

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07192

研究課題名(和文)ネオSeed & Soil：臓器特異的がん間質でがんの臓器親和性は変えられるか？

研究課題名(英文)Neo-Seed&Soil: Can Organ-specific mesenchymal cells modify the organ tropism?

研究代表者

栗山 正 (Kuriyama, Sei)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30398226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Seed & Soil仮説は転移で運ばれたがん細胞(種：Seed)がある決まった臓器(土壌：Soil)でのみ生着し増殖できるので各がん細胞ごとに転移しやすい臓器が決まっているという考え方である。我々はがん間質細胞に注目し、がんの臓器親和性が臓器ごとに存在する間質細胞が作る環境によって決められているのではないかと考えた。しかし臓器ごと、又はがん細胞ごとの間質細胞を入手する事は極めて困難である。これを実験的に、効率よく作るために薬剤耐性遺伝子を発現したマウスを担がんマウスにし、腫瘍組織からがん細胞のみを取り除き臓器特異的な間質細胞を得ようとした。移植可能な免疫不全で耐性遺伝子を持つマウスを作成した

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近10年のがん研究によりがんの部位別10年生存率は大きく改善されました。しかし依然としてステージが進んでから発見されたがんの治療効率はよくありません。早期発見早期治療に有用な分子を発見するかあるいは転移のメカニズムを明らかにし新しい治療戦略を見つける事が望まれています。今既のがんの多様性が根治を難しくしている事が言われていますが、がん細胞の特徴と転移しやすい臓器を決定する分子のセットが明らかになれば戦略を立てることが出来ます。本研究で作成されたマウスにがんを移植し転移先の臓器と原発巣の比較を行えばそれら分子にたどり着けるかもしれません。

研究成果の概要(英文)：The Seed & Soil hypothesis is based on the idea that metastasized cancer cells (seed) can only grow in certain organs (soil), and that each cancer cell has its own organ to which it can easily metastasize. We focused on cancer stromal cells and hypothesized that the organ affinity of cancer is determined by the environment created by the stromal cells that exist in each organ. However, it is extremely difficult to obtain stromal cells for each metastatic lesion or cancer cell. In order to do this experimentally and efficiently, we tried to obtain organ-specific stromal cells by removing only cancer cells from tumor tissues by using mice expressing drug-resistant genes as carrier mice. We created transplantable, immunocompromised mice with the selection-drug resistant gene.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん間質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん間質細胞の一つ CAF (Cancer associated fibroblasts) は腫瘍組織から単離され株化されている。日本では胃がん患者が多く、胃切除によって大きく組織を切り取るのがん間質細胞を回収しやすい事が関連していると考えられる。同様に欧米では前立腺がん患者が多いため、多くの前立腺がん腫瘍組織由来の CAF 株が樹立されている。古くから Seed & Soil 仮説というがん転移先の関係を予測した学説がある。転移で運ばれたがん細胞 (種: Seed) がある決まった臓器 (土壌: Soil) でのみ生着し増殖できるので各がん細胞ごとに転移しやすい臓器が決まっていると考えられてきた。我々はがん間質細胞に注目し、がんの臓器親和性が臓器ごとに存在する間質細胞が作る環境によって決められているのではないかと考えた (ネオ Seed&Soil 仮説)。CAF の研究は盛んに行われているが各臓器にできるがん細胞ごとに CAF が樹立されているかと言えばそうではなく既に樹立されている CAF を使っている事が多い。また転移先の間質は骨髄由来幹細胞から CAF が分化されていると考えられているため、臓器からどれほどの情報を得ているかについてはほとんど解析されていない。先行研究で作成した特定臓器に転移しやすいがん細胞を用いて原発巣と転移巣から間質細胞を単離し実験的にがん特異的な CAF を樹立したい。がんを移植して腫瘍組織を切り出し培養すれば間質細胞は得られるが、細胞密度を下げがん細胞と間質細胞を分離するとがん細胞は増殖できるのだが間質細胞は正常細胞に近い線維芽細胞は密度が下がると細胞老化し分裂しなくなってしまふ。そこでマウスにマーカーと薬剤耐性遺伝子を発現するマウスを作成し、担がんマウスの腫瘍組織を回収して薬剤選択を行う事でがん細胞のみ死滅させ間質のプールを得る。ここから臓器特異性を担う分子の候補を見出し、臓器特異的な間質との組み合わせによって転移先を変える事ができるかについて検証する。

2. 研究の目的

がん転移における臓器特異性とがん間質の関係を明らかにするには特定の臓器に原発巣を持つがん細胞と原発巣でのがん間質細胞、そして特定の転移臓器にくり返し転移する変異型のがん細胞及びその特定臓器から樹立されたがん間質細胞の特徴を比較する必要がある。これらを実験的に確立するためまずマウス個体が必要であり、間質細胞の樹立時に有用な細胞選択用の薬剤耐性因子を細胞レベルで発現しているマウスを作成し、その遺伝子発現を解析する。

3. 研究の方法

まず CAF 特異的な分子の候補として我々の研究室で報告した Asporin/ASPN を調べた。プロモーター解析を行うために内在性に安定して ASPN を発現する細胞株を選択していたが、市販の抗体が Discontinued になってしまった。数社の抗体を購入し、当方で飼育している ASPN KO マウスの発現を調べたが市販の抗体でマウス ASPN を正確に認識するものは無かった。また他の可能性について明らかになった事から ASPN を CAF 因子として捉えなくなった。

次に同じく CAF 特異的な分子の候補として考えられた TGFBI 分子の発現解析、及びプロモーター解析を行った。

線維芽細胞における発現と最小プロモーター配列を明らかにしたためトランスジェニックマウスの作成を行った。トランスジェニック開発経験のある動物飼育施設スタッフが異動してしまつたため細胞特異的なプロモーターのみでのトランスジェニックマウス開発は断念し、将来的に TGFBI プロモーター特異的なマウスに改変できるようにした全身レポーター発現コンストラクトを開発し、マウスを作成した。

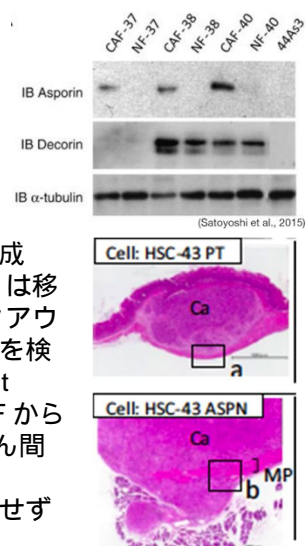
ヌードマウスと交配し、担がんマウスを作成できるようにした。

レポーター発現マウスの組織から初代細胞株を樹立し含まれる細胞の種類を調べた。

4. 研究成果

ASPN 遺伝子発現とその役割の解析

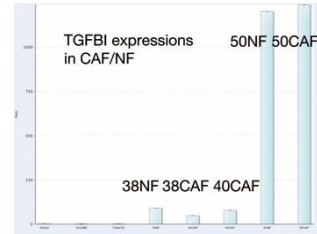
ASPN 遺伝子は CAF にリッチに含まれる事を当研究室で報告した (Satoyoshi et al., 2015) (右図 CAF: cancer associated fibroblasts, NF: normal fibroblasts) mRNA の発現を多くのがん細胞で調べたが骨肉腫細胞株の MG63 細胞のみが強く発現していた。しかしながらタンパク質の発現は確認できなかった。HSC43 胃がん細胞株に内在性の ASPN 発現は認められなかったが、過剰発現株を作成し、その変化を調べた。In vitro においてがん細胞に発現した ASPN は移動と浸潤を上昇させ活性酸素 (ROS) の影響を軽減させた。ASPN ノックアウトマウスに ASPN 過剰発現がん細胞を移植し、がん細胞における役割を検証したところ腫瘍径の増加とより深層への浸潤が高まった (Sasaki et al., 2021) さらに ASPN はがんから NF への働きかけだけではなく CAF から NF への炎症反応の拡散にも関与している事が明らかになり新しいがん間質ニッチの形成機構として論文を投稿中である (Itoh et al., under review)。前述の通り、市販の抗体で唯一ノックアウトマウスに反応せず



ヒト・マウス細胞株でタンパクを認識する抗体が Discontinued になってしまったため限られた量の抗体しか残されておらず他の標的を用いた計画にシフトする事にした。

TGFBI 遺伝子発現とその転写の解析

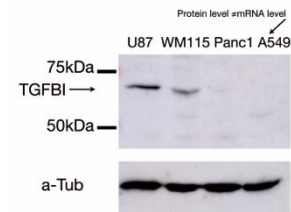
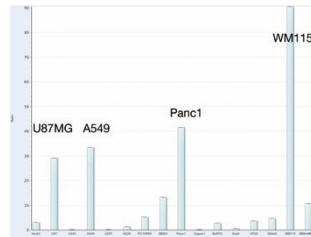
TGFBI 遺伝子は A549 肺がん細胞において TGF-β によって刺激すると発現が上昇する Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) 関連遺伝子である。主に mesenchymal cell で発現が認められるため、腫瘍組織において間質にも発現している (Unpublished observations)。この事から CAF を含むがん間質での発現が見られるのでは無いかと考え、その発現をプロファイルした。



その結果、複数の NF/CAF セットで同等に発現していた。しかしながら、実験モデルとして CAF が形成される以前に薬剤耐性遺伝子が十分量発現していないようでは臓器特異性を担う分子を取り逃がしてしまうかもしれない。この事から間質すべてをラベルできるマウスを作成する事にした。

【プロモーター解析】

Fibroblast におけるプロモーター解析はその細胞の状態に依存して安定しない。そのため複数のがん細胞においてその発現を解析することにした。mRNA 発現は U87MG (神経膠芽腫) A549 (肺腺がん), Panc1 (膵臓がん), WM115 (メラノーマ)

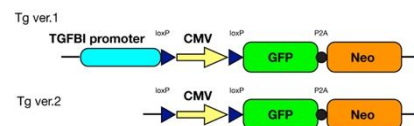


で確認された。タンパク発現も調べたところ、U87MG と WM115 では mRNA とタンパクの両方が検出されたものの A549 や Panc1 ではタンパクの翻訳が著しく阻害されている事が見いだされた。このため U87MG を用いてプロモーターを解析することが妥当であろうと判断した。ルシフェラーゼアッセイを用いたプロモーター解析の概要を右図に示す。概略図で示した通り、Exon1 近傍-700bp がミニマルプロモーターであると考えられた。(右図: D 0.7kb)



トランスジェニックマウスの作成

ノックアウトマウスの作成と異なり、トランスジェニックマウスの作成には胚操作にかなりの習熟を要する。当初秋田大学の動物実験部門でトランスジェニックマウスの作成を行う予定であったが、担当者が異動になってしまった為、新たにトランスジェニックマウス作成の各工程を確認しながら進めて行く必要が生じた。この為、全身に GFP を発現させインジェクション技術の成功度を確認する事にした。しかしながら、後で TGFBI 特異的な発現が必要になった時のためにプロモータと GFP-P2A-Neo (self cleavage により GFP と Neomycin 耐性遺伝子が同時にタンパクとして発現するカセット) の間に loxP-CMV-loxP のカセットを挿入し、将来的には全身 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配すると TGFBI-GFP-Neo にすることができるようにコンストラクトを設計し直した。Tg ver1 のコンストラクトでトランスジェニックマウスを作成した時は効率が非常に悪かった為、さらに TGFBI プロモーターを持たない全身 Tg マウスを作成する事にした。これでは間質にのみ遺伝子を発現させる事はできないが腫瘍を構成する間質細胞を丁寧に切り出す事ができれば複数の種類の間質プールを得る事ができる。

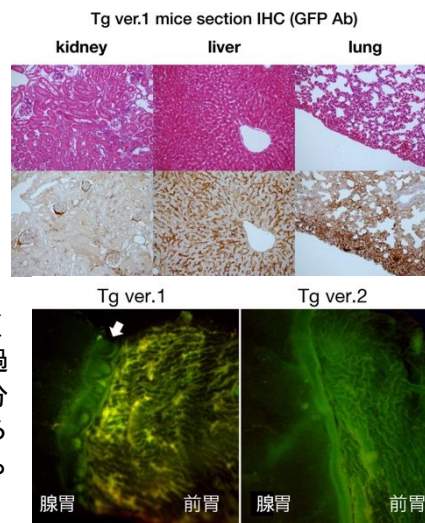


【トランスジェニックマウスの発現解析】

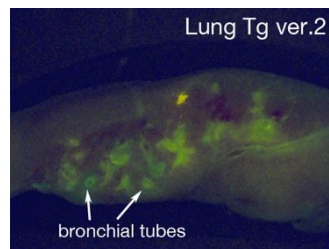
ヌードマウス x トランスジェニックマウスの作成

【定常状態における Tg マウスの GFP 発現】

上記の通り TGFBI プロモーターを持つマウスを Tg ver.1, CMV のみのマウスを Tg ver.2 とする。これらマウスの定常状態(がん移植なし)の状態での発現を調べた。Tg ver.1 では発現は特定の領域のみに限定されており、腎臓ではポドサイト、肺では中皮細胞に比較的強く発現が見られ、肝臓では非特異的に染色が観察された。胃では Tg ver.1,2 とも前胃の方が強く蛍光が観察されたが、それは構造的に励起波長を透過しやすい事が関係している。しかし腺胃との境界部分に未同定の構造に GFP が集中(右図 矢印)しているので興味深い。胃の分化マーカーで染色するなどさらなる解析が必要である。



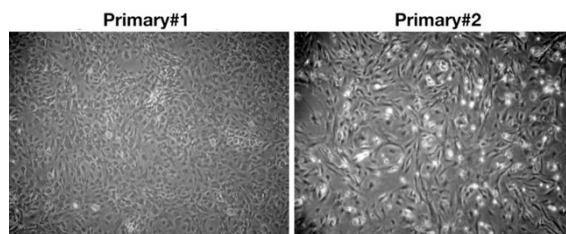
Tg ver.2 の肺を観察したところ全体に発現している事を予想していたが気管支に強い蛍光が見られた。(右図)



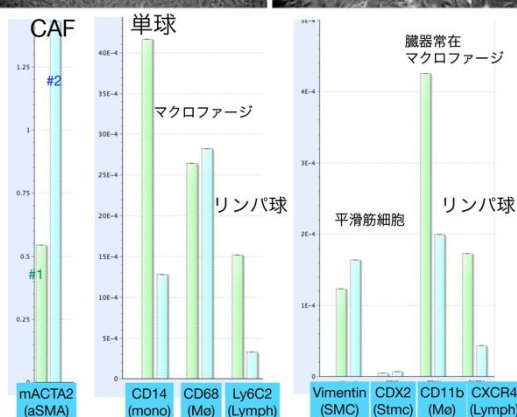
これらの事から C57BL6 における Transgenic は正常に機能しているものと考えられた。Balb/c nu/nu がヌードマウスとして一般的に使われる系統であるが、Balb/c 系統は産仔数が少なく子育ても下手なのでそこがボトルネックになる可能性がある。そこで CD-1 (ICR 近交系) の FoxN1 ノックアウトマウス (ヌードマウスの遺伝子変異と同じ) と B6-Tg マウスを交配し、ヒト腫瘍細胞を移植可能な担がんマウスを作成する事ができるようにした。いくつかの細胞を移植した結果、Balb/c で生着した細胞が必ずしも生着しない事が分かった。細胞数を増やすなど様々な解決策を模索中である。

胃組織からの間質細胞の単離

Tg ver.2 はほぼユニフォームに GFP が発現していた。切除した胃組織から初代培養を行い薬剤耐性遺伝子によって細胞を選択する事が可能かどうかを検証した。



結合組織をコラゲナーゼで分解し、低浸透圧処理後高速で遠心分離して血球細胞を取り除いたのち、低速で遠心した上澄みに残るの細胞を回収したもの(1)とその細胞ペレットを接着条件で培養したものを(2)これらを初代培養し、高グルコース DMEM 培地で維持できることを確認した。さらに選択用の抗生物質を添加し、GFP-P2A-Neo を発現していない細胞を死滅させ安定して増殖するようになった間質細胞から RNA を抽出し予想される自然免疫細胞などの細胞マーカーと線維芽細胞マーカーを用いて比較検証をおこなった。その結果(1)は単球細胞とマクロファージマーカーが多く



含まれており、(2)はがんを移植していないものの線維芽細胞マーカーと CAF のマーカーである aSMA/ACTA2 を発現していた。これにより複数の細胞系譜を回収することができると考えられた。しかしながら、胃の上皮細胞のマーカーと考えられる CDX2 はほとんど検出されてない。薬剤選択によって死滅したか、胃スフェロイド作成時には Wnt, Noggin, Thrombospondin, Jagged などいくつかの成長因子を加える必要があるので単純な Dish 上の培養では生着しない可能性は高い。

今後の研究課題

担がんマウスの作成と細胞回収の検討

代表的な免疫不全マウスが Balb/c nu/nu である。Nu 変異は FoxN1 遺伝子の点突然変異であり、今回用いた CD-1, FoxN1tm や KSN 系統は同様に無毛の胸腺欠損マウスであり B 細胞を欠損しているためヒトがん細胞の移植に適しているとされている。しかしながら実際には Balb/c に生着していた細胞が同じ個数では生着しないという表現形が頻繁に起こる。この為、これまでに確立した臓器特異的転移細胞の研究が思うように進まなかった。容量を変え、注入方法を変える事によって生着する条件を再設定して取り組みたい。

初代培養の標準プロトコルの確立

初代培養の方法は腸オルガノイド作成方法を参考にして行っている。当初は CAF を念頭においていたため基質接着を利用して細胞を回収した。しかし本当は基質接着を起こさない単球細胞やマクロファージが Dish 接着細胞として回収された。Tg ver.2 のようなブロードな発現カセットを用いて実験を行う以上、様々な細胞が回収される(上図参照)中には浮遊細胞や臓器内で機能を持つ細胞の集まりで構成される構造があるので、上記の通りスフェロイドのまま回収する事で腫瘍環境をそのまま維持する事や浮遊細胞のみを集めるなど様々なアプローチを用いて重要な因子を取り漏らさないようにしなければならない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Sasaki Yuto, Takagane Kurara, Konno Takumi, Itoh Go, Kuriyama Sei, Yanagihara Kazuyoshi, Yashiro Masakazu, Yamada Satoru, Murakami Shinya, Tanaka Masamitsu	4. 巻 112
2. 論文標題 Expression of asporin reprograms cancer cells to acquire resistance to oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1251 ~ 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14794	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 Umakoshi Michinobu, Takahashi So, Itoh Go, Kuriyama Sei, Sasaki Yuto, Yanagihara Kazuyoshi, Yashiro Masakazu, Maeda Daichi, Goto Akiteru, Tanaka Masamitsu	4. 巻 38
2. 論文標題 Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2162 ~ 2176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0564-x	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 Shimazu K, Inoue M, Sugiyama S, Fukuda K, Yoshida T, Taguchi D, Uehara Y, Kuriyama S, Tanaka M, Miura M, Nanjo H, Iwabuchi Y, Shibata H.	4. 巻 109(10)
2. 論文標題 Curucumin analog, G0-Y078, overcomes resistance to tumor angiogenesis inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3285-3293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13741.	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 Kuriyama S, Tsuji T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka M	4. 巻 4
2. 論文標題 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetro-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 11-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-017-0006-5	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 Itoh Go, Ikeda Masanori, Iemura Kenji, Amin Mohammed Abdullahel, Kuriyama Sei, Tanaka Masamitsu, Mizuno Natsuki, Osakada Hiroko, Haraguchi Tokuko, Tanaka Kozo	4. 巻 8
2. 論文標題 Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 00-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22164-5	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗山 正 田中 正光
2. 発表標題 PEDFは骨肉腫の溢出と再組織化に必要である
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 栗山 正
2. 発表標題 骨肉腫細胞株におけるPEDFの過剰発現は膜透過性を上昇させ転移を促進する
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 栗山 正
2. 発表標題 骨肉腫由来細胞株を用いた臓器親和性関連遺伝子の探索
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 Sei Kuriyama
2. 発表標題 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax/Bak hetero-oligomerization through the interaction with Bid in human colon cancer
3. 学会等名 Cell and Developmental Biology Meeting
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------