

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10589

研究課題名(和文) 消化器癌の悪性化蛍光イメージング技術の開発と抗転移療法への応用

研究課題名(英文) Imaging system for progression of gastrointestinal cancer and its application to anti-metastasis therapy

研究代表者

西崎 正彦(Nishizaki, Masahiko)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30379789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：転移や播種を認める消化器癌患者は予後不良であり、転移や播種を予防する抗転移療法の開発は重要な課題である。本研究では、上皮間葉移行(EMT)を蛍光イメージングできる大腸癌細胞を用いてEMTを阻害する薬剤のスクリーニング系を開発した。抗炎症薬剤のアスピリンは炎症性サイトカインによって誘導されるEMTを抑制し、予防投与によって大腸癌の腹膜播種転移を抑制する事を明らかにした。今後は他の消化器癌の転移や播種に対するアスピリンの予防効果の検証が重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、抗炎症薬剤として大腸癌の発生予防に効果があると考えられてきたアスピリンが炎症性サイトカインによるEMT誘導に対する阻害作用を介して大腸癌の腹膜播種の予防にも効果を発揮する新たな治療戦略となる可能性を示唆している。転移や播種を有する消化器癌患者の予後は不良であり、転移を予防する抗転移療法の開発研究は消化器癌患者の生命予後の改善につながるため社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Patients with metastatic and disseminated gastrointestinal cancers show poor prognosis and the development of anti-metastasis therapy to prevent cancer metastasis and dissemination is an important issue. Here, we developed a drug screening system using colorectal cancer (CRC) cells with fluorescence probe for epithelial-mesenchymal transition (EMT). Anti-inflammatory drug aspirin inhibited inflammatory cytokine-induced EMT and prevented peritoneal dissemination of CRC cells. In the future, we need to evaluate the therapeutic effect of aspirin in the metastasis and dissemination of non-CRC cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 転移 蛍光イメージング EMT アスピリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化器癌は、早期診断・早期治療の普及によって予後の改善が認められるようになったが、診断時に転移や播種を有する消化器癌患者は依然として予後不良である。さらに、手術後に再発し、転移や播種を認める消化器癌患者の生存率も依然として低い。そのため、消化器癌患者の予後を改善するためには、転移や播種形成のメカニズムを解明し、転移や播種に対する有効な治療法の開発が強く求められている。

消化器癌が転移や播種を形成する過程において、上皮間葉移行 (EMT) の関与が強く示唆されている。EMT は、上皮系癌細胞が悪性化に伴い間葉系癌細胞へと形質が変化する現象で、EMT 癌細胞は遊走性や浸潤性が増強し、転移や播種を形成すると考えられている。一方、癌細胞に EMT を誘導する因子として周囲の微小環境の関与が示唆されている。特に、マクロファージを主体とする炎症性微小環境や線維芽細胞を主体とする間質性微小環境が EMT を誘導する事が知られている。しかし、消化器癌の転移と微小環境の関係は未だ不明な点が多い。そのため、微小環境による EMT 誘導を介した消化器癌の転移に対する有効な治療法は未だ確立していない。

我々は、これまで癌特異的増殖型アデノウイルスによる緑色蛍光タンパク質 (GFP) 誘導技術を利用してマウス生体内に転移する微小消化器癌細胞の可視化や消化器癌患者の血液検体を用いた転移性循環癌細胞の検出技術の開発を行ってきた。一方、消化器癌細胞の発生や悪性を誘導する因子として炎症性微小環境や間質性微小環境の関与を明らかにしてきた。そこで、我々は EMT 癌細胞を可視化するイメージング技術を開発する事で、EMT 誘導メカニズムの解明や EMT 阻害剤のスクリーニングによる抗転移療法の開発に応用できるのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、EMT をリアルタイムに可視化できる消化器癌細胞株を樹立し、悪性を促進する微小環境やその分子メカニズムを明らかにし、さらに薬剤スクリーニング系を開発する事で抗転移薬剤候補を同定し、動物モデルを用いて抗転移薬剤候補の治療効果を検証する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) EMT 可視化癌細胞の樹立

間葉系マーカー遺伝子ビメンチンのプロモーター制御下に赤色蛍光タンパク質 (RFP) を誘導する EMT 可視化プローブを作製する。ヒト大腸癌細胞株 (HCT116、RKO) に EMT 可視化プローブ搭載プラスミドを遺伝子導入し、限界希釈法によって EMT 可視化癌細胞株の候補クローンを確保する。複数のクローンを樹立して、炎症性サイトカインや増殖因子を処理して RFP 発現や形態の変化を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察する。RFP 発現の変化と上皮系マーカーや間葉系マーカーとの関係はウェスタンブロット法で確認する。

#### (2) EMT 可視化癌細胞の可塑性の検討

EMT 可視化癌細胞における RFP 発現の可塑性を明らかにするために、EMT 可視化癌細胞に EMT を誘導した後に EMT 誘導因子を除去して RFP 発現と形態変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

#### (3) EMT 誘導性微小環境の検討

生体内の炎症性微小環境を想定して EMT 可視化癌細胞と炎症性マクロファージの共培養を行う。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を LPS で刺激した場合に炎症性サイトカインの継続的な放出を ELISA 法で確認する。LPS で刺激した炎症性マクロファージを EMT 可視化癌細胞と共培養し、RFP 発現誘導や形態変化を共焦点レーザー顕微鏡で確認する。

#### (4) EMT 可視化癌細胞を用いた薬剤スクリーニング系の開発

EMT 阻害剤のスクリーニング系を開発するために、96 ウェルプレートに様々な条件でまいた EMT 可視化癌細胞に EMT 誘導因子を添加し、マイクロプレートリーダーを用いて RFP 蛍光強度を比較検出することで EMT 誘導を定量的に評価するための条件の最適化を行う。

#### (5) EMT 阻害剤の同定と EMT 阻害メカニズムの解明

EMT 可視化癌細胞の薬剤スクリーニング系を用いて、EMT 阻害効果を検討する。抗炎症薬剤の中から EMT 阻害効果を示す薬剤を同定する。EMT の阻害効果を観察できない場合は、他の薬剤を検討する。さらに、候補薬剤による EMT 阻害メカニズムを解析する。

#### (6) EMT 可視化癌細胞を用いた転移動物モデルの作製

生体内における癌細胞の EMT 状態を観察するために、EMT 可視化癌細胞に GFP を恒常的に発現するように遺伝子導入した細胞株を in vivo 用に作製する。EMT 可視化癌細胞を直腸、脾臓、腹腔内に移植して移植後 1 週間ごとに直腸腫瘍、肝転移腫瘍、腹膜播種腫瘍を免疫組織学的に解析する。

#### (7) 転移動物モデルを用いた EMT 阻害薬剤の治療効果の検証

ルシフェラーゼ発現癌細胞を直腸、脾臓、腹腔内に移植した腫瘍転移動物モデルを用いて、EMT 阻害薬剤の治療効果を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) EMT 可視化癌細胞の樹立

2種類のヒト大腸癌細胞株 (HCT116、RKO) に間葉系マーカー遺伝子ビメンチンのプロモーター制御下にRFPを誘導するEMT可視化プロンプを搭載したプラスミドベクターを遺伝子導入し、限界希釈法による癌細胞のクローン化を行った。次に、EMT可視化プロンプを遺伝子導入したHCT116細胞株とRKO細胞株に炎症性微小環境に関連する様々な炎症性サイトカイン (TNF-alpha、IL-1beta、TGF-beta) や増殖因子 (HGF、IGF-1、EGF、bFGF) を処理してRFP発現と形態変化を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察した。TNF-alphaとIL-1betaがRFP発現や遊走能の増加と細胞間接着の低下を誘導したが、それ以外のサイトカインや増殖因子はEMT様の形態変化を誘導しなかった。さらに、ウェスタンブロット法にて炎症性サイトカイン (TNF-alpha、IL-1beta) によるRFP誘導が上皮系マーカー (E-カドヘリン、サイトケラチン) の低下や間葉系マーカー (alpha-SMA) の増加と一致する事を確認し、RFP発現とEMTの関連性を確認した。

#### (2) EMT可視化癌細胞の可塑性の検討

EMT可視化癌細胞株におけるRFP発現の可塑性を明らかにするために、HCT116細胞株とRKO細胞株を炎症性サイトカイン (TNF-alpha、IL-1beta) で48時間処理してEMTを誘導した後に炎症性サイトカインを除去してRFP発現と形態変化を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察した。TNF-alphaやIL-1betaの除去後に RFP発現の低下とともに遊走能の低下や細胞間接着の増加を認めた。さらに、ウェスタンブロット法にてRFP発現の低下とともに上皮系マーカーの増加や間葉系マーカーの低下を確認した。

#### (3) EMT誘導性微小環境の検討

2種類の EMT 可視化ヒト大腸癌細胞株 (HCT116、RKO) を用いて生体内の炎症性微小環境を想定した炎症性マクロファージとの共培養を行った。まず、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を LPS で刺激した場合に炎症性サイトカインである TNF-alpha と IL-1beta の継時的な放出を ELISA 法で確認した。LPS で刺激した炎症性マクロファージ (RAW264.7) を HCT116 細胞株と共培養したところ、HCT116 細胞株の RFP 発現誘導を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。炎症性マクロファージの共培養による HCT116 細胞株の RFP 発現誘導における炎症性サイトカインの関与を明らかにするために、抗 TNF-alpha 中和抗体や抗 IL-1beta 抗体を添加して炎症性サイトカインの効果を阻害した場合に RFP 誘導が抑制されることを確認した。

#### (4) EMT 可視化癌細胞を用いた薬剤スクリーニング系の開発

EMT 阻害剤のスクリーニング系を開発するために、96 ウェルプレートに様々な条件でまいた EMT 可視化 HCT116 細胞株に炎症性サイトカイン (TNF-alpha、IL-1beta) を添加し、マイクロプレートリーダーを用いて RFP 蛍光強度を検出することで定量的に評価するための条件の最適化を行った。EMT 誘導に最適な細胞数として 10,000 細胞/ウェル、炎症性サイトカインの処理時間として 48 時間に決定した。

#### (5) EMT 阻害薬剤の同定と EMT 阻害メカニズムの解明

EMT 可視化ヒト大腸癌細胞株の薬剤スクリーニング系を用いて 8 種類の抗炎症薬剤 (アスピリン、サリチル酸、サリチル酸ナトリウム、イブプロフェン、インドメタシン、セレコキシブ、アセトアミノフェン、フェナセチン) の EMT 阻害効果を検討した。8 種類の抗炎症薬剤の中から EMT 阻害効果を示す 3 種類のサリチル酸系薬剤 (アスピリン、サリチル酸ナトリウム、サリチル酸) を同定した。一方、2 種類の非ピリン系薬剤 (アセトアミノフェン、フェナセチン) は EMT 誘導因子の有無に関わらず EMT を誘導する効果がある事を観察した。

#### (6) EMT 可視化癌細胞を用いた転移動物モデルの作製

生体内の原発巣や転移巣における癌細胞の EMT 状態を観察するために、EMT 可視化ヒト大腸癌細胞株 (HCT116) に GFP を恒常的に発現するように遺伝子導入した細胞株を作製した。この HCT116 細胞株をヌードマウスの直腸、脾臓、腹腔内にそれぞれ移植して移植後 1 週間、3 週間に直腸腫瘍、肝転移腫瘍、腹膜播種腫瘍を免疫組織学的に解析した。GFP 陽性直腸腫瘍の浸潤部に RFP 陽性癌細胞を観察し、移植後 1 週間、3 週間の GFP 陽性肝転移腫瘍にモザイク状に RFP 陽性癌細胞を観察した。RFP 陽性癌細胞の周囲には IL-1beta 陽性マクロファージの存在を確認した。移植後 1 週間の GFP 陽性腹膜播種腫瘍にもモザイク状に RFP 陽性癌細胞を観察した。

(7) 転移動物モデルを用いた EMT 阻害薬剤の治療効果の検証

ルシフェラーゼ発現 HCT116 細胞株を腹腔内に移植した腹膜播種モデルを用いて、移植 1 週間前からアスピリンを予防的に連日投与した場合に腹膜播種の形成が有意に抑制されることを確認した。一方、アスピリンを移植 1 週間後から連日投与した場合は腹膜播種の形成は抑制できなかった。

以上の結果から、EMT 可視化癌細胞を用いた薬剤スクリーニング系の開発は EMT 阻害効果を示す薬剤の選択に有用であった。薬剤スクリーニング系で選択されたアスピリンは、大腸癌の腹膜播種に対する抗転移療法の有望な薬剤候補である可能性が示唆された。今後はアスピリンの EMT 阻害メカニズムを解明するとともに、他の消化器癌の転移や播種に対するアスピリンの治療効果を検討することが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ieda T, Tazawa H, Okabayashi H, Yano S, Shigeyasu K, Kuroda S, Ohara T, Noma K, Kishimoto H, Nishizaki M, Kagawa S, Shirakawa Y, Saitou T, Imamura T, Fujiwara T	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment-colorectal cancer network	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52816-z	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tazawa H, Ieda T, Yano S, Kikuchi S, Kuroda S, Ohara T, Noma K, Kishimoto H, Nishizaki M, Kagawa S, Saitou T, Imamura T, Fujiwara T.
2. 発表標題 Visualization of epithelial-mesenchymal transition in inflammatory microenvironment-colorectal cancer network in vitro and in vivo.
3. 学会等名 109th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田澤 大、家田偉史、矢野修也、重安邦俊、黒田新士、大原利章、野間和広、岸本浩行、西崎正彦、香川俊輔、白川靖博、齋藤 卓、今村健志、藤原俊義
2. 発表標題 炎症性微小環境 大腸がんクロストークにおけるEMTイメージング
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 Ieda T, Tazawa H, Kikuchi S, Kuroda S, Ohara T, Noma K, Kishimoto H, Nagasaka T, Nishizaki M, Kagawa S, Fujiwara T.
2. 発表標題 Fluorescence-guided spatiotemporal dynamics of epithelial-mesenchymal transition under inflammatory microenvironment during colorectal cancer progression.
3. 学会等名 108th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 家田偉史、田澤 大、菊地覚次、黒田新士、大原利章、野間和広、岸本浩行、永坂岳司、西崎正彦、香川俊輔、今村健志、藤原俊義
2. 発表標題 EMT-がん微小環境ネットワークの蛍光生細胞イメージングシステム
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 岡林弘樹、田澤 大、家田偉史、矢野修也、菊地覚次、黒田新士、西崎正彦、香川俊輔、今村健志、藤原俊義
2. 発表標題 解熱剤のアスピリンはEMT阻害作用を介して大腸がんの腹膜播種を抑制する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡林弘樹、田澤 大、家田偉史、矢野修也、菊地覚次、黒田新士、西崎正彦、香川俊輔、今村健志、藤原俊義
2. 発表標題 解熱剤のアスピリンはEMT阻害によって大腸がん腹膜播種を抑制する
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
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	田澤 大  (Tazawa Hiroshi)  (90415513)	岡山大学・大学病院・准教授    (15301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	家田 偉史  (Ieda Takeshi)		
研究協力者	岡林 弘樹  (Okabayashi Hiroki)		