

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15106

研究課題名(和文) Crkアダプター分子を用いた幹細胞・EMTヘテロジェナイティーモデルの作製

研究課題名(英文) Analysis of heterogeneity of tumor stem cells and EMT using Crk adaptor protein

研究代表者

津田 真寿美 (Tsuda, Masumi)

北海道大学・医学研究科・講師

研究者番号：30431307

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)：組織多様性(ヘテロジェナイティー)を伴うがんは、治療標的が絞りにくく治療に難渋する。治療成績の向上には、腫瘍ヘテロジェナイティ獲得機序を解明し、それを解除する戦略が有用である。本研究では、ヒト膀胱癌細胞株においてCrkの発現が亢進していること、Crkはエクソソーム内でのErbB2の発現量を増加させること、筋層浸潤性膀胱癌のエクソソームで処理したレシビエント細胞(血管内皮細胞、非浸潤性膀胱癌細胞株)ではErbB2の発現量が増加し増殖能や浸潤能が亢進すること、Crkはエクソソームを介して腫瘍原発巣のみならず転移先臓器のヘテロジェナイティを創出し、癌の浸潤・転移を亢進させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We unveiled a novel function of CRK adaptors via exosomes in tumor progression and metastasis in invasive bladder cancer (BC). CRK is overexpressed in invasive UM-UC-3 BC cells, and CRK knockdown downregulated the expression of ErbB2. In an orthotopic xenograft model, metastases to lung, liver, and bone of UM-UC-3 cells were completely abolished by CRK elimination. Mass spectrometry analysis identified that ErbB2 is contained in UM-UC-3-derived exosomes, which significantly increased proliferation and invasion of low-grade 5637 BC cells and HUVECs. In athymic mice educated by UM-UC-3-derived exosomes, intravenously implanted UM-UC-3 cells developed lung metastasis with increased tumor angiogenesis, whereas exosomes with CRK depletion could not. In conclusion, CRK adaptors contribute to tumor heterogeneity of invasive BC via exosome, resulting in the tumor progression and metastasis.

研究分野：実験病理学

キーワード：エクソソーム CRK 浸潤 転移 腫瘍ヘテロジェナイティ

1. 研究開始当初の背景

組織多様性(ヘテロジェナイティ)を伴うがんは、治療標的分子が絞りにくく治療に難渋する。治療成績の向上には、腫瘍ヘテロジェナイティ獲得機序を解明し、それを解除する戦略が有用である。我々は、先行研究により、シグナル伝達アダプター分子 CRK が下流シグナル分子を時空間的に制御することにより、がん幹細胞性と上皮間葉移行(EMT)の2つの異なる細胞動態、即ちヘテロジェナイティを創出することを見出した。これまで CRK は、様々な癌種で細胞の増殖や運動、接着能など浸潤や転移に関与していることが報告されている。

近年、バイオマーカーや細胞間コミュニケーションツールとしてエクソソームが注目されている。エクソソームは細胞から分泌された脂質二重膜で形成される微小な細胞外小胞である。内部には様々なタンパク質や核酸物質が含有されており、細胞間の情報伝達や癌の転移先の微小環境の調整など、癌の浸潤・転移において重要な役割を担っている。

2. 研究の目的

本研究では、エクソソームが制御する癌の浸潤・転移機構において、CRK がエクソソームの形成、内包物の組成、腫瘍の浸潤(EMT)やヘテロジェナイティ、および転移巣形成能力に及ぼす影響を解析することを目的とする。最終的に、CRK による癌のヘテロジェナイティ創出メカニズムを明らかにし、それを解除する治療薬あるいは治療方法を構築する。

3. 研究の方法

(1) ヒト筋層浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC-3 を用いて、shRNA により CRK ノックダウン細胞株(CRKi)およびコントロール細胞株を樹立した。

(2) 上記で樹立した各細胞をマウスの膀胱内へ同所移植し、組織浸潤や転移巣形成を IVIS Spectrum で追跡した。

(3) CRKi およびコントロール細胞において、細胞およびエクソソームレベルで内包分子の量を比較した。また、それぞれのエクソソームをレシピエント細胞(低浸潤性膀胱癌細胞株 5637 及び血管内皮細胞 HUVECs)に取り込ませることで形質変化を検討した。

(4) *in vivo* マウス実験として、CRKi およびコントロール細胞由来エクソソームで予め免疫不全マウスを 2 週間教育(education)した後、親株 UM-UC3 細胞を尾静脈投与して、転移巣の形成を追跡した。さらに、転移先組織の腫瘍血管新生に関するヘテロジェナイティを検討した。

4. 研究成果

【研究の主な成果】

(1) ヒト浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC-3 を用いて、shRNA により CRK ノックダウン細胞株およびコントロール細胞株を各 3 株樹立した。ノックダウン効率は、Western blotting を用いて蛋白質レベルで確認した。

(2) 親株およびコントロール UM-UC-3 細胞を免疫不全マウスの膀胱内に同所移植すると、経時的に膀胱原発巣が増大し、移植 5 週間後には肺・肝臓・骨に転移巣が確認された。一方、CRK ノックダウン細胞を移植したマウスでは転移巣は形成されなかった。

(3) CRK ノックダウン細胞ではコントロール細胞株に較べて、細胞およびエクソソームレベル共に ErbB2 の発現量が低下し、腫瘍の浸潤や転移が抑制された。

コントロール細胞由来のエクソソームをレシピエント細胞(低浸潤性膀胱癌細胞株 5637 及び血管内皮細胞 HUVECs)に取り込ませると、レシピエント細胞内の ErbB2 の発現量が増加し、増殖能や浸潤能が上昇したが、CRKi 細胞由来では抑制された。一方、CRK ノックダウン細胞由来のエクソソームを投与すると、それらの上昇は認められなかった。

(4) コントロール細胞由来エクソソームで予め教育(education)されたマウスでは肺の転移巣形成が促進されたが、CRKi 細胞由来では抑制された。また、コントロール細胞由来エクソソーム細胞で education されたマウスの肺では、肺胞構造が乱れ、腫瘍血管新生が亢進していたが、CRKi 細胞由来エクソソームではそれらの所見は認められなかった。

【考察】

ErbB2 が過剰発現している膀胱癌は浸潤や転移をきたしやすく、予後不良であることが報告されている。本研究により浸潤性膀胱癌細胞では CRK シグナルを介して ErbB2 の発現量が増加し、腫瘍細胞自体の増殖や浸潤を亢進させるとともに、そのエクソソームに含有される ErbB2 が予め伝達されることで転移先臓器細胞の形質転換(ヘテロジェナイティ)を誘導し、膀胱癌の浸潤や転移を促進することが示唆された。

【結論】

CRK はエクソソームを介して腫瘍原発巣のみならず転移先臓器のヘテロジェナイティを創出し、癌の浸潤・転移を亢進させることが明らかとなった。CRK あるいは ErbB2 を治療標的分子とすることで腫瘍の増殖・浸潤・転移を抑制し、予後の改善が期待できると示唆される。

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 15 件)

1. Kato M, Nishihara H, Hayashi H, Kimura T, Ishida Y, Wang L, Tsuda M, Tanino MA, Tanaka S. : Clinicopathological evaluation of Sox10 expression in diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Med Oncol*. 34: 8, 2017. DOI: 10.1007/s12032-016-0865-2(査読有)
2. Matsumoto R, Tsuda M, Yoshida K, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Abe T, Shinohara N, Nonomura K, Tanaka S. : Aldo-keto reductase 1C1 induced by interleukin-1b mediates the invasive potential and drug resistance of metastatic bladder cancer cells. *Sci Rep*. 6: 34625, 2016. DOI:10.1038/srep34625. (査読有)
3. Inamura N, Kimura T, Wang L, Yanagi H, Tsuda M, Tanino M, Nishihara H, Fukuda S, Tanaka S. : Notch1 regulates invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma by inducing EMT through c-Myc. *Auris Nasus Larynx*, 2016. DOI:10.1016/j.anl.2016.08.003. (査読有)
4. Yuzawa S, Nishihara H, Yamaguchi S, Mohri H, Wang L, Kimura T, Tsuda M, Tanino M, Kobayashi H, Terasaka S, Houkin K, Sato N, Tanaka S. Clinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical-sequencing system. *Mod Pathol*, 29, 708-716, 2016. DOI:10.1038/modpathol.2016.81. (査読有)
5. Kawano S, Grassian AR, Tsuda M, Knutson SK, Warholc NM, Kuznetsov G, Xu S, Xiao Y, Pollock RM, Smith JS, Kuntz KK, Ribich S, Minoshima Y, Matsui J, Copeland RA, Tanaka S, Keihack H. : Preclinical evidence of anti-tumor activity induced by EZH2 inhibition in human models of synovial sarcoma. *PLoS One*, 11, e0158888, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0158888. (査読有)
6. Elmansuri AZ, Tanino MA, Mahabir R, Wang L, Kimura T, Nishihara H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Tsuda M, Tanaka S. Novel signaling collaboration between TGF- β and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer. *Oncotarget*, 10, 27094-27107, 2016. DOI:10.18632/oncotarget.8314. (査読有)
7. Yamada T, Tsuda M, Wagatsuma T, Fujioka Y, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Totsuka Y, Haga H, Tanaka S, Shindoh M, Ohba Y. : Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers. *Sci Rep*, 6: 23545, 2016. DOI:10.1038/srep23545. (査読有)
8. Yuzawa S, Nishihara H, Wang L, Tsuda M, Kimura T, Tanino M, Tanaka S. : Analysis of NAB2-STAT6 gene fusion in 17 cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma: review of the literature. *Am J Surg Pathol*, 40, 1031-1040, 2016. DOI:10.1097/PAS.0000000000000625. (査読有)
9. Inuzuka T, Fujioka Y, Tsuda M, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Tanaka S, Ohba Y. : Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. *Sci Rep*, 6:21613, 2016. DOI:10.1038/srep21613.(査読有)
10. Goto K, Kimura T, Kitamura N, Semba S, Ohmiya Y, Aburatani S, Matsukura S, Tsuda M, Kurokawa T, Gong JP, Tanaka S, Yasuda K. : Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the gel-induced chondrogenic differentiation. *J Biomed Mater Res A*. DOI:10.1002/jbm.a.35615. (査読有)
11. Kimura T, Wang L, Tabu K, Tsuda M, Tanino M, Maekawa A, Nishihara H, Hiraga H, Taga T, Oda Y, Tanaka S. : Identification and analysis of CXCR4-positive synovial sarcoma initiating cells. *Oncogene*, 35, 3932-3943, 2016. DOI:10.1038/onc.2015.461. (査読有)
12. Moriya J, Tanino AM, Takenami T, Endoh T, Urushido M, Kato Y, Wang L, Kimura T, Tsuda M, Nishihara H, Tanaka S, R-IHC study Group. : Rapid immunocytochemistry based on alternating current electric field using squash smear preparation of central nervous system tumors. *Brain Tumor Pathol*, 33, 13-18, 2016. DOI:10.1007/s10014-015-0238-0.(査読有)
13. Makino Y, Tsuda M, Ohba Y, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. : Tyr724 phosphorylation of ELMO1 by Src is involved in cell spreading and migration via Rac1 activation. *Cell Commun Signal*, 13:35, 2015. DOI:10.1186/s12964-015-0113-y.(査読有)
14. †Furukawa J, †Tsuda M, Okada K, Kimura T, Piao J, Tanaka S, Shinohara Y. :

Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. PLoS One, 10, e0128300. 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0128300. (査読有)

15. Matsumoto R, **Tsuda M**, Wang L, Maishi N, Abe T, Kimura T, **Tanino M**, Nishihara H, Hida K, Ohba Y, Shinohara N, Nonomura K, Tanaka S. : CRK adaptor protein induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells via HGF/c-Met feedback loop. Cancer Sci, 106, 709-717. 2015. DOI:10.1111/cas.12662. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. **津田真寿美**, 松本隆児, 吉田一彦, 谷野美智枝, 木村太一, 西原広史, 阿部崇重, 篠原信雄, 野々村克也, 田中伸哉 : AKR1C1 mediates bladder cancer metastasis and drug resistance. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6-8 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2. **Tsuda M**, Kohsaka S, Wang L, Kimura T, **Tanino M**, Nishihara H, Ladanyi M, Tanaka S. : NGS-based MSK-IMPACT analysis reveals specific genetic alterations in recurrent glioblastoma. 20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, San Antonio, USA, Nov. 19-22. 2015, San Antonio (USA)
3. **津田真寿美**, 高阪真路, 王磊, 木村太一, 谷野美智枝, 西原広史, Marc Ladanyi, 田中伸哉 : NGS-based MSK-IMPACT analysis reveals specific genetic alterations in recurrent glioblastoma. 第 74 回日本癌学会総会, 2015 年 10 月 8-10 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
4. **津田真寿美**, 王磊, 谷野美智枝, 木村太一, 西原広史, 田中伸哉 : 膠芽腫における分子標的阻害薬耐性獲得責任分子としての IGFBP2 の同定 第 33 回日本脳腫瘍病理学会, 2015 年 5 月 29-30 日, JR ホテルクレメント高松 (香川県・高松市)

[産業財産権]

出願状況 (計 3 件)

名称 : 癌幹細胞の製造方法
発明者 : 田中伸哉, 安田和則, **津田真寿美**, 黒川孝幸
権利者 : 北海道大学
種類 : 特許
番号 : 特許願 2017-028833
出願年月日 : 2017 年 2 月 20 日

国内外の別 : 国内

名称 : 固定生体組織内での活性型低分子量 GTP 結合蛋白質検出方法
発明者 : 田中伸哉, **津田真寿美**, 谷野美智枝
権利者 : 北海道大学
種類 : 特許
番号 : 特許願 PCT / JP2016 / 056890
出願年月日 : 2016 年 3 月 15 日
国内外の別 : 国外

名称 : グリオーマの診断マーカー、診断方法、糖鎖マーカーを検出する方法及び糖鎖マーカー
発明者 : 篠原康郎, 田中伸哉, 古川潤一, **津田真寿美**
権利者 : 北海道大学
種類 : 特許
番号 : 特許願 PCT / JP2015 / 072583
出願年月日 : 2015 年 8 月 7 日
国内外の別 : 国外

[その他]
ホームページ等
<http://patho2.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 真寿美 (TSUDA, Masumi)
北海道大学大学院・医学研究科・講師
研究者番号 : 30431307

(2) 研究分担者

谷野 美智枝 (TANINO, Mishie)
北海道大学大学院・医学研究科・講師
研究者番号 : 90360908