

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16851

研究課題名（和文）プロテオミクスを活用した体内循環腫瘍細胞塊のがん転移促進機序の解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cancer metastasis by circulating tumor cell clusters using proteomics for the exploration of novel therapeutic targets

研究代表者

佐藤 友美（Sato, Yumi）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト・特任研究員

研究者番号：10333353

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がんの死亡原因につながる体内循環がん細胞塊による遠隔転移確立メカニズムの解明を目指し、腫瘍組織から調整したがん細胞塊の接着過程における分子変動を解析した。

大腸がんから樹立したがん細胞塊は、転移過程で観察される細胞内極性変化や血管内皮細胞破壊能を維持していた。リン酸化プロテオミクス解析からがん細胞塊接着に伴い変動するキナーゼ活性やリン酸化シグナルを予測し、接着確立過程に関与する可能性がある分子を推定した。これら候補分子に対する阻害剤の中からがん細胞塊に対する接着阻害効果や細胞毒性を持つ阻害剤を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの転移は予後不良につながるため、転移メカニズム解明による転移予防、転移巣への治療法開発はがん克服につながることを期待される。

近年、従来研究に用いられていた樹立細胞株は体内の腫瘍組織の多くの性質を失っており、より腫瘍組織の性質を維持した三次元初代培養法が報告されるようになった。機器やサンプル調整法の改良により微量検体からの解析が可能となったプロテオミクス法を用い腫瘍組織由来三次元初代培養がん細胞塊の転移過程を解析することで、これまでの遺伝子発現解析とは異なる新たな関連分子、メカニズム解明につながる可能性があり、新規創薬標的の発見につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）： Since distant metastasis is a cause of cancer mortality, it is crucial to clarify the mechanism of metastasis by circulating tumor cells (CTCs) and CTC aggregates (CTC-clusters). CTC-clusters have higher metastatic potential than single CTCs, and therefore we adopted the Cancer Tissue-Originated Spheroids (CTOS), which are prepared from tumor tissue and retain the similar characteristics to CTC-clusters as a research model for metastasis.

Based on the phosphoproteomic analysis, we predicted kinase activities and phosphorylation signals that fluctuate during the adhesion process of cancer cell clusters and estimated candidate molecules involved in the adhesion process. Among the inhibitors for the predicted candidate molecules, we found inhibitors with adhesion-inhibitory and cytotoxic effects on suspension-cultured CTOSs.

研究分野：分子細胞生物学、腫瘍細胞学

キーワード：がん転移 初代三次元培養 プロテオミクス スフェロイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの死亡原因につながる全身性転移は血管内を循環する体内循環がん細胞 (circulating tumor cell : CTC) および細胞塊(クラスター)により生じており、予後の改善には遠隔転移の予防および治療が期待される。近年単細胞よりもがん細胞塊がより高い転移形成率を示すことが報告され、がん細胞塊による転移確立メカニズムの解明が重要と考えられるようになってきた。

大腸がんのような分化型腫瘍由来のがん細胞は基底膜-頂端 (アピカル) 膜方向の細胞内極性が存在している。我々はこれまでに転移確立時に細胞塊内の極性状態が反転する現象や、抗体による細胞塊表面分子の機能阻害が転移確立に重要な接着機能を抑制できることを報告しており、転移確立過程において細胞内極性変化や細胞塊表面分子からの情報伝達が重要であると考えられた。

しかしながら従来研究に用いられてきた樹立がん細胞株の多くは低分化なものが多く患者腫瘍が持つ多くの性質を失っている。また従来のプラスチックディッシュ上で二次的に培養した細胞と細胞塊を作らせた三次元培養では細胞内での遺伝子発現パターンや薬剤感受性、シグナル伝達経路などに違いがあるという報告が相次ぎ、近年では樹立細胞株よりも腫瘍組織からの初代培養が、二次元より三次元培養がより生体内を反映する培養系であると考えられるようになってきた。そのため多くの腫瘍組織からの三次元初代培養法が確立され報告されてきたが、申請者はその中の Cancer-Tissue-Originated Spheroid (CTOS) 法を用いた研究をしてきた。CTOS 法で調整、培養したがん細胞塊は腫瘍組織が持つ極性状態を維持しており、血中循環がん細胞塊が転移確立時に示した極性反転現象も再現できた。がん細胞塊表面分子に対して作製した抗体が接着機能を抑制することを見出したことから、CTOS は転移確立過程における分子メカニズム解明に有用な研究材料になると考えられた。

しかしながら細胞内シグナルを明らかにするには細胞塊表面にうけた接触刺激がどのように細胞塊内に伝達され変化が誘導されるのかを解明する必要があり、最初から特定の分子やシグナルに注目した解析では新たなシグナルの発見は難しい。刺激に対する細胞内の応答については遺伝子発現パターンの変動解析などが多く行われているが、細胞内において遺伝子発現よりも短時間で細胞間の情報伝達を担うものの一つにリン酸化シグナル変動があり、関連リン酸化シグナルは創薬標的としても重要である。遺伝子発現のように微量検体を増幅して解析することができないためリン酸化変動の検出は容易ではないが、近年の質量分析装置の改良や解析試料からリン酸化ペプチドを精製濃縮する方法などの確立により改良が進んでおり細胞内で生じているシグナル変動を予測するのに十分な情報を得られるようになってきている。このためプロテオミクスを用いた網羅的解析は従来の遺伝子発現解析では見出せなかった新たな転移確立メカニズムの解明につながることを期待できる。

2. 研究の目的

本研究では体内循環がん細胞塊の転移確立過程と同様の細胞内極性変化を再現できる腫瘍由来初代培養スフェロイド(CTOS)を用いて、浮遊培養状態からの接着確立過程において外部からの情報を受ける細胞塊表面分子および細胞間に生じている細胞内リン酸化変動をプロテオミクスにより網羅的に解析し、血中循環がん細胞塊の転移確立メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん由来初代培養スフェロイド CTOS 株の樹立

大腸がん患者から摘出された余剰腫瘍組織片を凍結保存し、提供を受けた腫瘍組織片を免疫不全マウス皮下に移植して患者腫瘍移植マウスモデル (Patient-derived tumor xenograft : PDX)

を樹立した。マウス皮下で増幅した腫瘍組織から CTOS 法によりがん細胞塊を調整し、造腫瘍能、凍結保存における安定性、極性転換能を評価し安定して実験に使用可能か評価を行った。

(2) がん細胞塊 CTOS による血管内皮細胞バリア破壊機能評価

多孔膜が取り付けられた細胞培養インサート中で培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 上に CTOS を播種し血管内皮細胞とがん細胞の共培養を行った。一定期間共培養した後、蛍光標識デキストランを添加しインサート下に透過した蛍光を測定することで血管内皮細胞のバリア機能の変化を評価した。

(3) 微量検体からのリン酸化解析サンプル調整法検討

リン酸化変動を質量分析により解析する場合、大量のタンパク質試料からリン酸化ペプチドを精製濃縮することが必要だが、今回解析する初代培養がん細胞塊は準備できる細胞量が少なく増殖も遅いことに加え、体外での培養期間が長くなるのに伴い生体内での性質を失う。そこで少量の試料から効率よくリン酸化ペプチドを回収する必要がある。今回これまで用いてきた鉄イオンによるリン酸化ペプチド精製濃縮法の未吸着ペプチドを親和性の異なる二酸化チタンを用いて連続精製することでリン酸化ペプチドの回収量を増やす条件を検討した。

(4) がん細胞塊接着過程におけるプロテオミクス解析

免疫不全マウス皮下で増幅したヒト由来大腸がん腫瘍からがん細胞塊を調整し浮遊状態で培養を行う。その後コラーゲンコートしたディッシュ上に播種し接着した細胞塊を培養 1, 2, 3 日目に回収してプロテオミクス用サンプルを調整した。質量分析によりタンパク質量、リン酸化状態の変動情報を得た。

(5) In silico 解析による変動シグナルの探索

リン酸化プロテオミクス解析から得られたリン酸化変動情報からキナーゼ基質濃縮解析 (KSEA: Kinase-substrate enrichment analysis)法によりリン酸化酵素キナーゼの活性状態を予測した。がん細胞の接着過程においてリン酸化状態が大きく変動したタンパク質のオントロジー解析を行いリン酸化変動タンパク質群の機能予測を行ない、細胞接着現象に関与する分子、シグナル伝達経路を探索した。

(6) 候補シグナルの転移抑制能評価

In silico 解析から関連が予測されたシグナルの受容体やキナーゼに対する阻害剤を用い、がん細胞塊のコラーゲンコートディッシュへの接着阻害効果を評価した。さらに浮遊培養がん細胞塊と血管内皮細胞への毒性評価を行い創薬標的としての可能性を評価した。

4. 研究成果

(1) 大腸がん由来初代培養スフェロイド CTOS 株の樹立

提供を受ける大腸がん患者由来腫瘍組織片は摘出後すぐにマウスに移植できず、提供先からの輸送が必要であったため摘出後一旦凍結保存しておき、後日まとめて輸送した検体から PDX の樹立を試みた。

凍結保存時には細胞の凍結保存に用いられる 8~10% DMSO, 10% FBS 入り培地に加え、組織凍結にも使用可能とされている STEM-CELL バンカーと CryoStor について比較検討を行った。

腫瘍組織片 3 検体を用いた検討結果では、約 1 か月の凍結保存後、2 検体が免疫不全マウス皮下に生着し腫瘍形成を確認できた。1 検体は生着しなかったが生着の可否は凍結保存液の種類による違いはなく、生着しない検体はどの凍結保存液でも腫瘍増殖しないという結果であった。

樹立できた PDX 2 株については調整したがん細胞塊 (CTOS) を長期にわたり凍結保存しても解凍後免疫不全マウス皮下での造腫瘍能を維持していた。CTOS は ES 細胞や iPS 細胞で推奨されてい

るガラス化法を用いて凍結保存をしていたが、この方法では液体窒素中での保存しかできず輸送などが煩雑である。腫瘍組織片凍結で検討に用いた凍結保存液は細胞、組織片、ES 細胞、iPS 細胞にも使用可能とされていたことから CTOS の凍結保存への使用を検討した。

どの凍結保存液も凍結保存後短期間では解凍後の増殖などに問題なく使用できていたが、凍結保存期間が 1 年半以上になると解凍後の生存率が著しく低下し腫瘍形成にも時間がかかるようになったため、ガラス化法以外の凍結保存液による保存は短期間に限定されると考えられた。

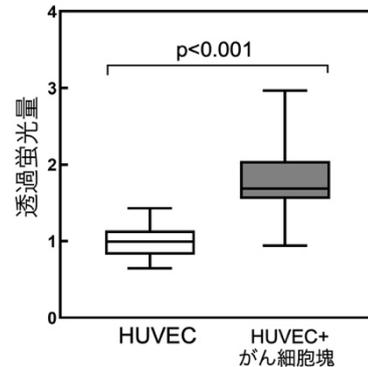
また PDX から調整したがん細胞塊は浮遊培養からゲル包埋培養へ移行後に極性状態が反転する現象も再現することができたため体内循環がん細胞塊の転移確立過程の解析モデルとしても使用可能と判断した。

(2) CTOS の血管内皮細胞バリア破壊機能評価

血中を循環しているがん細胞塊が血管内皮細胞に接着し遠隔転移を確立するには、血管内皮細胞が形成しているバリアを破壊し、血管から組織内に侵入することが必要である。そこで樹立した大腸がん CTOS が血管内皮細胞バリアを破壊する能力があるかを評価した。

血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈由来の HUVEC を先に多孔膜付きインサート内で培養しコンフルエント形成後にごん細胞塊を添加した。蛍光標識デキストランの透過量を継続的に測定したところ共培養 4 日目までは透過量が徐々に増加し 7 日以降ではほぼ一定に達したこと、HUVEC のみでも 10 日以上経過すると透過性が上がってくることから評価は共培養後 6-8 日目に行うことに決定した。その結果 CTOS 添加で有意に血管内皮細胞の透過性が亢進することが確認され、樹立したがん細胞塊 CTOS は転移形成時に重要となる血管内皮細胞のバリア破壊機能を維持していることが確認できた。(図 1)

図1. がん細胞塊による血管内皮細胞層破壊



(3) 微量検体からのリン酸化プロテオミクスサンプル調整法検討

これまでリン酸化プロテオミクスを用いてシグナル予測に十分なデータを取得するためにはミリグラムオーダーの細胞からのサンプル調整が必要であり樹立細胞株を用いた解析が行われてきたが、腫瘍から調整する初代がん細胞塊は数 100 μ g 程度しか準備ができず、体外での培養による細胞増幅は腫瘍の性質を消失するため望ましくない。

リン酸化ペプチドの精製濃縮法としては様々な金属イオンの持つ親和性を利用したものも多く、使用する金属イオンの種類によってリン酸化ペプチドへの親和性が異なることが報告されている。われわれは鉄イオンを用いた Fe-IMAC 法を採用していたが、二酸化チタンを用いた方法も広く普及していることから Fe-IMAC に吸着しなかったリン酸化ペプチドを連続的に二酸化チタンにより回収する方法を検討した。

二酸化チタンにより回収したリン酸化ペプチドは Fe-IMAC による回収サンプルに比べより親水性側である傾向があり二つの濃縮法を組み合わせることで同定リン酸化サイト数を 1.2~1.3 倍に増やすことができた。

(4) がん細胞塊接着過程における変動リン酸化シグナルの探索

浮遊培養から接着培養へ移行後 1, 2, 3 日目で回収した細胞をプロテオミクス解析に供した。接着過程においてタンパク量が 2 倍以上に変動したタンパク質は増加、減少共に約 50 種類であったがオントロジー解析では変動タンパク質に転移、接着に関連するような特徴は認められなかった。一方

でリン酸化状態が2倍以上変化したリン酸化部位は増加、減少それぞれ約1200ヶ所検出され、オントロジー解析でも細胞間接着、細胞極性、細胞骨格関連タンパク質で多くのリン酸化状態の変化が認められたことから、本解析により転移過程においてがん細胞塊内で生じている形態変化に伴う細胞間シグナル変動を捉えられたと考えられる。

KSEA法を用いたリン酸化酵素キナーゼの活性予測では接着過程で細胞増殖に促進的なCDKファミリーの活性低下と細胞運動や細胞接着に関与するEphA2に加え、mTORやcasein kinaseの活性化が予測された。この結果からコラーゲンへの接着によりがん細胞が増殖から形態変化、運動モードに転換している可能性が示唆された。タンパク質間相互作用データベース (STRING) を用いたリン酸化亢進タンパク質間の相互作用解析では、EGFRとErbB2が多くのリン酸化亢進タンパク質と相互作用していることが予測されたが、よりリン酸化状態が大きく亢進していたIGF1Rも比較的多くのリン酸化亢進タンパク質と相互作用が予測されており接着過程に関与が示唆された。EphA2でリン酸化状態の亢進が認められたのはリガンド非依存型 (non-canonical) 経路に関与するリン酸化部位であり、この部位のリン酸化には受容体型チロシンキナーゼの活性化に伴うmTOR経路の関与も報告されていることからEphA2のnon-canonical経路が関与している可能性が示唆された。

(5) 候補シグナルの接着関連評価

in silico解析の結果から接着過程でリン酸化状態が大きく変動し関連が示唆された分子に対する阻害剤61種類を用いて接着阻害効果を評価した(図2)。

評価実験に用いた阻害剤のうち7種類が接着阻害効果を示したため、これらについて浮遊培養がん細胞塊とHUVECに対する毒性を評価し、血管内皮細胞に毒性が低くがん細胞塊に対する毒性が高い阻害剤候補を得た。

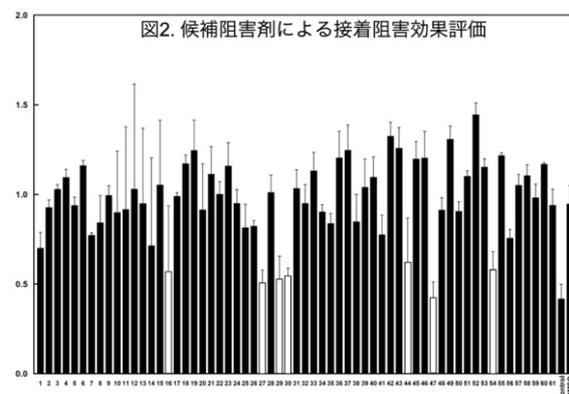


図2. 候補阻害剤による接着阻害効果評価

(6) 関連候補受容体のがん細胞塊内局在評価

接着過程に関与が示唆された受容体型キナーゼであるEphA2, IGF1Rの浮遊培養がん細胞塊内における局在を免疫染色法により確認したところ主に細胞間接着領域に存在しており細胞塊の表面に存在していなかった(図.3)。この結果から外部との接触を感知し細胞内にシグナルを伝達している細胞塊表面分子は別に存在している可能性が示唆された。

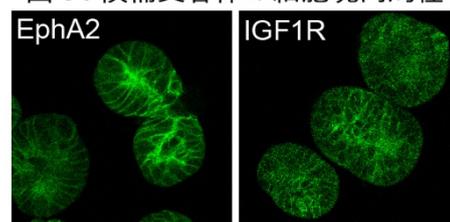


図3. 候補受容体の細胞塊内局在

今後は本研究で得た浮遊培養がん細胞塊に対して接着阻害や細胞毒性を示し、HUVECに対する毒性が低かった阻害剤についてマウスモデルを用いて転移抑制効果を評価し、生体内におけるがん転移抑制効果の可能性を検討することを予定している。また今回関連が予測された受容体が細胞塊表面に存在しなかったため、接着のきっかけとなる細胞塊表面の接触感知受容体を明らかにすることで転移確立のきっかけとなるシグナル伝達の全容解明につなげたいと考えている。

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 0件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤友美、井上正宏、朝長毅、足立淳
2. 発表標題 プロテオーム解析による体内循環がん細胞塊の生着メカニズムの探索
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------