん細胞は調製から培養に至るまで一度も単細胞にしない。大腸がんなど分化がんの場合、CTOS は培養下でも特徴的な3次元特性を保持する。

がんの浸潤・転移においては、がん細胞(単細胞)がEMTを起こして原発巣から遊離し浸潤・転移をするモデルが広く受け入れられている。一方、がんの浸潤においては病理学的観察に基づいて細胞が集団として浸潤するモデル(Collective migration)が提唱されており(Friedl 2009 Nature Mol Cell Biol) さらに転移においても細胞集団が起源となるモデルも示唆されている(Yu 2013 Science)。我々は大腸がんCTOSが培養条件によって2つの異なる極性状態、即ち細胞外マトリクスの存在下でスフェロイド内にapical側で覆われた複数の管腔を持つ状態(apical-in)と浮遊培養下でapical側がスフェロイドの外周を覆う状態(apical-out)とを示すことを見出した(Okuyama 2016 Am J Pathol)。2つの極性状態は時間依存的かつ可逆的に速やかに転換する(極性転換)。

## 2. 研究の目的

本研究は、がんの転移における極性転換の関与を明らかにすることを目的とした。具体的には1)細胞集団を転移源とする腹腔・胸腔内転移の成立における極性転換の役割を明らかにすること、2)予後不良な病理学的特徴であるMicropapillary carcinoma (MPC)を極性転換の観点からアプローチし、分子メカニズムを解明すること、3)細胞外基質との接触によって誘発される極性転換の分子メカニズムの解明を試みた。

## 3. 研究の方法

CTOS調製は先行論文(Kondo 2011 PNAS)に従って行った。CTOSはNOD-SCIDマウスあるいはNSGマウスに移植し、Xenograft tumorを作製してライン化した。CTOSの接着能はMatrigelでコートした培養皿への接着で評価した。極性はBasal面をIntegrinB4で、apical面をvillinで評価した。腹膜転移モデルは卵巣がんCTOSを腹腔内に注入することで作製した。中皮細胞の細胞株は愛知県がんセンターの関戸博士から供与を受けた。蛍光Apical-markerはGPIアンカー型たんぱく質が、apical膜により多く集積する特性を生かして、GPI-GFP融合蛋白の発現ベクターを導入することにより作製した。Real-time imagingは培養ステージ付きコンフォーカル顕微鏡で行った。

## 4 . 研究成果

### (1) 卵巣がんにおける、極性転換能が腹膜播種の成立に果たす役割

本研究では腹膜転移が臨床上大きな問題である卵巣がん CTOS をモデルとして、極性転換能が腹膜播種の成立に果たす役割を検証した。まず、患者検体から卵巣がん CTOS を樹立し、卵巣がんでも CTOS で極性転換が行なわれていることを確認した。CTOS が ECM コートした培養皿へ接着する過程において、極性が変化していく時間経過を詳細に検討した。次に、ECM コートした培養皿への接着能を阻害する薬物をスクリーニングし、いくつかのヒット化合物を得た。その中の一つは、大腸癌の極性転換を抑制する dasatinib で、卵巣がん CTOS でも極性転換を抑制した。他の薬剤については極性転換を部分的に抑制するものもあった。今後、腹膜中皮細胞との相互作用を *in vitro* で検討する。また、樹立した卵巣がんを腹腔内投与して、腹膜播種を形成させる複数のモデルを確立した。今後、候補薬について、中皮への接着能を *in vitro* で、腹膜播種モデルの治療効果を *in vivo* で検証する。

### (2) Micropapillary carcinoma (MPC) と極性転換

MPC は、転移の頻度が高く予後不良な病理組織型である (Cserni 2014 Pathology)。がん組織では通常がん細胞集塊は ECM に囲まれた状態で存在していて、極性状態は apical-in であるが、MPC ではがん細胞集塊は ECM に囲まれた状態 (apical-out) である。すなわち、極性の観点からすると MPC は「極性転換不全」であるといえる。本研究では MPC 腫瘍から樹立した CTOS を用いて、極性転換不全に至るメカニズムを解析した。まず、蛍光 Apical-marker を導入することで、Real-time imaging を行い、極性転換のダイナミクスを明らかにした。ECM 接触後の数時間で極性転換の最初の変化が現れることから、ECM から細胞内への情報伝達が極性転換で重要な働きをすると予想した。インテグリンの局在変化は MPC で異常はなく、ROCK の阻害剤で処理する、あるいは GAP の強制発現で RhoA の活性を抑制すると MPC -CTOS も極性転換するようになった。*in vitro* で前処理することで、腫瘍が MPC でなくなることから、MPC は可塑的な病態であり、形質は ECM との接触の初動で決まると考えられた。

### (3) 極性転換を誘発する分子メカニズムの解明

本研究では、CTOS が ECM への接触を感知して、接着分子の局在移動など接着を確立させるためのシグナルの解明を試みた。上記 Apical-marker を用いて、極性変化阻害剤のスクリーニングを行なった。その結果 ErbB family に対する阻害剤が極性転換を促進することが明らかになった。浮遊培養からゲル包埋培養へ移行することで ErbB family のリン酸化状態が亢進したが、初動においては ErbB family のリン酸化状態が抑制されることが極性転換に必要であると考えられる。ラフト分画を効率的に調製するプロトコルを確立し、ErbB family が主にラフト分画に存在していることを明らかにした。ErbB family は主にラフト分画に存在していた。極性転換におけるラフトの膜上での可動性が、ErbB family を介した極性転換に至るシグナル伝達に必須である可能性がある。

以上の研究により、極性転換ががんの病態に深く関与していることが明らかになった。がんの転移能を極性転換能からアプローチした研究はこれまでになく、本研究成果はがんの進展・転移の制御による新たな診断・治療法の発展につながることを期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tanaka Mie, Kondo Jumpei, Kaneko Kensuke, Endo Hiroko, Onuma Kunishige, Coppo Roberto, Masuda Masamune, Kamiura Shoji, Yoshino Kiyoshi, Ueda Yutaka, Kakeya Hideaki, Kimura Tadashi, Inoue Masahiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Heterogenous chemosensitivity of a panel of organoid lines derived from small cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 889 ~ 900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00511-5	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 Endo Hiroko, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Ohue Masayuki, Inoue Masahiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Small subset of Wnt activated cells is an initiator of regrowth in colorectal cancer organoids after irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4429 ~ 4441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Arita Takahiro, Kondo Jumpei, Kaneko Yuka, Tsutsumi Miho, Kanemaru Mai, Matsui Mari, Arakawa Yukiyasu, Katoh Norito, Inoue Masahiro, Asai Jun	4. 巻 99
2. 論文標題 Novel ex vivo disease model for extramammary Paget's disease using the cancer tissue-originated spheroid method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 185 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.07.006	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 Kubota Satoshi, Tanaka Mie, Endo Hiroko, Ito Yu, Onuma Kunishige, Ueda Yutaka, Kamiura Shoji, Yoshino Kiyoshi, Kimura Tadashi, Kondo Jumpei, Inoue Masahiro	4. 巻 524
2. 論文標題 Dedifferentiation of neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix in hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 398 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ideo Hiroko, Kondo Jumpei, Nomura Taisei, Nonomura Norio, Inoue Masahiro, Amano Junko	4. 巻 10
2. 論文標題 Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted by cancer tissue-originated spheroids reveals new candidates for prostate cancer detection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59622-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okita Kouki, Okazaki Shogo, Uejima Shinya, Yamada Erina, Kaminaka Hiroki, Kondo Misa, Ueda Shiho, Tokiwa Ryo, Iwata Nami, Yamasaki Akitaka, Hayashi Natsumi, Ogura Dai, Hirotsu Kenji, Yoshioka Toshiaki, Inoue Masahiro, Masuko Kazue, Masuko Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel functional anti-HER3 monoclonal antibodies with potent anti-cancer effects on various human epithelial cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hagihara Takeshi, Kondo Jumpei, Endo Hiroko, Ohue Masayuki, Sakai Yoshiharu, Inoue Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Hydrodynamic stress stimulates growth of cell clusters via the ANXA1/PI3K/AKT axis in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56739-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hsieh Meng-Hsiung, Choe Joshua H., Gadhvi Jashkaran, Kim Yoon Jung, Arguez Marcus A., Palmer Madison, Gerold Haleigh, Nowak Chance, Do Hung, Mazambani Simbarashe, Knighton Jordan K., Cha Matthew, Goodwin Justin, Kang Min Kyu, Jeong Ji Yun, ...Inoue Masahiro, DeBerardinis Ralph J., Kim Tae Hoon, Kim Jung-whan	4. 巻 28
2. 論文標題 p63 and SOX2 Dictate Glucose Reliance and Metabolic Vulnerabilities in Squamous Cell Carcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1860 ~ 1878.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.07.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kondo Jumpei, Inoue Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 470 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8050470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Jumpei, Ekawa Tomoya, Endo Hiroko, Yamazaki Kanami, Tanaka Norio, Kukita Yoji, Okuyama Hiroaki, Okami Jiro, Imamura Fumio, Ohue Masayuki, Kato Kikuya, Nomura Taisei, Kohara Arihiro, Mori Seiichi, Dan Shingo, Inoue Masahiro	4. 巻 110
2. 論文標題 High-throughput screening in colorectal cancer tissue-originated spheroids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 345 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 井上正宏	4. 巻 44
2. 論文標題 【ガンの分子メカニズムと治療戦略】 がん細胞三次元培養から見えてきた病態解明と臨床応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 199-202
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33件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 Micropapillary carcinoma病態における極性転換とその分子機構
3. 学会等名 患者由来がんモデル講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 大腸がん転移におけるがん細胞集団の極性転換の役割
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 Micropapillary carcinoma病態における極性転換とその分子機構
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 転移浸潤におけるがん細胞集団の役割
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上正宏、近藤純平
2. 発表標題 がんの多様性・可塑性と三次元初代培養モデル
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 Molecular mechanism of polarity switching in micropapillary carcinoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小沼邦重、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 Micropapillary carcinoma病態における極性転換とその分子機構
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 がん三次元培養法の開発と応用
3. 学会等名 第152回ボパール会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 Ex vivo がん細胞培養法（CTOS法）の開発と応用
3. 学会等名 第2回がん三次元培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junpei Kondo, Yumi Sato, Tomoya Ekawa, Hiroaki Okuyama, Hiroko Endo, Masayuki Ohue, Masahiro Inoue
2. 発表標題 Heterogeneity and plasticity of differentiated carcinoma
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上正宏、近藤純平
2. 発表標題 初代培養のがん研究への応用
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤友美、近藤純平、井上正宏
2. 発表標題 極性状態 (in vitro polarity switching) を指標にしたがん転移関連シグナルの探索
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 細胞培養、Spheroid
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Inoue
2. 発表標題 Biology and Clinical Application of Cancer Tissue-Originated Spheroid
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会・16th Urological Association of Asia Congress 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 近藤純平、井上正宏 (佐々木 博己編)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://cbrrd.med.kyoto-u.ac.jp/">https://cbrrd.med.kyoto-u.ac.jp/</a>
---

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
研究分担者	近藤 純平  (KONDO Jumpei)  (80624593)	京都大学・医学研究科・特定助教    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------