

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06822

研究課題名(和文) がん遠隔転移における集団的細胞遊走の優位性の検証

研究課題名(英文) Investigation for the superiority of collective cell movement upon the distant metastasis

研究代表者

栗山 正 (Kuriyama, Sei)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30398226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：上皮性癌の細胞間接着性の減少は多くの場合、転移・浸潤を促進する。先行研究では集団的に移動する改変肺がん細胞は元の株よりも遠隔転移を促進する事を報告した。本研究では骨肉腫という間葉系のがん細胞を用い、遠隔転移における接着性の変化の影響を明らかにしようとした。実験的に肝・腎臓に転移するように誘導したがん細胞では接着分子の変化が認められた。また元株との遺伝子の網羅的解析を用いた比較ではこれまで抗癌作用を期待されていた分子(PEDF)が過剰発現していた。元株にPEDFを発現させた株はカドヘリン種の変化を引き起こし、膝関節から血流に乗り、肝臓・腎臓に転移した。メカニズムについて調べたので報告する。

研究成果の概要(英文)：Loss of cell-cell adhesion from epithelial cancer often promotes infiltration and metastasis. In our previous report, the modified lung cancer cells, which has stable cell-cell adhesions, actually promote the dissemination to the opposite lungs. In this study, we planned to clarify how the changes of cell-cell adhesion properties affected on the ability of the distant metastasis. The sub-cell lines experimentally induced metastatic characteristics to liver and kidney changes various cell adhesion molecules. Also gene profiling of these sub-cell lines and the parental cells revealed that PEDF gene was upregulated, which was formerly expected as the anti-cancer drug. We made the parental cell line overexpressing PEDF, and tested gene expression, cell migration, and in vivo metastasis. The cells injected into knee joint produced the primary lesions orthotopically, and metastasized to liver and kidney too. We further researched the unexpected mechanism about PEDF-induced metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：浸潤・転移

## 1. 研究開始当初の背景

発生生物学の研究より、神経堤細胞の移動前・移動後の変化には細胞接着分子の発現変化を伴う事が分かっている。発生のみならず癌を含む全ての生物学的事象で E-カドヘリンから N-カドヘリンへの変化は上皮間充織遷移として知られており、癌生物学においても特に転移・浸潤のきっかけとなるため、研究が続いている。しかしながらカドヘリン種の変化は E から N だけではなく、例えば前述の神経堤細胞では N-カドヘリンから OB-カドヘリン (CDH11) への変化が見られる。研究代表者はこの N- to OB-の変化と細胞の集団移動能の変化について注目した。N-カドヘリンで接着された細胞シートは集団的に移動する。しかし OB-カドヘリンを発現する頃にはより単独の細胞として移動するようになる。実際、OB-カドヘリンにはホモフィリックな結合活性はほとんど見られない。OB-カドヘリンの OB とは osteoblast の事で骨芽細胞に発現するカドヘリンである。頭部神経堤細胞は顔面の骨格を形成するので骨形成に参与するカドヘリンが発現する事は不思議では無い。ここで癌細胞における N 及び OB-カドヘリンの発現を調べてみた。すると骨肉腫由来の細胞株グループで N-カドヘリンと OB-カドヘリンを両方、もしくは片方のみ発現する細胞株が複数得られた。この基礎データを元に集団移動のがん転移における優位性と細胞接着因子カドヘリンの E to N 以外の種の変化における影響について調べてみようと考えた。

## 2. 研究の目的

がんの遠隔転移において細胞の集団化は広範囲または他臓器への転移にがんから見ると有利になる戦略なのだろうか？それともがんを制する側から見て与しやすい相手になるのだろうか？細胞生物学的に見れば細胞の集団化は一度に多くの細胞を明確な方向性を持って移動させる大変効率の良い手段である。しかしながら生体内における様々な微小環境をそれを簡単には許さない。がんにおいては脈管性転移をするには臓器内のがん組織から臓器を出て、血管などの壁をすり抜け (intravasation) 血流などに乗り、組織周辺に到着すると再び血管の壁をすり抜け (extravasation) 細胞は再集合し転移病巣をつくる。通常このように考えられてきたが、先行研究により細胞接着を維持したまま組織のフレキシビリティを上昇させるシステムが存在することを示した (Kuriyama et al., 2014) (新学術領域研究) ことから血管などの立体狭窄部においても細胞接着を維持することにメリットがあるのではないかと考えるようになった。これらの事からがんは遠隔転移において実験的に細胞の集団化をいっどこで必要とするのかを明らかにすること

が目的となった。

## 3. 研究の方法

骨肉腫由来高転移株 Hu09-M132 は OB-cad+ N-cad-、別の高転移株 143B は N-cad+, OB-cad- であるという予備的実験結果があったが、予備実験と初年度に用いていた OB-カドヘリン抗体には特異性に問題があった事が発覚した。再検討の結果 143B は N-カドヘリン、OB-カドヘリン共に陽性であり、モデルを満たす細胞株とは言い難い細胞であった。さらに Hu09 由来細胞株に様々な方法で遺伝子導入を行ったが、トランスジェニック株を作らない細胞株であった。143B は過去の文献によると皮下にできた腫瘍からも肺転移を起こすとされた (He らのグループからの 1 本の論文) が、他のグループから報告された論文では肺転移は見られなかったとされている。我々は細胞株バンクから 143B 細胞を入手し、ルシフェラーゼレポーターを発現する細胞株を作成した。ルシフェラーゼによる発光イメージングを駆使すればがんの微小な転移を検出する事ができる。我々が構築した 143B+mCherry-IRES-luc2 株は膝関節に注入しても皮下注射からも肺への転移は認められなかった。心臓に細胞を注入し、血流に強制的に乗せた際には他の臓器には一切シグナルが認められないものの副腎組織のみ生着・転移病巣を作るというこれまで報告されていない表現形を示す事が分かった。

## 4. 研究成果

1. 骨肉腫由来細胞株 143B を元に作成した肝臓・腎臓転移株とリンパ節転移株の遺伝子プロファイリング

143B は骨肉腫細胞株 HOS を K-Ras でトランスフォームして作成された細胞株である (Kim et al., 2002)<sup>1</sup>。皮下注射によりヌードマウスなどの免疫不全動物に生着するものの、骨肉腫によく見られる肺転移などは示されていなかった。しかしながら He らのグループによって 143B 株の高転移性が示され、皮下から肺への転移も報告された (Luu et al., 2005)<sup>2</sup>。この論文に従い、高転移性を用いて転移と集団移動の関係を明らかにしようと考えた。143B に mCherry-IRES-luc2 をレンチウイルスを用いて導入し、細胞株を樹立した。143B+mCherry-IRES-luc2 はルシフェラーゼを用いたイメージングで微量の細胞レベルでの転移を検出することができる。この株をヌードマウスの膝関節に注入したが原発巣が肥大化するのみで転移能を持たなかった。さらに Scid マウスを用いてより免疫寛容な条件で移植を起こしたが、それでも原発巣がより大きくなったのみで転移が検出されなかった (図 1)

そこで手法を変え、心臓への注射を行ったところ、腎臓への転移は見られなかったが副腎

への細胞の集積が見られた(図2)この細胞株を元に高転移株を作成しようと考えた。

図1

Scid マウスに移植した骨肉腫細胞株 143B をルシフェラーゼ発光を用いて検出したもの (Day 42) 原発巣に相当する腫瘍は大きくなっているが他の組織に転移は見られない

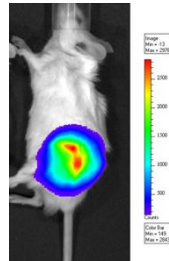


図2

143B 心臓内注射により副腎領域に転移、腫瘍を形成した (左)ルシフェラーゼ検出 (右)腫瘍化した副腎

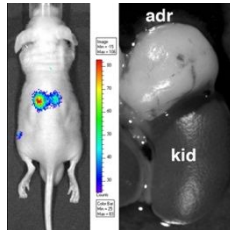
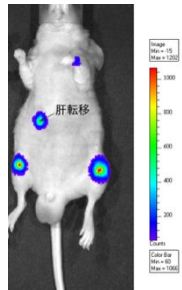


図3

143Bkid 心臓注射後 15 日目

膝関節への正所的な転移と肝臓領域への転移が認められる



\*\*\*\*\*

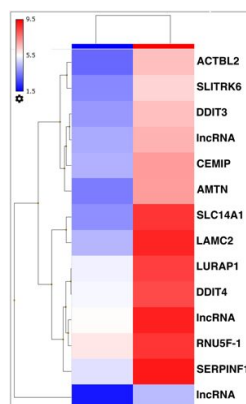
143B+mCherry-IRES-luc2 を心臓に注射し、Day28 まで経時的に観察したところ微小な転移巣が形成された。それらの転移巣を個別に切除し、トリプシンで分解したのち、ルシフェラーゼベクターを挿入時に用いた薬剤耐性を利用して、腫瘍組織に付随する正常組織を排除して癌細胞だけを単離した。これをさらに培養して心臓注射を繰り返し、同じ病巣を作成した株を単離する方法で肝臓・腎臓に特異的に転移する 143Bkid, リンパ節に転移する 143Blymph を作成した。これらの細胞株は Day15 ですでに転移するように変化した(図3)。これらの事から遺伝子の変化は固定されたと考えて、培養条件下での定常的な遺伝子発現変化をマイクロアレイで比較した(図4)。遺伝子発現変化の解析

図4

143Bkid (右) の 143B(左) に対する発現量の網羅的比較

ACTBL2, SLITRK6, DDIT3, IncRNA, CEMIP, Amelotin, SLC14A1, LuRAP1, DDIT4, IncRNA2, RNU5F-1, SerpinF1, IncRNA3(変動率上位)

SLC14A1, LAMC2, SerpinF1 が最も変動率が高かった。



Affimetrix (Human\_gene 2.0)を検索した結果、SLC14A1 (urea transporter)、LAMC2 (laminin C2)、SerpF1/Pigment Epithelium derived factor、DDIT4、Amelotin、CEMIP、LURAP1、Slit6 が 143B に対し、143Bkid で大きく変動しており、かつ 143Blymph に対しても 143Bkid で大きく変動している遺伝子として抽出された。

カドヘリンファミリーの変化

カドヘリンとプロトカドヘリンのみを抽出したリスト(図5)で N-cadherin, K-cadherin(kidney), R-cadherin(retina)の変動率が大きい事が明らかになった。

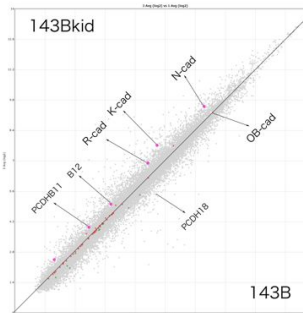


図5 スキャッタープロットにおけるカドヘリン(接着分子)群の分布

X軸が 143B の発現量 Y軸が 143Bkid の発現量を示している。OB-cad は中心線上に存在するので遺伝子の変動は低い N-cad, K-cad が 143Bkid で増加している

結果の validation

マイクロアレイの結果を踏まえ、蛋白レベルでの発現、及び mRNA レベルでの発現を確認する作業を行った。すると CEMIP, LURAP1 の発現は定量 PCR で再現されなかった。SerpF1, Amelotin, Slit6, DDIT4 の 4 遺伝子に関してはマイクロアレイと定量 PCR の間で矛盾のある点は無かった。ウェスタンプロットで N-cadherin, OB-cadherin の発現や各遺伝子の発現の確認を試みた。その結果、Amelotin, DDIT4 の蛋白レベルでの増減は認められなかった。

SerpF1/PEDF の機能的 validation

残す候補分子として SLC14C, LAMC2, SerpinF1, Slit6 が挙げられた。SLC14C は Urea Transporter であり、Liver 及び Kidney の細胞膜表面にあることが報告されており、組織特異性を考える上では大変興味深い。LAMC2 は発現が亢進した癌細胞の浸潤・転移能が上昇することが報告されており、重要な変化であるが、骨肉腫としての特異性や臓器選択性、集団的移動性には関与しない事が予想された。また cDNA のサイズが大きく、発現していない株に発現させる手法が取れないので今回の機能解析には用いられなかった。Slit6 は現在なお機能解析中である。そこで本研究では SerpinF1/PEDF に注目し、さらなる解析を行った。

PEDF は網膜変性症において血管新生を阻害し、治療薬として期待されている。がんにおいても血管新生を阻害できるため、治療効果が期待されている。しかしながら PEDF は複数の機能ドメインを持つ分泌型の分子であ

り(Murray & Ma, 2010)<sup>3</sup>、血管新生を阻害する N 末 33mer とは異なる中央部分の 40mer は ROS(reactive oxygen species:活性酸素)誘導されるアポトーシスを軽減する事が示されている(Gao et al., 2014)<sup>4</sup>。このため骨肉腫由来高転移株において内在性 PEDF が転移巣でのみ上昇する理由は定かではない。我々が 143B 株に PEDF を発現させたところ、N-cadherin の発現が亢進しており、143B から 143Bkid での遺伝子変化の責任遺伝子になっている可能性が考えられた(図6)。



143B+PEDF 細胞の解析  
143B+PEDF の心臓注射の結果、副腎転移を経ずに腎・肝臓転移を引き起こす事が示され、143Bkid と似た傾向を示した。そこで 143B は膝関節から臓器に転移しなかったが、143B+PEDF は転移能を上昇させることができるかについて検討した。その結果、Day72 において 143B+PEDF の肝臓と腎臓への転移が確認された(図7)。

血管の周りに転移巣が出来る事により血液の循環が起こらず、低酸素状態が形成されており、個々の癌細胞の移動能は減少するとは限らず HIF1 の発現が誘導されることで浸潤能が上昇することも考えられる。PEDF が持つ血管内皮形成阻害作用が新生血管を阻害することは必ずしもがん転移の抑制にはつながらないという事が新たに示された。今回の主題である細胞接着性と遠隔転移との関係は今回の実験によって作成されたがんが血管壁を阻害する活性を獲得したため、時空間的な集団化の必要性を明らかにするには至らなかった。しかしながら膝関節から脈管に侵入して臓器転移に至るまでにはかなりの時間を要している。やはり血管に入る、出るというステップには集団化は阻害的に働くと考えられるが、元の株は転移しない事からも腫瘍細胞の臓器への生着・再集合には有利に働いているとも考えられる。本研究期間は終了するが、引き続き集団化と転移の関係を明らかにし、転移を制御する方法を開発できるように様々なアプローチを駆使して研究を進めていく。

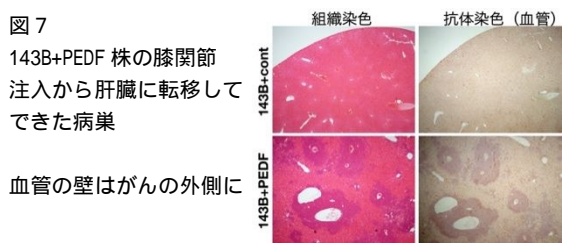


図7 143B+PEDF 株の膝関節注入から肝臓に転移してできた病巣  
血管の壁はがんの外側に

あり、脈管内のスペースが癌により大きく肥厚していて血管の形成は阻害されている。

2. 低酸素誘導因子 PLEKHN1 を用いた細胞死の視覚化プローブの作成  
PLEKHN1 は当初の計画にあった N-cadherin と OB-cadherin 間のカドヘリンスイッチに關与することが考えられている胚発生過程の神経堤細胞に特異的に発現する遺伝子であり、骨肉腫における発現も確認されている。神経堤細胞が低酸素に反応して安定化する HIF1a の発現によって誘導されることから PLEKHN1 の発現機構について調べたところ低酸素に反応して発現が上昇する遺伝子であり、低酸素マーカーとして働く可能性を検討した。PLEKHN1 ノックアウト細胞に GFP-PLEKHN1 を発現させて細胞にストレスを与えたところ、ストレス応答で蛋白が凝集することを見出した。さらに細胞死誘導因子である Bid を中心に Bax, Bak と相互作用し、いち早く細胞死を検出できる可能性を示した。(発表論文1) 今後は様々な細胞種でストレスにตอบสนองすることをモニターするプローブとして使う事ができるかを検証していく。

References

1. Kim EM, Sivanandham M, Stavropoulos CI, Wallack MK (2002) J Surg Res 108:148-
2. Luu HH, Kang Q, Park JK, Si W, Luo Q, Jiang W, Yin H, Montag AG etc. (2005) Clin Exp Metastasis 22: 319-329
3. Murray AR, Ma JX (2010) Cancer Biology and Therapy 9: 975-977
4. Gao X, Zhang H, Zhuang W, Yuan G, Sun T, Jiang X, et al (2014) Sci Rep 4:5637

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 5 件)

1. Kuriyama, S., Tsuji, T., Sakuma, T., Yamamoto, T. and Tanaka, M. (2018). PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetero-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer. *Cell Death Discov* 4, 11 doi: 10.1038/s41420-017-0006-5. eCollection 2018 査読有り
2. Itoh, G., Ikeda, M., Iemura, K., Amin, M. A., Kuriyama, S., Tanaka, M., Mizuno, N., Osakada, H., Haraguchi, T. and Tanaka, K. (2018). Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment. *Sci Rep* 8, 3888. doi: 10.1038/s41598-018-25175-4 査読有り

3. **Goto, A., Tanaka, M., Yoshida, M., Umakoshi, M., Nanjo, H., Shiraiishi, K., Saito, M., Kohno, T., Kuriyama, S., Konno, H. et al.** (2017). The low expression of miR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases. *PLoS One* **12**, e0181270. doi: 10.1371/journal.pone.0181270. eCollection 2017 査読有り
4. **Tanaka, M., Kuriyama, S., Itoh, G., Maeda, D., Goto, A., Tamiya, Y., Yanagihara, K., Yashiro, M. and Aiba, N.** (2016). Mesothelial Cells Create a Novel Tissue Niche That Facilitates Gastric Cancer Invasion. *Cancer Res* **77**, 684-695. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0964. 査読有り
5. **Kuriyama, S., Tamiya, Y. and Tanaka, M.** (2016). Spatiotemporal expression of UPK3B and its promoter activity during embryogenesis and spermatogenesis. *Histochem Cell Biol.* doi: 10.1007/s00418-016-1486-8. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 2018 June 6 Joint annual meeting of JSDB 51<sup>st</sup> and JSCB 70<sup>th</sup>  
Sei Kuriyama (oral presentation)  
 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax/Bak hetero-oligomerization through the interaction with Bid in human colon cancer
2. 2017 Sept 30 The 76th Annual meeting of the JCA  
栗山 正 (口頭発表)  
 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetero-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer
3. 2016 Oct 8 The 75th Annual meeting of the JCA  
Sei Kuriyama, Yuutaro Tamiya, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Masamitsu Tanaka (oral presentation)  
 PLEKHN1 is required for Bax oligomerization in cancer cell line

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：  
 〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗山 正 (KURIYAMA, Sei)

秋田大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30398226

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )