

令和元年6月19日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17612

研究課題名(和文) 癌細胞のデス小胞が惹起する新規なCAFリード型の癌浸潤プロセスの解明

研究課題名(英文) Study of novel CAF led-type cancer invasion triggered by cancer death vesicles

研究代表者

伊藤 剛 (Itoh, Go)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60607563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌の蔓延の過程では、様々な浸潤様式が存在する。1つは圧排性増殖型の浸潤であり、癌細胞集団がその増殖と共に徐々に拡大する。もう1つは癌関連線維芽細胞(CAF)を含む間質細胞との相互作用によって促進される、より広範となる浸潤である(播種型の癌)。本研究では、CAFが胃癌細胞において一定数のアポトーシスを誘導し、それが癌細胞による圧排性増殖型の浸潤を防ぎ、代わりにCAF主導の広範囲の浸潤を促進することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

圧排性増殖型の浸潤癌は癌患部の切除によって根治可能である。一方、播種型浸潤の癌における予後は良くない。これらの浸潤型の選択メカニズムは不明であった。本研究では、世界に先駆けてこのメカニズムに注目し、その成果を論文報告した。今後、播種性浸潤の抑制に繋がる研究を進め、癌治療へ繋げることを目指している。

研究成果の概要(英文)：There are different modes of invasion in the process of cancer spread. One is expansive invasion, in which a group of cancer cells gradually expands along with cancer cell proliferation. The other is a more extensive invasion promoted by interactions with stromal cells, including cancer associated fibroblasts (CAF). In the present study, it was shown that CAF induces a certain number of apoptosis in gastric cancer cells, which prevents the cancer-expansive invasion, and instead promotes CAF-led widespread invasion.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌関連線維芽細胞 癌微小環境 癌浸潤モード 癌ジオメトリー

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

1. 研究開始当初の背景

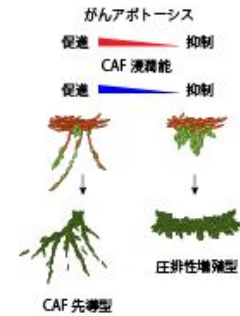
間質において、癌細胞は細胞間応答分子により周囲の正常線維芽細胞 (NF Normal Fibroblast) を癌関連線維芽細胞 (CAF Cancer Associated Fibroblast) へと変貌させる。CAF は癌細胞に先立って浸潤し、癌を牽引して間質への癌浸潤を亢進させる一面を有する。一方、NF は浸潤能が低く、癌細胞の牽引作用はない。

申請者は癌周囲の間質細胞が癌浸潤に与える作用を調べてきた。この過程で NF や CAF が一定量のスキルス胃癌細胞を殺すことを見出した。さらに、死に陥る癌は小胞 (デス小胞) を大量に放出し、これに刺激された CAF は運動性を向上させることを見つけた。

癌細胞死は癌の進展に大きな変化をおこした。胃癌浸潤と CAF をゲル上で共培養した場合、デス小胞に刺激された CAF はゲル深部へと浸潤し、引き続き癌細胞を牽引するため広範囲の癌浸潤となった。一転して、アポトーシス阻害剤 ZVAD の添加により癌アポトーシスを抑制すると CAF の浸潤は減衰し、癌細胞は圧排性増殖型のゲル浅部での浸潤を増加させることがわかった。

癌アポトーシスは癌細胞の DR4 デス受容体と CAF 由来のデスリガンドが関与する可能性が認められた。デス受容体の機能阻害を引き起こす DD (Death domain) -GFP を発現させた胃癌細胞では一連のアポトーシスは抑制され、圧排性の癌浸潤を示した。

NF も CAF も一定量の癌細胞を殺す。癌浸潤を促進しない NF では癌細胞の排除につながる防御機構となる作用が、一転して CAF では癌組織の浸潤様式を転換することでむしろ癌の進展を促すことを示してきた。



2. 研究の目的

申請者が見つけた新規の癌浸潤プロセスを詳細にする。癌アポトーシスのデス経路、およびアポトーシス小胞による刺激後の CAF 活性化経路を特定する。臓器での癌浸潤プロセスを明らかにし、実際の癌病態に近い状況での CAF リード型と圧排性浸潤型の癌浸潤様式の転換システムのモデルを提案する。

3. 研究の方法

a) 癌アポトーシスに作用する胃癌細胞のアポトーシス経路を特定する。CAF と各種癌細胞の接触による癌アポトーシスの有無を検討する。

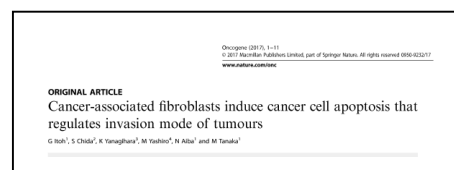
b) 癌浸潤様式の転換システムをモデル化する。癌アポトーシス促進・阻害効果後の癌浸潤を解析する。また、同定したデス関連因子や CAF 活性化分子の発現・活性を解析することで、最終的な浸潤形態 (圧排型、播種型など) を推測可能にする。

c) マウス組織への癌細胞移植実験により、特定した浸潤メカニズムが実際の癌浸潤形態や転移と繋がるか検証する。

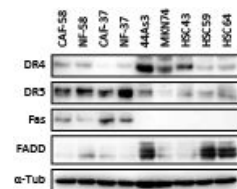
4. 研究成果

研究成果は、Oncogene 誌 (2017 年) にて報告した。

総説として Seikagaku 誌 (2018 年) Akita J Med 誌 (2018 年) に掲載された。

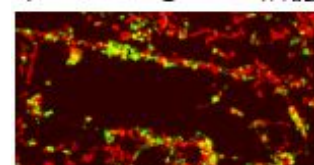


1) 先行研究で、CAF は 44As3 スキルス胃癌細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。この細胞死誘導メカニズムは HSC-44PE や 58As9 胃癌細胞と CAF の組み合わせでも存在することがわかった。一方で、HSC-59 胃癌細胞では細胞死は生じない。HSC-59 における DR4 発現が低いことが原因として考えられた。CAF による癌細胞死の誘導は特異性があることを示している。



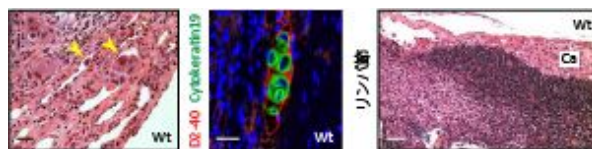
2) 44As3 癌細胞と CAF を共培養した場合、細胞間接着によって互いに接着し、癌細胞は CAF により運搬されることを明らかにした。CAF 由来の培養上清により 44As3 細胞を培養した場合、細胞死は低頻度に留まった。一方で、CAF と接着した 44As3 は 25% ほどの頻度での細胞死が認められた。

MyrPalm-EGFP-44As3 と DiI-CAF-37 の共培養



3) 癌細胞死とリンパ節転移の関連が認められた。腫瘍領域に対して癌マーカーである

Cytokeratin19 とリンパ管内皮マーカー D2-40 により組織免疫染色を行った結果、EGFP-44As3 細胞のリンパ節転移が認められたが、EGFP-DD-44As3 (*) 細胞の移植では観察されなかった。これらの結果から、CAF 誘導性の癌アポトーシスは生存した癌細胞における広域への癌浸潤 (CAF リード型) を可能とさせ、組織深部や他臓器への癌の播種・転移を導くことが示唆された。



* FADD の death domain (DD) フラグメントはデス複合体形成を妨害するドミナントネガティブとしての作用が報告されている。

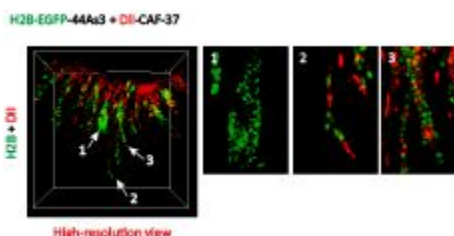
4) 癌細胞に対する CAF の割合が高くなると癌細胞死が亢進される。CAF の細胞密度が高くなることで癌細胞へと接着できる割合も高まり、癌細胞死の効率が向上することが予想された。3D ゲル浸潤アッセイにおいて、CAF に対して癌細胞の割合を高めると、圧排性型の浸潤モードに変化することが明らかとなった。

5) CAF の培養上清は 44As3 の増殖を促進することがわかった。これに関連して、CAF 培養上清により 44As3 における STAT3 のリン酸化が促進されることが明らかとなった。CAF は癌細胞死を誘導すると同時に、癌細胞の増殖を亢進することで癌の広域化に働くことが考えられた。

6) Embelin (*) 処理により、CAF 誘導性の癌細胞死が促進されることがわかった。Embelin 処理下で、CAF と 44As3 細胞の共培養による 3D ゲル浸潤アッセイを行うと、CAF リード型の癌浸潤が亢進された。

* アポトーシス阻害因子である IAP ファミリータンパク XIAP の阻害剤。

7) 圧排型と播種型の浸潤形態以外にもその中間系である新たな浸潤モードを見つけることができた。浸潤モードの決定に重要なファクターとして、CAF の浸潤速度と深度および癌細胞の増殖スピードを導くことに成功している (未発表)。



: 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

世界に先駆けて、播種型と圧排性増殖型の癌浸潤の選択に関わる新規浸潤システムについて報告できた。癌病態をより深く想定できる *in vitro* (細胞) と *vivo* (マウス個体) を包括した実験を試行していった。

細胞外小胞の新たな働きを示すことができた。CAF と接触した癌細胞はデス小胞を放出し、これに刺激された CAF は運動性を向上させることがわかった。小胞刺激後の CAF は組織深部へと浸潤し、引き続き癌細胞を牽引することで広範囲の播種型癌浸潤の原因となった。一転して、癌アポトーシスを抑制すると CAF の浸潤は減衰し、癌細胞は圧排性増殖型の組織浅部での浸潤を増加させることを明らかとした。

間質細胞は癌細胞によって刺激された場合、癌微小環境を亢進することで癌悪性を促進させる働きを持つが、一方では癌に対して抑制的である相反する影響を担っていることが報告されている。本研究において、NF も CAF も一定の割合で癌アポトーシスを誘導できるメカニズムを備えていることがわかった。CAF 誘導性である癌アポトーシスの分子メカニズムについて更に検討し、将来的に CAF の浸潤を減衰させ、癌アポトーシス誘導に働く一面のみを促進させることが可能となれば、NF と同様な癌抑制的な効果が期待できる。

5 . 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } (計 4 件)

1. Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment.

Umakoshi M, Takahashi S, Itoh G, Kuriyama S, Sasaki Y, Yanagihara K, Yashiro M, Maeda D, Goto A, Tanaka M.

Oncogene. 2018 年 11 月 (査読あり)

2. A study of wound repair in Dictyostelium cells by using novel laserporation.
Pervin MS, Itoh G, Talukder MSU, Fujimoto K, Morimoto YV, Tanaka M, Ueda M, Yumura S.
Sci Rep. (1) 7969 2018年5月 (査読あり)

3. Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment.

Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K.

Sci Rep. 8(1) 3888 2018年3月 (査読あり)

4. Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours.

Itoh G, Chida S, Yanagihara K, Yashiro M, Aiba N, Tanaka M.

Oncogene. 36(31) 4434-4444 2017年8月 (査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

1. 間質細胞と協調する巨大癌細胞の癌浸潤ジオメトリー

伊藤剛、田中正光

2018年9月27日 第77回日本癌学会学術総会

2. 間質細胞と協調する巨大癌細胞の癌浸潤ジオメトリー

田中正光、馬越通信、高橋壮、伊藤剛、栗山正、八代正和、後藤明輝

2018年9月27日 第77回日本癌学会学術総会

3. 細胞分裂時の細胞膜の動態制御機構の解明

田中真仁、伊藤剛、沖田圭介、祐村恵彦

2018年11月28日 第41回日本分子生物学会年会

4. 細胞性粘菌ダイナミンの細胞質分裂における機能解析

藤本甲子郎、伊藤剛、宮城島進也、上田太郎、祐村恵彦

2017年10月21日 日本細胞性粘菌学会

5. CAF (癌関連線維芽細胞) は癌細胞の細胞死を誘導することで癌浸潤モードを制御する

伊藤剛、田中正光

2017年9月30日 第76回日本癌学会学術総会

6. 細胞運動時の細胞膜動態とエンドサイトーシス

田中真仁、伊藤剛、祐村恵彦

2017年6月13日 日本細胞生物学会

7. 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

伊藤剛、田中正光

2017年5月27日 第83回日本生化学会東北支部例会

〔図書〕(計2件)

1. Mechanisms for determining a disseminated and expansive cancer invasion.

Itoh G and Tanaka M.

Seikagaku. 2018年

2. Cancer-stromal cells response controlled by death vesicles.

Itoh G and Tanaka M.

Akita J Med. 2018年

〔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

https://researchmap.jp/Itoh_Go

6 . 研究組織

(1)研究分担者：該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田中 正光

ローマ字氏名：Tanaka Masamitsu

研究協力者氏名：後藤 明輝

ローマ字氏名：Goto Akiteru

研究協力者氏名：八代 正和

ローマ字氏名：Yashiro Masakazu

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。