

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08774

研究課題名(和文)大腸癌先進部の細胞塊の代謝とリンパ管浸潤

研究課題名(英文)Cell cluster at the invasion border of colon cancer: Thier metabolism and lymphatic invasion.

研究代表者

清川 悦子(KIYOKAWA, Etsuko)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80300929

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)：大腸癌浸潤先進部の簇出や低分化胞巢(PDC)は、細胞分裂が行われず少数の細胞で留まっていると考え、栄養要求性の低い細胞株を単離を試みたが、安定して栄養要求性の低い細胞を得ることが出来なかった。リンパ節転移をする子宮体癌同系マウス移植モデルのイメージング系を構築し内腔に存在する細胞塊が浸潤に関わる可能性が考えられた。

ヒト外科材料のPDCを免疫染色したところEzrinが不均一な発現パターンを示すことから、その不均一性を定量化する方法を確立し、予後と関連することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活の欧米化に伴い我が国では大腸癌は増加している。癌患者の予後を決めるのは、浸潤・転移の有無であり、同じ患者の癌組織でも、性質の異なる癌細胞がいて、どの細胞が浸潤・転移を担うのか不明であるため、適切な治療が確立されていない。本研究では浸潤・転移を担うのは、浸潤端にある細胞塊であると仮定し、細胞塊の性質を明らかにすることで、長期的には癌患者の予後を改善することに役立つと考えている。

研究成果の概要(英文)：Since budding and poorly differentiated clusters (PDC) in the invasive front of colorectal cancers are thought to remain in small numbers of cells without cell division, we attempted to isolate cell lines with low nutritional requirements, but failed to obtain stable cells with repetitive low nutritional requirements. We constructed the 2-photon imaging system of the uterine corpus cancer in syngeneic mouse transplantation model, and found the possibility that the cell mass which existed in the lumen of the gland can be related to the invasion to the surrounding tissues.

When PDC of human surgical material was immunostained, Ezrin showed the heterogeneous expression pattern. We established the method for quantifying the heterogeneity, and found that it correlates with the prognosis.

研究分野：実験病理学

キーワード：大腸がん 浸潤 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化に伴い我が国では大腸癌は増加しており、癌患者の予後を決めるのは、浸潤・転移の有無である。腫瘍細胞が転移するには周囲間質に浸潤し脈管に到達する過程が必須であり、大腸癌の先進部では 2 種類の細胞塊が知られている。簇出 (Budding) は、「癌発育先進部間質に浸潤性に存在する単個または 5 個未満の構成細胞からなる癌胞巢」、低分化癌胞巢 (Poorly Differentiated Cluster、以下 PDC と略) は、「5 個以上の細胞から成る比較的大型の腺腔形成の乏しい癌胞巢」と定義される。2004~7 年の大腸癌研究会の報告では、簇出や PDC が早期癌のリンパ節転移の指標になるとして有用であるとされ、この所見がない症例は予後良好の可能性が示されている (防衛医大・上野、Surgery, 2015)。更に、肝転移が認められた症例 411 例では、簇出はリンパ管浸潤と相関があるが血管浸潤とは関連がなく、肺転移や腹膜播種の頻度と相関があった。最新のデータでは 7821 例の大腸癌において、簇出はリンパ節転移、癌の再発、癌関連死の増加と相関があることが報告された (Rogers, Br J Can., 2016)。

申請者はこれまでに、K-Ras 活性化型変異を持つマウス大腸癌細胞株 Colon26 (以下 C26 と略) を同系の BALB/c マウスの脾臓に移植後、肝転移巣から細胞を単離し、更に脾臓に移植するサイクルを繰り返し、肝転移好性の細胞株 Liver Metastatic 4 (以下 LM4 と略) を得た。C26 は培地を交換しないと死に陥ることに着目し、両者を比較したところ、C26 はグルコースを大量に消費するため培養皿の限られた条件ではグルコース飢餓により死に陥るが、LM4 はグルコースの他にグルタミンを栄養源として用い、生きながらえることがわかった。この結果は、癌細胞の代謝は不均一で、グルコース要求性が低い細胞はグルコース濃度が低い細胞よりも転移しやすいことを示している。

2. 研究の目的

(1) 簇出や PDC が少数の細胞で留まっている点に着目し、「簇出や PDC のような細胞塊は栄養要求性が低く、細胞分裂をせずに集団細胞移動し、リンパ管に到達する」という仮説を立て、培養細胞株をマウスに移植する実験にて検証する。

(2) ヒト外科材料を用いて、簇出や PDC を構成する細胞群の性質を明らかにする。

3. 研究の方法

マウスと培養細胞を用いた実験では、「(1) . 低栄養培養で生き残る細胞株の取得」を行い転移能を調べる。「(1) - 2 光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング」を行い、リンパ管浸潤特異的な分子機構を詰め、直接の証拠となるリンパ管浸潤の瞬間を捉える。並行して、「(2) 免疫染色による外科材料先進部での評価」を行う。

4. 研究成果

(1) . 低栄養培養で生き残る細胞株の取得

まず、栄養要求性が低いがん細胞を取得するために、培地交換なしに数日培養して生き残ったマウス大腸癌由来細胞株 (Colon26、CMT-93) およびヒト由来大腸癌細胞株 (K-RAS G13 変異を持つ HCT116) を複数株取得した。低栄養下での生き残り細胞として単離した細胞であっても、その後生存率を見ても親株と同等であり、生存を決めるのは一過性の環境に適応した細胞であることがわかった。また脈管中の浮遊しながら生き残る細胞群として、振盪培養して上清中で生き残る細胞も LM4 から単離した。浮遊で生き残る LM4 細胞は細胞同士が接着し細胞塊として生育する。がん患者の血中内には Circulating Tumor Cluster (CTC) という細胞塊は、がんの再発に重要であると考えられており、そのマーカーとして EpCAM が知られている。この LM4 の浮遊細胞群での EpCAM の発現を調べてみたところ、親株である C26 細胞と差がなかったことから、従来の CTC のモデルとは異なることが示唆された。LM4 浮遊細胞塊を皮下に移植してもリンパ節転移は確認出来ず、腹腔内に移植しても、浮遊しない細胞群と比べて増殖能に差がなかったことから、試験管内で浮遊して生存することと生体内での転移は関連がないことがわかった。

CMT-93 細胞は大腸癌由来細胞であるが、そのゲノム変異は未だ明らかにされていない。そこで、大腸癌の半数で変異が知られている癌遺伝子 K-Ras の活性化変異体を発現させてみたところ、脾臓に移植した場合肝臓への転移をするようになり、また皮下に移植したところ、腺管や細胞塊を形成しつつ増殖するようになった。しかし、皮下移植した場合でも付属リンパ節に転移を示すことは無く、大腸癌由来細胞株を担癌させるマウスモデルでは、リンパ節転移モデルを構築することが出来なかった。

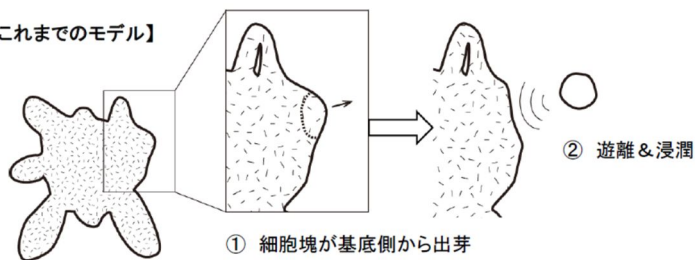
以上の実験を進行する間、LM4 細胞は C26 細胞に比べて、抗生物質 Puromycin に耐性であることがわかった。Puromycin は 3' end of aminoacyl-tRNA のアナログであり蛋白質の翻訳阻害を引き起こすことが知られている。また、大腸癌の治療薬である fluorouracil (5-FU) や、シスプラチンにも耐性であることがわかった。また九州大学・三浦岳教授が開発した、生体内の流速を再現した血管内皮細胞静水圧灌流培養イメージングの系を用いて、LM4 細胞が血管から遊出する像を捉えることが出来た。3 次元の画像解析では、細胞が突起を形成する様子が観

察されており、内皮細胞との相互作用より細胞形態が変化する可能性が示唆された。近年の報告ではリンパ節に転移した腫瘍細胞がリンパ節内の血管に侵入する新たな転移機構が明らかにされてきていることから (Pader, TP ら、Science, 2018)、リンパ節に向かう過程だけでなく、リンパ節から転移が起こる過程についても考察する必要性があり、この新規イメージングシステムを応用することで、解析できる可能性がある。

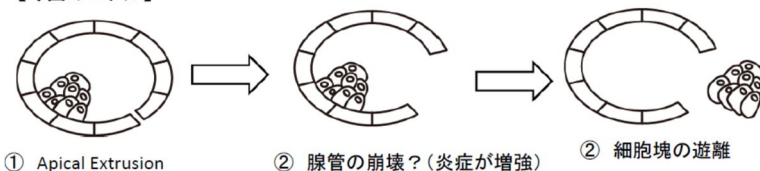
(1) - 2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング

上述のように大腸癌由来細胞株からはリンパ節転移を起こす細胞が取得できなかったので、別のシステムを探索したところ、千葉県がんセンター筆宝・丸博士らが開発したマウス子宮体癌由来のオルガノイドを皮下に移植すると、高率に肺・リンパ節に転移するシステムに行き当たった。免疫不全マウスだけでなく同系の C57BL/6 に移植しても転移を見ることから、生体内の免疫反応も含めて観察できるシステムであることを確認した。

【これまでのモデル】



【今回のモデル】



病理標本での組織を観察すると、皮下腫瘍でも肺、リンパ節でも、アピカルへの腫瘍細胞の遊離が目立つ印象があり、これは、アピカルに抜けた細胞は通常はアポトーシスを起こすが(アノキス)、活性化型 K-RAS の発現では死なくなるため、それを見ている可能性が示唆された。また好中球浸潤も目立ち、腫瘍周辺では腺管を構成する細胞が菲薄化しているように見える部位もあり、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患での腺管

の菲薄化が連想される。これまで出芽は基底側から単細胞や細胞塊が遊離することで起きていたが、アピカルに抜けて生存している細胞が腺管から逸脱するという新たなモデルを示唆するものである(上図)。

マウス皮下ウインドウは磁石付きの金属板とカバーガラスを用いてマウスの大腿部に移植することで、2光子励起顕微鏡にてライブイメージング中の体動の影響が比較的少なく観察できることがわかった。腫瘍の生育や浸潤には時間がかかるので、数日~1週間に一度のイメージングを行うことが必要になる。これと並行して、オルガノイドの数日にわたる試験管内イメージングも行ったところ、細胞塊の回転や細胞塊として細胞1個分程度の長さを持つ、長い突起を一過性に形成する像が観察された。乳癌や肺癌の研究では、突起形成が浸潤・転移能と関連するとの報告があり、今後この突起が細胞骨格や細胞接着斑と関連するかどうかなど、詳細を調べる必要がある。

(2) 免疫染色による外科材料先進部での評価

ヒト大腸癌病理検体において、代謝および転移・浸潤に関与する蛋白質群 15 個に対する発現、および活性化(リン酸化抗体を用いて検出)を調べるために、通常腺管構造のみから成る大腸癌症例、細胞塊を持つ大腸癌症例を 5 例づつ選び、染色条件を検討した。手術例であるので、虚血からホルマリン固定までの時間が異なるためと思われるが、全ての症例でコンスタントに

図1 PDCにおける Ezrinの不均一な発現

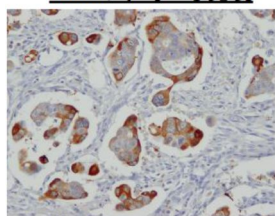
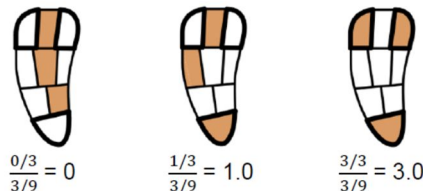
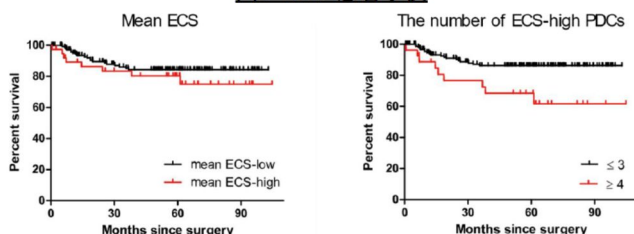


図2 ECSの算出方法



染色される抗体は少なかった。そのなかで Ezrin に対する抗体はほとんどの症例で染色することが出来、また染色像が特徴的であった(左図1)。それは、癌細胞 5 個以上から成る低分化胞巣(PDC)の角にある細胞に陽性率が高いことである。そこで PDC を持つ大腸癌ステージ I-III の 184 症例の病理標本の浸潤端の標本を Ezrin 抗体で染色し、Ezrin が PDC の角の発現する割合を算出し、Ezrin Corner Score (ECS) と命名した(左図2)。更に

図3 ECSと患者予後



ECSの患者ごとの平均値と、ECS値が高いPDCの数を患者ごとに求めた。両指標はリンパ管浸潤、極性が逆転している細胞塊 Micropapillary (MP)成分と有意に関連があった。また、前者の指標では予後が悪い傾向があるものの有意差はなく、後者の指標では有意に予後が悪かった(上図3)。これまでの報告から、PDCとMPの相同性が議論されており、PDCが悪性化してMPになるとのモデルが提唱されている。我々が今回得た結果からも、PDCの数が増え、極性が反転するというようにPDCが悪性化していく過程で、EzrinがPDCの角に位置する細胞が陽性である率が高くなることが示唆された。Ezrinはアクチン骨格の制御に関連する蛋白質であり、上皮間葉転換(EMT)で発現が上昇することが知られているので、PDCの悪性化に伴い、PDCの角にある細胞が間葉系細胞に転換することが、PDCの浸潤能に何らか関与していると考えられる。一般にEMTの細胞は細胞の増殖が遅くなることも知られているので、増殖能の低下と浸潤・転移はなんらか関係している可能性も示唆された。次に、このEzrin陽性細胞の性格を明らかにするために、細胞周期のマーカーであるKi-67と老化のマーカーであるp16にて免疫染色を行った。Ki-67とp16は互いに相補的な発現をしていることがわかり、PDCではKi-67の染色が低下している傾向があった。Ezrin陽性細胞における細胞周期と老化の関連を明らかにするために、パラフィン切片を用いた2重免疫染色を試みるために、茶(DAB)、赤(PerIRed)、青(PerIBLue)によって、3つの蛋白質を同時に染色することを試みている。抗体の反応の順列組合せを検討し、最適な染色プロトコルを確立しているところである。

ヒト大腸癌病理検体の1例で細胞塊が目立つ症例において、50枚ほどの連続切片を作製し、HE染色を行い、簇出・低分化癌胞巢の3次元組織像を構築した。簇出は原発巣と連続しているというこれまでの報告があるが、我々の標本では原発巣とは連続していなかった。

免疫染色は組織の虚血から固定までの時間やホルマリン固定の時間などにも左右されるので、外科手術中に採取した標本を用いて、リン酸化抗体などの信号伝達に關与する抗体群(前年度までにホルマリン標本での染色で検出が出来なかったもの)を調べたが、染色像が改善することはなかった。また採取した検体はオルガノイド培養を行い、ライブイメージングを行ったが、症例によって動態が異なっており、腺管融合や粘液産生など、これまで培養細胞でのオルガノイドでは見られなかった形態・動態がされた。これらの形態・動態がリンパ節転移や予後と相關するかどうか、オルガノイドを免疫不全マウスに移植して調べるのが今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirata E., Kiyokawa E	4. 巻 20
2. 論文標題 ERK activity imaging during migration of living cells in vitro and in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20030679.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aikawa Akane, Fujita Hideto, Kosaka Takeo, Minato Hiroshi, Kiyokawa Etsuko	4. 巻 110
2. 論文標題 The clinicopathological significance of heterogeneic Ezrin expression in PDC s of colorectal cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2667-2675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 7件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清川悦子、平田英周
2. 発表標題 活性化型K-RASによって誘導される細胞塊の回転
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 清川悦子
2. 発表標題 動く細胞を見るライブパソロジー
3. 学会等名 浜松医大 基礎医養成セミナーシリーズ（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相川あかね、藤田秀人、小坂健夫、湊宏、清川悦子
2. 発表標題 結腸直腸癌の微小乳頭状領域および低分化胞巣におけるEzrin蛋白の免疫組織化学的検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 ライブイメージングでみる細胞集団移動
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 肝転移性大腸がんの代謝と遺伝子発現
3. 学会等名 第37回分子病理学会研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清川悦子、平田英周
2. 発表標題 MDCK cyst rotation as a model of ductal or acinous cancer cell collective invasion
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 虚血によって引き起こされた小腸潰瘍の修復上皮のライブイメージング
3. 学会等名 第106回 日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田英周、清川悦子
2. 発表標題 腺管型がん細胞集団浸潤機構としてのMDCKシスト回転の動的解析
3. 学会等名 第69回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 肝転移性大腸癌株の単離とその分子生物学的特徴
3. 学会等名 第36回分子病理学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田英周、清川悦子
2. 発表標題 腸管・腺房型がん細胞集団浸潤機構としてのMDCKシスト回転の動的解析
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 虚血によって引き起こされた小腸潰瘍の修復上皮のライブイメージング
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相川あかね、清川悦子
2. 発表標題 結腸直腸癌の低分化胞巣におけるEzrin蛋白の特徴的染色パターンに着目した臨床病理学的検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 Active K-RAS induces the rotation of epithelial cells: A model for collective cell invasion in vitro
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤岡正喜、清川悦子
2. 発表標題 肝転移性大腸がん細胞株の樹立およびその分子生物学的特徴の検討
3. 学会等名 第38回分子病理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤岡正喜、清川悦子
2. 発表標題 肝転移行性大腸がん細胞株の樹立およびその分子生物学的特徴の検討
3. 学会等名 第16回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 上皮細胞移動のイメージング
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会のワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 Imaging of epithelial cell dynamics in vitro and in mice
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 オルガノイドのライブイメージング
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川悦子
2. 発表標題 細胞移動のライブイメージング
3. 学会等名 第868回 千葉県がんセンター研究所集談会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究分担者	湊 宏 (MINATO Hiroshi) (10293367)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	