

令和元年6月24日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04691

研究課題名(和文) 間質ネットワークが加速するがんの悪性化メカニズム

研究課題名(英文) Interaction of protumor stromal cells accelerates cancer progression

研究代表者

田中 正光 (Tanaka, Masamitsu)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20291396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織には癌のサポーター的な働きを持つヘテロな間質細胞が作られるが、それらがどのように生み出されるのか、また相互の連携については不明な点が多い。癌細胞は周辺にサポーターとして間質細胞を作るために、自身の分子情報を周囲の細胞に伝達する。その新規機構として、マクロファージは癌細胞の分泌する細胞外小胞をとりこみ、組織内を長距離移動して周辺細胞にその分子情報を再び小胞を媒体としてデリバリーする事を見出した。M<sub>2</sub>は癌の分子を選別しながら配達するメッセンジャーの側面が出てきた。この機構は胃癌において癌細胞が中皮細胞を活性化し、癌の進展を加速するニッチを誘導する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌をサポートする様々な間質細胞の形質転換が広範囲に起きる事は、やがて癌細胞の浸潤を招く場を形成する。M<sub>2</sub>が癌の情報を周辺のヘテロな間質細胞に伝搬していくメカニズムの一端を明らかにした事で、癌細胞とサポーター的な間質細胞間のネットワークを遮断し、癌の広がりを未然に防ぐ治療方針の基盤となる。今後特に化療後の再燃、憎悪の経過をとる症例で治療標的や予測分子が見出される事が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is not well understood how Tumor-derived extracellular vesicles (TEVs) are delivered and effect on stromal cells in a tumor microenvironment. We identified a novel function of macrophages in delivery and transmission of TEVs. TEV incorporated macrophages (TEV-M) increased invasion and widely disseminated. Upon contact with host stromal cells including mesothelial cells (MC), fibroblasts and endothelial cells, TEV-Ms released membrane blebs containing TEVs. Then, scattered blebs were incorporated in these stromal cells, which transferred tumor-derived proteins and RNAs. Macrophage mediated transfer of TEVs caused myofibroblastic change in the recipient cells. In TEV-M injected mice stomach, TEVs were delivered by M<sub>2</sub>s to MCs covering the stomach, and MCs entered the gastric wall to create a niche that favored invasion of gastric cancer cells. These findings suggest a novel function of TAMs that transfer TEVs to surrounding stromal cells and increase CAF-like cells.

研究分野：腫瘍生物

キーワード：がん間質 癌関連線維芽細胞 腫瘍随伴マクロファージ 中皮細胞 細胞外小胞 情報伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 間質細胞ネットワークによる癌悪性化機構:

代表者らはこれまでに、CAF(癌関連線維芽細胞)、TAM(腫瘍随伴マクロファージ)および腹膜中皮細胞の相互作用を検討し、これらの間質細胞による癌細胞の浸潤拡大作用を検討してきた。成果として、胃癌では癌細胞の情報を受け取り活性化した漿膜中皮細胞が胃壁内に侵入し、癌細胞の深部浸潤を誘致するニッチを形成する作用などを見出した。その過程で、癌細胞と間質細胞、およびこれらの間質細胞間でどう分子情報が受け渡されているか注目するに至った。

細胞間の情報伝達は大きく細胞外への分泌因子に依存するものと、細胞間の接触による直接的な伝達がある。そのうち前者には、サイトカインなどの液性因子と、細胞外小胞(EV)に媒介される伝達機構が存在する。

代表者の先行研究で、上記の胃癌での中皮細胞活性化は癌細胞の産生するEVに大きく依存していた。また、CAFは一定量の癌細胞死を誘導し、そのアポトーシス小体を含む小胞(腫瘍由来細胞外小胞:TEV)が多量に産生される事、TEVはCAFを活性化するフィードバックをかけ、CAFリード型の腫瘍浸潤モードを作る事などを見てきた。しかし線維化組織中でのTEVの拡散範囲は限局的で、既報告でも生体内では癌細胞周辺数十~100 $\mu$ m程度で他細胞への伝搬を見ている。

そこで、血液などリキッド中で運搬される事は解明の進んでいるEVが、腫瘍局所では組織内でどのように拡散し、間質細胞に分子情報を伝達するのかをテーマに設定した。

代表者は数ミリメートル以上の距離では、TEVが組織中を直接浸透していく事は難しいのではないかと考え、1)癌細胞から放出されたTEVをMが吸収する、2)TEVを吸収したMが遊走する、3)Mが遊走先でTEVを放出し、線維芽細胞等の形質転換をきたす、というマクロファージを介した3ステップの機序を想定し、検証を進める事とした。

## 2. 研究の目的

腫瘍では様々な間質細胞が連携して癌の進行に有利な微小環境を作っている。個々の間質細胞からヘテロな間質細胞の複合作用に解析を進め、癌の悪性化を誘導する間質細胞ネットワークの機構を明らかにする事を目指している。具体的には、中皮細胞、線維芽細胞、マクロファージが癌の浸潤誘導や腫瘍組織の形態形成に及ぼす複合作用を明らかにする。特にマクロファージがTEVを他の間質細胞に伝搬する機構について検討する。

(1) 癌細胞の産生するEVがどの範囲で、どのように拡散し、間質細胞に分子情報を伝達するのか明らかにする。

(2) マクロファージによるTEVの伝搬様式を解明し、それが胃癌の深部浸潤を加速する中皮細胞ニッチの形成過程にどう関わるのか明らかにする。

(3) 新規中皮細胞ニッチの分子特性を検討する。

意義:

腫瘍を構成する間質細胞を個別に分子解析する情報は蓄積しつつあるが、それらの細胞間の連携機構は未解明の部分が多い。分子情報の伝搬を担うEVの動態を解明することで、腫瘍構成細胞間のネットワークを標的とした新規分子治療に繋げることを目指す。

## 3. 研究の方法

・細胞 癌細胞は最も難治性の胃癌であるスキルス型胃癌細胞株を複数(共同研究体制で国立がん研究センターと大阪市立大学から分与されている)用いた。CAFはスキルス胃癌患者の外科手術サンプルから採集し樹立した細胞株を、同一検体の非癌部線維芽細胞(NF)とセットで複数ペアを大阪市立大学から供与された。腹膜中皮細胞(PMC)は、マウス腸間膜から採取したもの、および上記外科サンプルから採取したヒトPMCを供与されたものを用いた。マクロファージはマウス腹腔から採取し、サイトカイン刺激により活性化(TAM変換)を適宜加えたものを使用した。また癌細胞移植マウスから採取した腫瘍組織を分散し、CD11b<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup>分画のマクロファージ(TAM)をカラム精製により分離した。

・間質細胞、癌細胞の浸潤モニター:

In vitro:独自の三次元ゲル浸潤アッセイによるイメージング(Bio-Protocol 2016;6)。胃癌細胞と間質細胞の浸潤に最適化したコラーゲン、マトリゲル混合のゲルを用い、血清濃度勾配に従ったゲル内浸潤の様子を共焦点顕微鏡で3D再構築した。

In vivo:蛍光標識胃癌細胞とCAF、TAMの混合を免疫抑制マウス胃の粘膜下層に移植し、定期的に胃スライス切片を作成して胃壁内浸潤を共焦点顕微鏡下に観察した。PMCの動態観察のためには、赤色蛍光tdTomatoのROSAレポーターマウスと中皮細胞に発現特異性の高いWt1遺伝子プロモーター制御下のCreマウスを交配し、さらにヌードマウス化したWt1<sup>CreERT2</sup>

-tdTomato<sup>nu/nu</sup> (Wt1<sup>Cre</sup>-tdT<sup>nu</sup> と略)を先行研究で作成している。タモキシフェン誘導下に中皮細胞が赤色蛍光で可視化される(*Cancer Res* 77 (3), 684-95, 2017)。

・TEVのイメージング

癌細胞または各間質細胞の産生するEVは、培養上清から超遠心法により分画した。そのイメージングは、精製後のEVを蛍光試薬(Di)でラベルして行うほか、CD63-EGFPを安定発現した細胞からEVを精製し、EGFPを指標にその動態を追跡した。EV内の分子イメージングには、biotinで全蛋白質ラベルした癌細胞を用いて、EVを媒介してマクロファージから他の間質細胞へ移行するbiotin標識分子をモニターした。

・網羅的分子解析

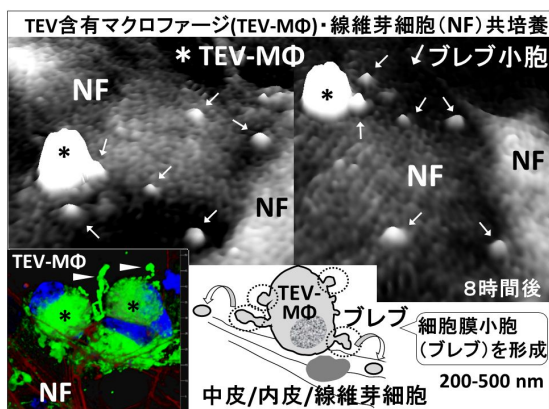
胃癌細胞の分泌するEVによる活性化を経て胃壁内に侵入した中皮細胞の分子特性を探索するため、Wt1<sup>Cre</sup>-tdT<sup>nu</sup>マウス粘膜下に胃癌細胞株由来EVを注入し、経時的に漿膜下層を採取した。同組織から精製したRNAをRNAシーケンス(外部受託)に供した。

またEVを媒介して癌細胞から間質細胞に伝搬される分子の探索のため、ヒト胃癌細胞株の分泌するEV、および同EVを取り込んだマクロファージ(M:マウス)が二次的に産生したEVをそれぞれ回収し、RNAシーケンスを行った。ヒト由来遺伝子の比較解析から、Mを経て伝達される癌細胞の分子情報の概要を算出した。

4. 研究成果

(1)癌細胞外小胞の伝搬機構について:

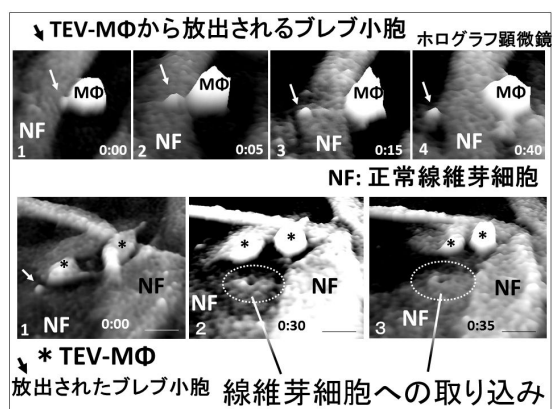
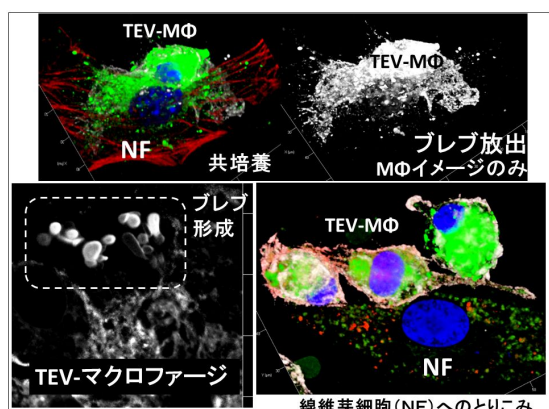
(i)蛍光標識した癌細胞由来TEVを取り込んだMと、線維芽細胞または中皮細胞の共培養のイメージング、(ii)CD63-EGFP-癌細胞のマウス胃移植部位のイメージングから、MはTEVを取り込み、広範囲に移動して遠方の間質細胞に癌由来分子を伝搬する事を見出した。その機構は細胞間接触依存性にMが産生する新規プレブ小胞に大きく依存した。



タイムラプス観察から、TEV含有M (TEV M) は、線維芽細胞や中皮細胞との接触により細胞膜の突起伸長によるプレブ形成を高頻度におこし、その断片化によってMから遊離し、他の間質細胞に取り込まれる現象を取得した(下図:写真ではTEVを緑に標識)。

このプレブ小胞にはCD63-EGFPやbiotin標識した癌細胞由来分子が多く含まれていた。

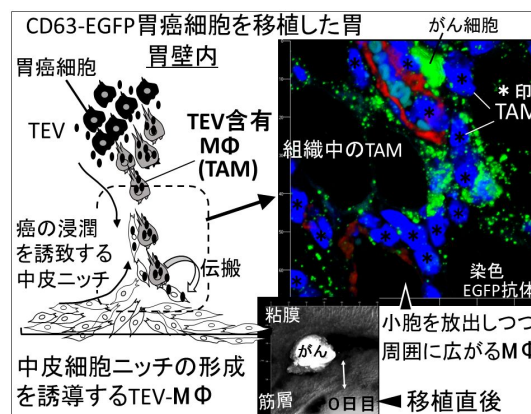
これらの結果は、Mは癌の分子を選別しながら配達するメッセンジャーとしての側面を有する事を示唆した。



(2)TEVの伝搬による間質細胞の形質変化:

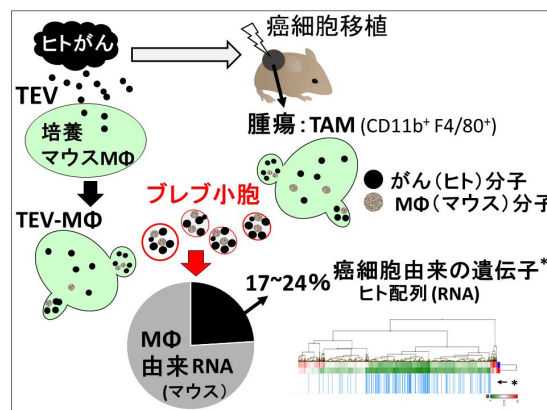
(i) *in vitro*: TEV M の特性として浸潤能が亢進している事、共培養した中皮細胞に間葉転換を誘導し、中皮細胞がCAF様細胞へスイッチする事を見出した。これは、TEV M から中皮細胞へのTEV分子の伝達を阻害するとキャンセルされる事、癌細胞をbiotinパルスラベルした実験でもTEV Mが分泌した小胞の内、biotin陽性癌由来蛋白質を多く含む分画に中皮細胞の間葉転換能が高い事から、癌細胞由来分子のMを介した伝搬が腫瘍環境中に新たにCAFを増員する機構を示唆した。同様のCAFマーカー陽性細胞への転換は、TEV Mと共培養した正

常線維芽細胞や血管内皮細胞にも観察された。(ii) *in vivo*: 先行研究からの継続で、Wt1<sup>Cre</sup>-tdTomato を用いた中皮細胞の Lineage tracing により、癌細胞あるいはその TEV の胃移植による中皮細胞の胃壁内侵入によるニッチ形成は、マクロファージの除去により抑制された。胃壁内で癌細胞由来 TEV の多くは M に取り込まれており、TEV-M が胃壁内で広範囲に分散し(右図)、漿膜の中皮細胞や胃壁内の血管内皮細胞に TEV の一部を伝搬しているイメージを取得した。活性化した中皮細胞は CAF マーカー陽性に間葉転換しており、(i)の機構が胃癌モデルマウスでも確認された。



(3) M による TEV 伝搬機構の分子解析:

ヒト癌由来細胞外小胞 (TEV)、および TEV を取り込んだマウス M が分泌した細胞外小胞から行った RNA シークエンスリスト中からヒト遺伝子を比較し、癌細胞外小胞内の分子の約 17% が、TAM を経て再びマクロファージから分泌された小胞内に伝搬されている事を見出した。マウス移植腫瘍から単離した TAM の産生する EV 中にも、TEV 由来分子が約 24% 同定された(下図)。その中には、(2)で観察した CAF 様細胞への転換に関わる事が報告されている分子群 (TGF-β, 活性化 Src, Wnt3, HIF1α など)が含まれていた。



以上(1)-(3)の内容を論文発表した。

**Cancer Research** 77 (3), 684-695, 2017 **Oncogene** 38, 2162-2176, 2019

(4) 中皮細胞ニッチの分子特性:

上記の活性化中皮細胞による新規ニッチの分子特性を探索するため、胃癌細胞株の EV を注入した中皮細胞可視化マウスの胃壁からニッチ部分を採取し、対照マウスの胃外壁と RNA シークエンスによる差異解析を行った。その結果を基に中皮細胞ニッチで発現上昇が顕著な基質遺伝子リストを作成した。その中から EFEMP1 を解析候補分子に選び、EFEMP1 欠損マウスを CRISPR/Cas9 により作成した。

同分子は腫瘍間質での発現がみられ、その欠損により細胞外基質の変性から移植腫瘍の浸潤、増殖に影響が観察された(論文準備中)。

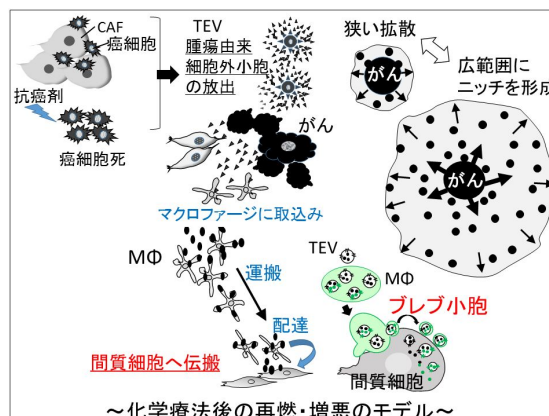
(5) その他の間質細胞間ネットワーク

先行研究からの継続で、癌細胞のアポトーシス小胞の産生が CAF を活性化し、腫瘍の浸潤形態を CAF リード型の癌細胞浸潤モードに転換する事を論文発表した (**Oncogene** 36, 4434-44, 2017)。さらに、この時 CAF の浸潤能亢進にマクロファージとの相互作用が重要である事を見出した。CAF と M の共培養において、CAF の conditioned medium は M に MMP-9 の産生を誘導する事、その結果 M の共存は CAF の浸潤をさらに増強し、CAF リード型の癌細胞浸潤モードを加速した(論文準備中)。

(1)-(3)を含めてこれらの結果は、ヘテロな間質細胞間に両方向性の活性化機構が存在する事を示している。

TEV の産生は化学療法などの治療後の再燃時に多い報告もあり、TEV-M による伝搬機構は広範囲に反応性のニッチを形成し、癌の進展を増悪させる一因になる事が予想される。

今後、その連鎖を遮断する治療法の開発に繋げたい。



〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Umakoshi M, Takahashi S, Itoh G, Kuriyama S, Sasaki Y, Yanagihara K, Yashiro M, Maeda D, Goto A, Tanaka M. (2019)  
Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment.  
*Oncogene* 38, 2162-2176, doi: 10.1038/s41388-018-0564-x.
2. Kuriyama S, Tsuji T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka M. (2018)  
PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetero-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer.  
*Cell Death Discovery* 4 (11), doi: 10.1038/s41420-017-0006-5.
3. Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M., Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, 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/s41598-018-22164-5.
4. Pervin MS, Itoh G, Talukder MSU, Fujimoto K, Morimoto YV, Tanaka M., Ueda M, Yumura S. (2018) A study of wound repair in Dictyostelium cells by using novel laserporation.  
*Sci Rep* 8, 7969 doi: 10.1038/s41598-018-26337-0.
5. Shimazu K, Inoue M, Sugiyama S, Fukuda K, Yoshida T, Taguchi D, Uehara Y, Kuriyama S, Tanaka M., Miura M, Nanjyo H, Iwabuchi Y, Shibata H. (2018)  
Curcumin analog, GO-Y078, overcomes resistance to tumor angiogenesis inhibitors.  
*Cancer Science* 109, 3285-3293, doi: 10.1111/cas.13741.
6. Tanaka M., Kuriyama S, Itoh G, Maeda D, Goto A, Tamiya Y, Yanagihara K, Yashiro M, Aiba N. (2017) Mesothelial cells create a novel tissue niche that facilitates gastric cancer invasion.  
*Cancer Research* 77 (3), 684-695. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0964
7. Itoh G., Chida S., Yanagihara K., Yashiro M., Aiba N., Tanaka M. (2017)  
Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumors. *Oncogene* 36, 4434-4444; doi:10.1038/onc.2017.49
8. Goto A, Tanaka M., Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, Saito M, Kohno T, Kuriyama S, Konno H, Imai K, Saito H, Minamiya Y, Maeda D. (2017)  
The low expression of miR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases. *PLoS One.*;12(7):e0181270.
9. Kuriyama S, Tamiya Y, Tanaka M. (2017) Spatiotemporal expression of UPK3B and its promoter activity during embryogenesis and spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 147 (1), 17-26, doi: 10.1007/s00418-016-1486-8

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1 田中正光 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年  
Macrophages transmit tumor-derived extracellular vesicles to stromal cells and create pro-tumor microenvironment.
- 2 栗山 正、田中正光 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 Gene expression profiling of organ tropism related upregulation in osteosarcoma derived sub-cell lines.
- 3 伊藤 剛、田中正光 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年  
Cancer invasion geometry of giant cancer cells cooperating with stromal cells.
- 4 田中正光 第107回日本病理学会総会 2018年  
Macrophages transfer cancer cell derived EVs to stromal cells that promotes gastric cancer invasion.
- 5 栗山 正、田中正光 第 70 回日本細胞生物学会 2018 年  
PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax/Bak hetero-oligomerization through the interaction with Bid in human colon cancer.
- 6 伊藤 剛、田中正光 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年  
細胞分裂時の細胞膜の動態制御機構の解明
- 7 田中正光 第 76 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2017 年 Cancer cell-derived

extracellular vesicles educate macrophages to facilitate tumor invasion.

- 8 栗山 正、田中正光 第76回日本癌学会学術総会 2017年  
PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer.
- 9 伊藤 剛、田中正光 第76回日本癌学会学術総会 2017年  
CAF (cancer-associated fibroblasts) induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumors.
- 10 田中正光 第106回日本病理学会総会 2017年  
癌関連線維芽細胞による癌細胞死誘導は腫瘍の浸潤モードを制御する
- 11 栗山 正、田中正光 The 50th JSDB meeting.2017年  
Collective durotaxis of cranial neural crest cells in Xenopus.
- 12 伊藤 剛、田中正光 2017年  
日本生化学会東北支部第83回例会・シンポジウム 優秀論文賞受賞者講演  
癌細胞のデス小胞が促進する CAF リード型の癌浸潤プロセスの解明
- 13 田中正光 第75回日本癌学会学術総会 2016年  
Mesothelial cells create a novel niche that facilitates gastric cancer invasion.
- 14 栗山 正、田中正光 第75回日本癌学会学術総会 2016年  
PLEKHN1 is required for Bax oligomerization in cancer cell line.
- 15 田中正光 第105回日本病理学会総会 2016年  
Mesothelial cells create a novel niche that attracts cancer invasion and peritonitis.
- 16 伊藤 剛、田中正光 第39回日本分子生物学会総会 2016年  
CAF (癌関連線維芽細胞)は癌細胞の細胞死を誘導する事で癌浸潤モードを制御する
- 17 栗山 正、田中正光 第39回日本分子生物学会総会 2016年  
アフリカツメガエル頭部神経堤細胞の集団的細胞遊走  
〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

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

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=seika2>

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：栗山 正

ローマ字氏名：KURIYAMA SEI

研究協力者氏名：伊藤 剛

ローマ字氏名： ITOH GO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。