

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06148・19K21262

研究課題名（和文）がん細胞の浸潤形態制御機構およびその意義の解明

研究課題名（英文）Mechanism of determining the invasive pattern of SCC

研究代表者

加藤 琢哉（Kato, Takuya）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：00551970

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍組織の形態学的特徴は病理医によるがんの診断において重要な意味を持つが、腫瘍形態の決定因子については未解明のままである。三次元浸潤実験の結果から、浸潤部位の形態が肥厚化するためにはECMの分解能と細胞間接着の両者が必要である一方、浸潤の深さには細胞間接着が大きな役割を果たすことが明らかになった。また、浸潤部位の肥厚化は癌細胞の増殖性に影響することも明らかとなった。細胞間接着依存的な浸潤部位の肥厚化には、癌細胞集団内でのアクトミオシン活性の局在が必要であった。また、*in vitro*で浸潤部を肥厚化できる細胞は*in vivo*で効率よく増殖し、かつ高頻度に転移することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では癌組織で見られる様々な形態がどのように形成されるのかを追求した。癌組織の形態は病理診断を下す際に重要な情報となるものであるが、それらの形態が実際にどのような癌細胞の性質に繋がるのかは明らかではなかった。今回の研究成果から、隣接組織に浸潤した癌細胞が浸潤した先で効率よく増殖する（浸潤部位の形態を肥厚化させる）ためには細胞外基質の分解能と細胞間の接着が重要であることが明らかになり、さらにその性質が転移にも影響することが分かった。具体的なメカニズムとして細胞集団内におけるアクトミオシン活性の偏在が重要であることが判明したため、今後はこの機構を標的とした治療法の開発につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cancers frequently invade as collective units. However, these invading units can be organized in a variety of ways, ranging from thin discontinuous strands to thick collectives. We employed 3D invasion assays to identify the factors that determine the mode of collective cancer cell invasion. We found that both matrix proteolysis and cell-cell junctions are required for the formation of wide strands, but only cell-cell junction has large effect on the maximum extent of invasion in certain contexts. Unexpectedly, the ability to generate wide invasive strands is coupled to the ability to grow effectively when surrounded by ECM in 3D assays. Cell-cell junction dependent strand widening requires localization of Actomyosin contractility to outer rim of the cell groups. *In vivo*, combinatorial perturbation of both matrix proteolysis and cell-cell adhesion demonstrated that the most aggressive cancer behavior is achieved at high levels of cell-cell adhesion and high levels of proteolysis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌細胞浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織の形態学的特徴は病理医によるがんの診断において重要な意味を持つ。この形態学的特徴はがん細胞が過去にどのように浸潤・増殖したかを反映しており、このことが個々のがんの形態が悪性度と関連づけられる要因の一つと考えられる。これまでに移動するがん細胞集団は鎖状、出芽様など複数の異なる形態を取りうるということが明らかにされてきた。しかしながら、それらの研究では浸潤の有無あるいは多寡について論じており、浸潤部の形態的な変化についてはほとんど考察されていない。そのため、腫瘍形態形成の決定因子及び分子メカニズムについては未解明のままである。また、それらの浸潤形態ががんの進展においてどのような意義を持つのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者らの予備的な研究により、CRISPR-Cas9 技術あるいは遺伝子過剰発現系によって細胞間接着あるいは ECM 分解能を操作した細胞株が、それぞれ異なる浸潤形態を示すことを見出している。本研究ではこれらの細胞株を用いてがん組織形態形成の詳細な分子機構を解明するとともに、異なる浸潤形態ががんの増殖や転移にどのような影響を与えているかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

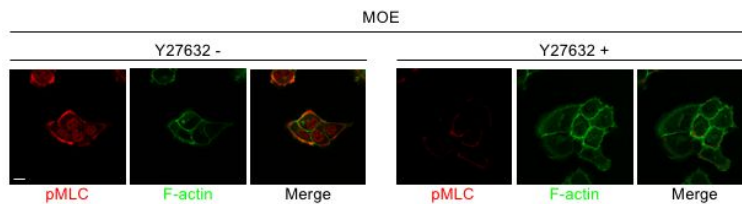
三次元浸潤実験系においてアクトミオシン制御に重要な ROCK の阻害剤処理および ROCK 活性化型変異体発現により活性化させることで浸潤部の形態にどのような影響を与えるのか、共焦点顕微鏡によって得た画像を解析した。また、これらの細胞の増殖がどのように影響を受けるかを三次元培養法にて解析した。

4. 研究成果

(1) ROCK の阻害および活性化によるアクトミオシン活性の局在変化

浸潤部位の肥厚化におけるアクトミオシンの影響を検討するため、扁平上皮癌細胞株 A431 に MMP14 を強制発現させた細胞 (A431-MOE) に ROCK 阻害剤 (Y-27632) 処理、あるいはタモキシフェン誘導性活性化型 ROCK である ROCK:ER を強制発現させた。それらの細胞でアクトミオシン活性の指標であるリン酸化ミオシン軽鎖 (pMLC) の免疫染色を行ったところ、正常では細胞集団の外縁にのみ局在した pMLC が、ROCK 阻害剤によってシグナルが消失した (図 1A) 一方で、ROCK の強制活性化によって細胞間接着部位にも観察されるようになった (図 1B)。この結果から、これらの処理によって細胞集団におけるアクトミオシン活性の局在を攪乱することが可能であることが明らかとなった。

A



B

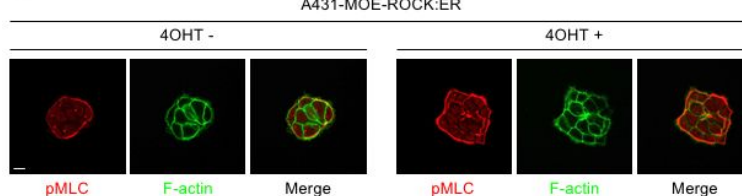


図 1 . ROCK の阻害および活性化によるアクトミオシン活性の局在変化

- A) A431-MMP14 overexpression (MOE)細胞を ROCK 阻害剤で処理後 16 時間で固定し、pMLC (赤) および phalloidin (緑) で染色を行った。スケールバー: 10 μm
- B) A431-MOE-ROCK:ER 細胞を 4OHT で処理後 16 時間で固定し、pMLC (赤) および phalloidin (緑) で染色を行った。スケールバー: 10 μm

(2) ROCK の阻害および活性化による浸潤部位の肥厚化への影響

A431-WT, A431-MOE を用いた三次元浸潤実験にて ROCK 阻害剤処理を行った。MOE 細胞は WT 細胞と比較して浸潤部位が肥厚化したが、ROCK 阻害剤を処理してアクトミオシンリン酸化を阻害することで肥厚化が抑制されることが明らかとなった (図 2A)。一方、A431-MOE-ROCK:ER 細胞を用いた三次元浸潤実験では、4OHT 処理によって浸潤部位の肥厚化が抑えられることが判明した。

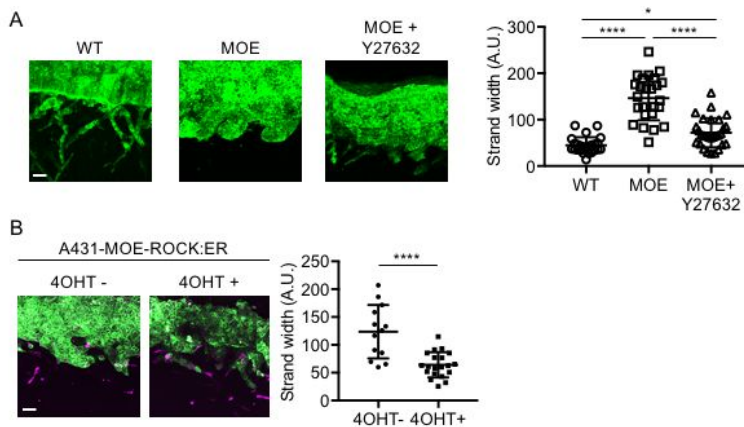


図 2 . ROCK の阻害および活性化による浸潤部位の肥厚化への影響

- A) YPet で標識した A431-WT、A431-MOE 細胞を用いた三次元浸潤実験。A431-MOE については ROCK 阻害剤で処理群と未処理群に分けた。浸潤部 (strand) の幅を計測し、定量化した (右グラフ)。One-way ANOVA, *: $p < 0.05$ 、****: $p < 0.0001$ 、スケールバー: 50 μm
- B) YPet で標識した A431-MOE-ROCK:ER 細胞を用いた三次元浸潤実験。4OHT 処理群、未処理群に分けた。浸潤部 (strand) の幅を計測し、定量化した (右グラフ)。Student's t-test, ****: $p < 0.0001$ 、スケールバー: 50 μm

(3) ROCK の強制活性化による癌細胞増殖への影響

申請者らの予備的な実験から、浸潤部位の肥厚化を示す癌細胞は ECM ゲル内における増殖が促進されることが明らかになっている。アクトミオシン活性の攪乱によって浸潤部位の肥厚化が影響を受けることが判明したことから、三次元環境における増殖にも影響があるものと考えられた。A431-MOE-ROCK:ER 細胞を用いた三次元培養を施行した結果、4OHT 処理によって癌細胞の増殖が著しく抑制されることが明らかとなった (図 3A)。

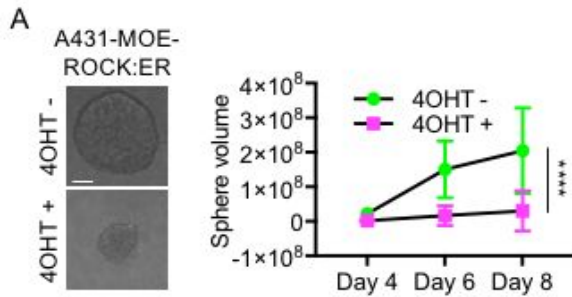


図 3 . ROCK の強制活性化による癌細胞増殖への影響

A) A431-MOE-ROCK:ER 細胞を用いた三次元培養実験。4OHT 処理群、未処理群に分けた。癌細胞塊の長径と短径を計測して体積を計算し、定量化した(右グラフ)。Student's t-test, ****: $p < 0.0001$ 、スケールバー: 100 μm

(4) 浸潤形態の変化が in vivo における腫瘍増殖および転移に与える影響の検討

申請者らの予備実験で細胞間接着の有無や細胞外基質の分解能によって浸潤形態が変化し、同時に ECM 内での癌細胞の増殖に影響を与えることが明らかになっていた。そこで、in vivo においてそれらの浸潤形態の変化が癌細胞の転移や腫瘍増殖に与える影響を検討した。A431-WT, A431-MMP14 KO (MKO), A431-MOE, A431-alpha Catenin KO (aKO), A431-aKO-MKO, A431-aKO-MOE をヌードマウスの耳の皮下に移植し、腫瘍体積を計測したところ、浸潤部位が肥厚化する細胞株ほど増殖が著しいことが明らかになった(図 4A)。さらに、同じ移植モデルにて頸部リンパ節への癌細胞の転移の有無を検討した結果、浸潤部の肥厚化する A431-MOE 細胞がもっとも転移頻度が高いことが判明した。

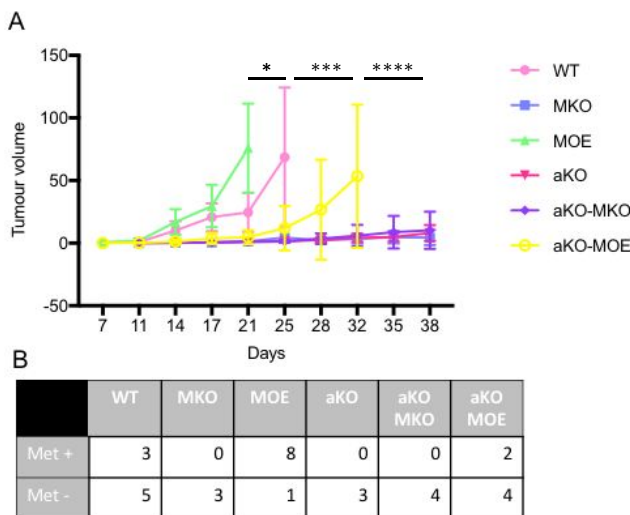


図 4 . 浸潤形態の変化が in vivo における腫瘍増殖および転移に与える影響の検討

A) A431-WT, A431-MMP14 KO (MKO), A431-MOE, A431-alpha Catenin KO (aKO), A431-aKO-MKO, A431-aKO-MOE をヌードマウスの耳の皮下に移植し、長径と短径を計測し、腫瘍体積を定量化した。One-way ANOVA, *: $p < 0.05$ 、***: $p < 0.001$ 、****: $p < 0.0001$

B) 癌細胞を移植したマウスにおける頸部リンパ節への転移の有無 (Met +/-) を検討した。

考察

浸潤部位の肥厚化がアクチン活性の局在を攪乱することで抑制された結果から、細胞

集団の外縁部に局在するアクトミオシン活性が、浸潤部位が肥厚化するのに重要であることが明らかとなった。このことから、supracellular actomyosin cable を介して集団外縁部に張力が発生することで球形を取ろうとする力が作用して周囲の ECM を押しよけ、その結果浸潤部が肥厚化するものと考えられる。また、この ECM を押しよける働きによって増殖に必要なスペースを確保可能となるため、浸潤部位を肥厚化できる細胞株では ECM 内で効率良く増殖すると考えている。細胞間接着の有無による浸潤部の肥厚化の増減については、細胞間接着がなくなることで細胞集団内における協調的なアクトミオシン活性の制御が不可能となることで起きるものと考えられる。

ヌードマウスへの癌細胞移植実験の結果から、単純に細胞間接着を失っただけ (A431-aKO) では転移頻度の増加には繋がらないことが明らかとなった。このことは接着性を失った低分化癌では遠隔転移しやすい傾向にあることを鑑みると、A431-aKO-MOE 細胞のように接着性を失うと同時に ECM 分解能の上昇のような追加の変化が必要となることを示唆している。

今回の研究成果により、アクトミオシン活性の細胞集団内における局在が増殖・転移に重要であることが示された。そのため、アクトミオシン活性そのものを制御する ROCK 阻害剤ではなく、その局在を制御する aPKC や Par3/6 を阻害することによる新しい増殖抑制法を今後検討していく必要がある。

引用文献

- 1) Classifying collective cancer cell invasion. Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Nat Cell Biol. 2012 Aug;14(8):777-83. doi: 10.1038/ncb2548.
- 2) Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. Hidalgo-Carcedo C, Hooper S, Chaudhry SI, Williamson P, Harrington K, Leitinger B, Sahai E. Nat Cell Biol. 2011 Jan;13(1):49-58. doi: 10.1038/ncb2133.

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 Ranjit Melissa, Hirano Masaki, Aoki Kosuke, Okuno Yusuke, Ohka Fumiharu, Yamamichi Akane, Kato Akira, Maeda Sachi, Motomura Kazuya, Matsuo Keitaro, Enomoto Atsushi, Ino Yasushi, Todo Tomoki, Takahashi Masahide, Wakabayashi Toshihiko, Kato Takuya, Natsume Atsushi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Aberrant Active cis-Regulatory Elements Associated with Downregulation of RET Finger Protein Overcome Chemoresistance in Glioblastoma | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 2274 ~ 2281.e5 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.01.109 | 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤 琢哉, Robert Jenkins, 村雲 芳樹, Erik Sahai |
| 2. 発表標題 Mechanism of pattern formation of cancer cell invasion |
| 3. 学会等名 日本癌学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤 琢哉、七浦 奈都実、宮下 結羽、櫻井 靖高、村雲 芳樹 |
| 2. 発表標題 肺扁平上皮癌におけるCD109の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本病理学会総会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |