

平成 31 年 4 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11726

研究課題名(和文) 骨髄播種癌細胞の休眠を担う自律的特性の解明と治療への展開

研究課題名(英文) Intrinsic cell property that contributes to tumor cell dormancy in bone marrow

研究代表者

神力 悟 (Shinriki, Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：00583048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト由来癌細胞株をマウスに移植し、骨髄に播種して休眠している癌細胞集団(休眠BM-DTC)の自律的特性を解析した。その結果、肺転移巣や移植巣を構成する細胞集団とは異なり、休眠BM-DTCは自律的に特有の遺伝子発現プロファイルを有することが明らかとなった。また、DNAバーコーディング法によって、休眠BM-DTCは特定の細胞集団によって構成されていることが明らかとなり、その起源となる細胞クローンを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌による死亡のほとんどは転移・再発を原因とする。様々な癌において、患者骨髄で増殖せずに潜伏している癌細胞が検出された場合、その後の転移・再発が多いことは疫学的に確立している。マウスモデルを用いた本研究によって、骨髄で潜伏している癌細胞が、特有の癌細胞集団によって占められていることが示唆された。さらに、その起源となりうる癌細胞クローンを一つ同定することができた。今後、同定したクローンを解析していくことで、癌細胞の播種過程や増殖再開メカニズムの理解が進み、新たな治療法の開発に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed intrinsic properties of a clone established from dormant bone marrow-disseminated tumor cells (BM-DTC) using mouse xenograft model. Then, we found that the dormant BM-DTC clone had a gene expression signature distinct from lung metastasis- and inoculation site-derived clones. Furthermore, our DNA barcoding assay indicated that dormant BM-DTC consisted of specific populations, and we identified a clone which would preferentially occupy dormant BM-DTC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：休眠骨髄播種癌細胞 転移・再発

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

1. 研究開始当初の背景

様々な癌の患者において、播種癌細胞 (disseminated tumor cells: DTC) に起因する「微小残存腫瘍」が骨髄 (bone marrow: BM) において高頻度に観察される。骨髄穿刺液中に認められる DTC は、そのほとんどが増殖マーカー陰性であるにも関わらず、手術時や治療終了の時点における BM-DTC の多さは、その後の遠隔無転移生存率の減少と密接に関連している。注目すべきことに、この統計学的な関連性は、骨転移を来すことが比較的稀な頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) などの癌種においても共通して認められる。これらの知見から、BM-DTC はある一定の期間、細胞周期が静止した“休眠状態”を維持しており、なんらかのきっかけにより骨転移巣形成を開始すると考えられている。また BM は、他臓器での転移・再発を引き起こすような癌細胞の供給源になっていると認識されている。したがって、BM-DTC の検出や制御が癌の治療を目指すにあたって極めて重要である。

近年の研究から、骨転移形成過程の理解は分子レベルで進んできたものの、BM-DTC の休眠・生存の仕組みに関する理解は極めて遅れている。BM-DTC の表現型は、DTC 自身の特性と環境要因との相互作用によって発現すると想定されるが、転移能や標的臓器嗜好性は癌細胞の「自律的特性」に大きく依存しているようである。そして、そのような「適性」は、原発巣で既に選別されているものと考えられる。しかし一方で、休眠 BM-DTC の自律的特性を分子レベルで体系的に捉えた過去の報告はない。そして、患者の致死転帰に直結するような、休眠状態の解除や他臓器への播種の仕組みに関する情報もほとんど存在しない。

このような状況の中、申請者は、マウスに移植したヒト HNSCC 細胞株から休眠 BM-DTC 株を樹立し、その解析によって BM-DTC の休眠とそれに伴う抗癌剤抵抗性に DTC 自身の特性が寄与していることを報告した。同時に、肺転移細胞と休眠 BM-DTC との間で抗癌剤耐性機構が異なる可能性も示した。重要なことに、臨床的に休眠癌を実証できる遠隔臓器は BM のみであり、それを意図的に再現性ある形で採取できるのは、特定の細胞株を移植したマウスなどに限られる。そうして得られた DTC 自体や、「BM で休眠する資格を有する細胞」をクローン化することは、休眠 BM-DTC の詳細な特性の解析を可能にすると考えられる。

2. 研究の目的

休眠 BM-DTC の「自律的特性」を多面的に捉えることで、新たな視点から転移・再発に対する診断・治療法を開発すること

3. 研究の方法

(1) 休眠 BM-DTC サブクローンの特性の解析

HNSCC 細胞株 HEP3 を移植したマウスから in vivo selection 法を用いて株化した、休眠 BM-DTC クローン (BM-HEP3) の遺伝子発現プロファイルを解析し、肺転移巣由来クローン (Lu-HEP3) 移植巣由来細胞集団 (P-HEP3) との比較を行った。

(2) 休眠 BM-DTC 選別機構の解析

休眠 BM-DTC が、母集団から「規則性」をもって派生し潜伏している場合、それらにはクローナリティ (均一性) を認めるはずである。そこで、BM で休眠を呈する細胞株 (親株) を DNA バーコードライブラリー (ClonTracer Library) にて 1 細胞レベルで標識し、マウスに移植し、BM をはじめとする各臓器に存在する癌細胞のバーコードを NGS 解析することでクローナリティの評価を行った。並行して、クローナリティと同時にその起源クローンの特性を解明するため、異なるバーコードを持つ単一クローンを複数個樹立し、それらを等量ずる混合してマウスに移植した。そして上記同様にバーコード解析を行った。

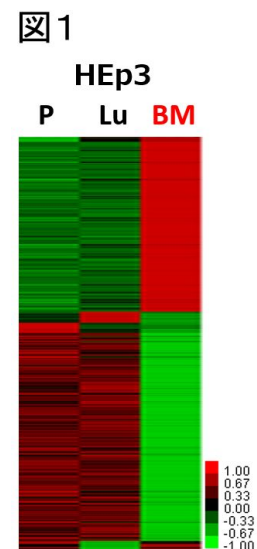
(3) CRISPR/Cas9 遺伝的スクリーニングによる BM-DTC の増殖回避システムの解析

BM での休眠に必要な遺伝子 (群) を明らかとすることを目的として、CRISPR/Cas9 遺伝的スクリーニングシステムを採用した。まず、Cas9・ルシフェラーゼを導入した HEP3 細胞株に sgRNA ライブラリー (Genome-scale CRISPR Knock-Out v2: GeCKO v2) を導入し、マウスに移植した。ルシフェラーゼ活性でモニタリングし、本来認められない骨病変が検出されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 休眠 BM-DTC クローンの遺伝子発現プロファイル

まず、HEP3 移植マウスから樹立した、休眠 BM-DTC クローン (BM-HEP3)、肺転移巣由来クローン (Lu-HEP3)、移植巣由来細胞集団 (P-HEP3) の遺伝子発現プロファイルを比較解析した。その結果、Lu-HEP3 と P-HEP3 の遺伝子発現プロファイルは類似していたのに対し、BM-HEP3 はそれら 2 集団とは異なる、特有の遺伝子発現プロファイルを有することが明らかとなった (図 1)。これらの結果から、休眠 BM-DTC は自律的に特有の性質を有していることが示唆された。一方、肺転移巣を形成している癌細胞集団は、移植巣 (原発巣) と類似した特性のものが多くを占めていることが考えられた。



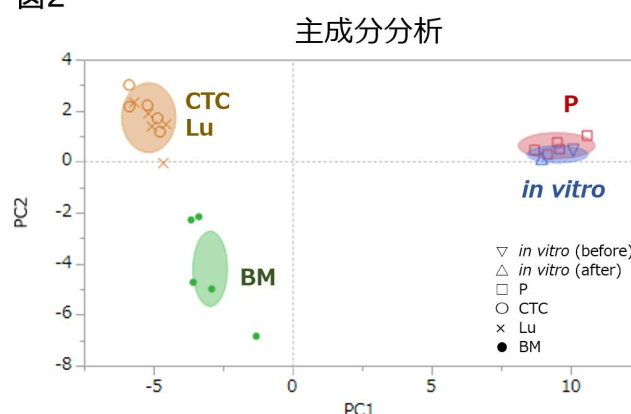
(2) 休眠 BM-DTC におけるクローナリティ

上記の結果から、我々の仮説通り、休眠 BM-DTC は母集団から「規則性」をもって派生し潜伏していることが考えられたため、休眠 BM-DTC のクローナリティを DNA バーコーディング法にて解析した。ヒト HNSCC に由来する SAS 細胞株は、様々な臓器で転移巣をほとんど形成しないことが知られている。各臓器における休眠 DTC のクローナリティを解析するため、本解析では SAS 細胞を用いた。1 バーコード/細胞となるようにバーコード標識した SAS 細胞をマウスの頬粘膜に移植し、1 か月後に移植巣 (P)、骨髄 (BM)、肺 (Lu)、末梢血 (循環腫瘍細胞: CTC) からゲノム DNA を抽出した。In vitro におけるクローンバランスの変化も検討できるよう、マウス移植時 (in vitro before) からマウス解剖時 (in vitro after) までの期間、in vitro にて培養維持した細胞からもゲノム DNA を抽出した。そして、それら DNA から、ライブラリーを調製し NGS 解析に供した。その結果、各組織間でバーコード (クローン) に特有の偏りが認められ、特に BM-DTC は特有のクローンバランスを有することが明らかとなった (図 2)。特に、骨髄で最も優勢なクローンは、ある程度の割合で肺にも存在したが、移植巣や CTC 中では稀少であった。この結果から、休眠 BM-DTC 集団は均一な集団で構成されていることが示唆された。一方、CTC と肺 DTC は類似したクローンバランスを示したことから、CTC から肺に侵入・生着する過程で明らかな選別はかかっていないことが考えられた。原発巣で優勢な集団の多くは DTC には認められなかった (検出感度以下であった)。

次に、休眠 BM-DTC の起源となるクローンの機能解析を可能とするため、バーコード標識した SAS から、固有のバーコードを持つシングルクローンを 34 個樹立し、それらを等量ずつ混合してマウスに移植した。上記同様に各臓器におけるクローナリティ解析を行ったところ、BM-DTC の多くを占める唯一のクローン (クローン X) を同定した。このクローン X は肺や CTC でも比較的優勢なクローンであった。

以上より、原発巣内で既に選別されている特有の稀少クローンが、休眠 BM-DTC として潜伏している可能性が示された。現在、クローン X が自律的に有する遺伝子発現プロファイルや表現型の解析を行っている。

図 2



(3) CRISPR/Cas9 スクリーニング法の検証

まず、HEp3 細胞株に sgRNA ライブラリーを導入し、マウスの頬粘膜や背部皮下に移植して、マクロ骨病変を形成するかどうか、長期間の生体モニタリングを行った。当初、移植巣の増大による死亡が先行したため、一定期間経過後に腫瘍切除を行い、経過観察することとした。しかし、恐らく、もともとの骨への播種効率の低さとライブラリー感染時のカバレッジの低さ (ノックアウト効率の低さ) が影響して、現時点ではマクロ骨病変は認められていない。ただし、通常は認めないリンパ節転移の形成を認めたことから、本アプローチによって細胞の挙動を攪乱させることができているものと考えられた。

上記 (2) で同定した SAS 由来クローン X は、骨髄に効率的に播種・生着すると考えられる。したがって、本解析を遂行するにあたって優れたツールであると考えられる。そこで今後は、クローン X を用いて CRISPR/Cas9 スクリーニングを実施し、BM での休眠を担う分子の特定を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Ikedo T, Masuda T, Ueda M, Yamashita T, Misumi Y, Shinriki S, Ando Y. Unwanted road to anemia in transthyretin familial amyloid polyneuropathy may continue irrespective of tafamidis treatment. *Ann Clin Biochem*, 55:571-575, 2018. (査読有)

DOI: 10.1177/0004563218754587

Shinriki S, Jono H, Maeshiro M, Nakamura T, Guo J, Li JD, Ueda M, Yoshida R, Shinohara M, Nakayama H, Matsui H, Ando Y. Loss of CYLD promotes cell invasion via ALK5 stabilization in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 244:367-379, 2018. (査読有)

DOI: 10.1002/path.5019

Watanabe T, Obayashi K, Misumi Y, Tasaki M, Shinriki S, Ando T, Akagami T, Ueda M, Yamashita T, Hirotsu S, Ando Y. Hereditary transthyretin amyloidosis associated with a transthyretin variant Thr59Arg. *Amyloid*, 24 Suppl 1:119, 2017. (査読有)

DOI: 10.1080/13506129.2017.1294057

Ishikawa S, Tateya I, Hayasaka T, Shinriki S, Masaki N, Hirano S, Kitamura M, Muto M, Morita S, Setou M, Ito J. The distribution of Phosphatidylcholine species in superficial-type pharyngeal carcinoma. *Biomed Res Int*, 2017:5387913. 2017. (査読有)

DOI: 10.1155/2017/5387913

Sueta D, Ito M, Uchiba M, Sakamoto K, Yamamoto E, Izumiya Y, Kojima S, Kaikita K, Shinriki S, Hokimoto S, Matsui H, Tsujita K. A case of pulmonary thromboembolism due to coagulation factor V Leiden in Japan ~usefulness of next generation sequencing~. *Thromb J*, 15:8, 2017. (査読有)

DOI: 10.1186/s12959-017-0132-6

Matsuoka Y, Nakayama H, Yoshida R, Hirotsu A, Nagata M, Tanaka T, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Nakashima H, Shinriki S, Fukuma D, Ogi H, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R. IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 115:1234-1244, 2016. (査読有)

DOI: 10.1038/bjc.2016.327

Hiraide T, Ikegami K, Sakaguchi T, Morita Y, Hayasaka T, Masaki N, Waki M, Sugiyama E, Shinriki S, Takeda M, Shibasaki Y, Miyazaki S, Kikuchi H, Okuyama H, Inoue M, Setou M, Konno H. Accumulation of arachidonic acid-containing phosphatidylinositol at the outer edge of colorectal cancer. *Sci Rep*, 6:29935, 2016. (査読有)

DOI: 10.1038/srep29935

Kadono M, Kanai A, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, Kyo T, Oshima K, Yokoyama A, Kawamura T, Nagase R, Inoue D, Kitamura T, Inaba T, Ichinohe T, Matsui H. Biological Implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, 44:745-754, 2016. (査読有)

DOI: 10.1016/j.exphem.2016.04.017

Jono H, Su Y, Obayashi K, Tanaka Y, Ishiguro A, Nishimura H, Shinriki S, Ueda M, Ikeda K, Yamagata K, Ichihara K, Ando Y; Scientific Committee for the Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry. Sources of variation of transthyretin in healthy subjects in East and Southeast Asia: Clinical and experimental evidence for the effect of alcohol on transthyretin metabolism. *Clin Chim Acta*, 458:5-11, 2016. (査読有)

DOI: 10.1016/j.cca.2016.04.011

Ueda A, Ueda M, Nagatoshi A, Hirano T, Ito T, Arai N, Uyama E, Mori K, Nakamura M, Shinriki S, Ikeda K, Ando Y. Genotypic and phenotypic spectrum of CADAASIL in Japan: the experience at a referral center in Kumamoto University from 1997 to 2014. *J Neurol*, 262:1823-1836, 2015. (査読有)

DOI: 10.1007/s00415-015-7782-8

〔学会発表〕(計 20 件)

Shinriki S, Kanai A, Nagamachi A, Ezaki A, Ichinohe T, Inaba T, Matsui H. Involvement of Impaired Ribosome Biogenesis in Leukemogenesis. The 9th JSH International Symposium, 2018.

Shinriki S, Jono H, Maeshiro M, Nakamura T, Guo J, Li JD, Ueda M, Yoshida R, Shinohara M, Nakayama H, Matsui H, Ando Y. Loss of CYLD promotes cell invasion via ALK5 stabilization in oral squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2018, 2018.

神力悟, 松井啓隆. リボソーム生合成障害の白血病発症への関与. 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会, 2018.

神力悟, 金井昭教, 長町安希子, 一戸辰夫, 稲葉俊哉, 松井啓隆. リボソーム生合成異常が招く白血病発症メカニズムの検証. 第 80 回日本血液学会学術集会, 2018.

神力悟, 金井昭教, 長町安希子, 一戸辰夫, 稲葉俊哉, 松井啓隆. Involvement of impaired ribosome biogenesis in leukemogenesis. 第 77 回日本癌学会学術集会, 2018.

神力悟, 金井昭教, 長町安希子, 角野萌, 北村俊雄, 一戸辰夫, 稲葉俊哉, 松井啓隆. リボソーム生合成異常が招く白血病発症メカニズムの検証. 第 58 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2018.

神力悟, 松井啓隆. リボソーム生合成障害による造血器腫瘍発症の分子メカニズム. 第 22 回造血器腫瘍研究会, 2018.

Shinriki S, Jono H, Li JD, Nakamura T, Ando Y, Matsui H. Loss of tumor suppressor CYLD sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to EGFR-TKI. 15th international congress of therapeutic drug monitoring & clinical toxicity (IATDMCT), 2017.

神力悟, 城野博史, 前城学, 中山秀樹, 安東由喜雄, 松井啓隆. CYLD の発現低下は口腔扁平上皮癌の EGFR 標的治療感受性を調節する. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会, 2017.

神力悟, 城野博史, 前城学, 中山秀樹, 安東由喜雄, 松井啓隆. CYLD の発現低下は口腔扁平上皮癌の EGFR 標的治療感受性を調節する. 第 57 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2017.

神力悟, 城野博史, 前城学, 中村拓哉, 安東由喜雄, 中山秀樹, 松井啓隆. CYLD loss modulates sensitivity to EGFR-targeted therapies in oral squamous cell carcinoma. 第 76 回日本癌学会学術集会, 2017.

神力悟, 松井啓隆. リボソーム生合成経路の障害による造血器腫瘍の発症メカニズム. 第 21 回造血器腫瘍研究会, 2017.

神力悟, 城野博史, 安東由喜雄, 松井啓隆. CYLD は頭頸部扁平上皮癌における EGFR 標的治療の感受性制御因子である. 第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2016.

神力悟, 城野博史, 中村拓哉, 篠原正徳, 安東由喜雄, 松井啓隆. Loss of CYLD promotes cell migration via ALK5 stabilization in oral squamous cell carcinoma. 第 75 回日本癌学会学術集会, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

日本薬学会, 東京化学同人, 知っておきたい臨床検査値, 第 2 版. 2019, 168-173.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織
分担者なし