

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22657045

研究課題名（和文） 癌の浸潤・転移形質獲得過程における分子機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms of the acquisition of tumor invasiveness and metastasis

研究代表者

橋本 茂 (HASHIMOTO SIGERU)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50311303

研究成果の概要（和文）：

癌の悪性度の進展に伴って観察される癌細胞の染色体の異数性と浸潤・転移形質の獲得が骨髄由来細胞との細胞間融合に起因するとの仮説は、1911年に Aichel によって初めて提案された。臨床例やモデル動物を用いた研究など多くの報告があるが、その分子機に関しては未だ不明のままである。我々は、これまでに GEP100-Arf6-AMAP1 経路が癌の浸潤形質獲得において根幹的役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究によって、Arf6 及び GEP100 が、高浸潤性乳癌細胞や骨髄由来細胞の細胞間融合に必須であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

In 1911, Otto Aichel postulated the concept of cell fusion as a mechanism of tumor malignancy. Recently, there are a lot of clinical and experimental discoveries of cell fusion as one of the driving forces of tumor progression. However, its molecular mechanisms remain to be elucidated. We have previously shown that GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway contributes to the acquisition of invasiveness of some breast cancer cells. Here, we found that Arf6 and GEP100 were involved in the regulation of cell-cell fusion between highly invasive breast cancer cells, or bone marrow-derived cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞骨格・運動

キーワード：癌浸潤、癌幹細胞、マクロファージ、乳癌細胞、細胞間融合、Arf6、GEP100、AMAP1

1. 研究開始当初の背景

これまでの癌の浸潤・転移形質の獲得に対する概念として、正常細胞に genetic/

epigenetic な変異が蓄積され、腫瘍組織の微小環境に適応し、拘束を受けない細胞増殖性や生存性を獲得した一部の細胞集団が選択的

に増殖し、最終的に、浸潤・転移形質を獲得するというクローン選択仮説が広く受け入れられていた。しかしながら、例えば、ヒト乳癌を用いた個々の患者の経時的な網羅的解析では、浸潤性乳癌において認められる殆どの遺伝子の変異や発現の異常が、既に、その非浸潤性乳癌の段階において認められ、両者に統計的に有意な差異がないことが明らかとなり、従来のクローン選択仮説では、癌の悪性度の進展のすべてを体系的に解釈することは困難となった。最近、クローン選択仮説を補う概念として、癌幹細胞仮説が見直されている。これによれば、少数の癌幹細胞のみが自己複製能、多分化能を有し、浸潤・転移能を有する。

さらに、これまで浸潤・転移形質を示す癌細胞は、癌の進行の最終段階と考えられていたが、最近、乳癌を例として、モデルマウスや病理学的解析などから癌発症の初期段階から、既に、浸潤・転移形質が獲得され、骨髄などへの転移が起こっていることが明らかとなっている (Hüsemann et al. *Cancer Cell* 2008)。従って、浸潤・転移形質と胚性幹細胞様形質を同時に、合目的に獲得する分子機序に関しては、癌化の起源となる細胞で起こる遺伝子の変異やエピジェネティクスの制御の異常の蓄積だけでは短期間で起こる浸潤・転移を体系的に説明することは困難と考えられる。

癌の悪性度の進展に伴って観察される癌細胞の染色体の異数性と浸潤・転移形質の獲得が骨髄由来細胞との細胞間融合に起因するとの仮説は、1911年に Aichel によって初めて提案された。これまでに、臨床例やモデル動物を用いた解析など多くの報告がなされているが、どのような分子機序であるのかに関しては未だ不明のままである (Pawelek et al. *Nature Rev. Cancer* 2008)。

細胞間融合は、多細胞生命体において必須の基盤的形質である。哺乳類においては、受精の際の精子と卵子間の細胞間融合、骨格筋形成に見られる骨芽細胞間の細胞間融合、マクロファージ間の細胞間融合による破骨細胞や巨核球の形成、あるいは、創傷治癒における間葉系幹細胞と損傷組織細胞との細胞間融合などが知られている。さらに、癌細胞と骨髄由来細胞との細胞間融合によって、短時間に浸潤・転移形質を獲得できることが例示されている。また、癌細胞と骨髄由来細胞

との細胞間融合は、無秩序に、高頻度に誘導されるものではなく、腫瘍組織当たり約 0.01% の割合でしか見られないことが報告されている (Duelli et al. *Cancer Cell* 2003)。このことは、癌幹細胞の存在比率が低いことと矛盾しない。

申請者らは、乳癌を例とした解析の中で、低分子量 G 蛋白質 Arf6 とそのエフェクター分子として同定した AMAP1 が乳癌細胞の浸潤活性に根幹的役割を果たしていることを見出した (Hashimoto et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; Onodera et al. *EMBO J.* 2005; Hashimoto et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006)。さらに、EGF レセプター経路の活性化に伴う乳癌細胞の浸潤形質獲得において Arf6 を活性化する GEF (guanine nucleotide exchange factor) として、GEP100 を同定した (Morishige et al. *Nature Cell Biol.* 2008)。さらに、病理学的解析から、GEP100 の発現がヒト浸潤性乳癌の約 80% に観察されることを見出した。その過程の中で、多くの腫瘍組織で浸潤性癌細胞のみならず、周辺に存在するマクロファージ等の骨髄由来細胞にも高発現していることを高頻度に観察した (未発表データ)。Arf6 及び、GEP100 は、これまでに、接着分子 integrin や E-cadherin の細胞内動態の制御に関与することが知られているが、*Drosophila* を用いた遺伝学的解析から骨芽細胞で見られる細胞間融合に関与することが明らかとなっている (Chen et al. *Cell* 2003)。

申請者は、骨芽細胞の細胞間融合の分子機序とマクロファージで見られる細胞間融合の分子機序との間に類似性があること、そして、乳癌をはじめいくつかの癌種で、癌関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) の集積と予後の不良との相関が病理学的に示されていることなどから、乳癌などいくつかの癌細胞の浸潤・転移形質は、骨髄由来細胞との融合によって誘導され、Arf6-GEP100 シグナル伝達経路がこの現象に関与するのではないかと作業仮説の設定に至った。

2. 研究の目的

本研究期間において、骨髄由来細胞の同種細胞間融合及び、骨髄由来細胞と癌細胞との異種細胞間融合への Arf6 及び、GEP100 の関与とそれに伴う癌の浸潤・転移形質あるいは幹細胞様形質の獲得との関連を細胞生物学

的手法を駆使して明らかにする。さらに、乳癌モデルマウス及び、ヒト乳癌の病理学的解析を進めることにより、その生理学的意義を検討する。

3. 研究の方法

平成22年度

(1) 骨髄由来細胞と癌細胞の同種細胞間融合における Arf6 及び、GEP100 の関与の検討

骨髄由来細胞として、マクロファージを用いる。癌細胞として、既に、細胞間融合性を示すことが知られている高浸潤性乳癌細胞 MDA-MB-231 を用いる。この細胞は、申請者らが、Arf6-GEP100 シグナル伝達経路が癌細胞の浸潤形質獲得に根幹的役割を果たしていることを示すために用いてきた細胞株である。さらに、これまで入手した浸潤性の異なる乳癌細胞及び、正常乳腺上皮由来細胞、さらに、乳癌以外の癌腫として、肺癌、脳腫瘍由来の細胞株を用いる。マクロファージの細胞融合の検出には、蛍光試薬である CFSE 及び、PKH26 でラベルしたものをを用いる。各種癌細胞について、細胞融合後、蛍光と発光及び、薬剤耐性により検出し、選択できるように、GFP-Fluc (puromycin 耐性遺伝子) 及び、RFP-Rluc (hygromycin 耐性遺伝子) の2種類の構築を遺伝子導入する。これまでの培養方法に従って細胞融合を誘導した後、融合細胞群及び、非融合細胞群の検出と分取、さらに、DNA 量解析は所属する研究機関にあるセルソーター、FACS Aria (BD 社製)によって行う。これらの細胞で Arf6、GEP100、AMAP1 遺伝子の発現をウイルスベクター等を用いて siRNA 処理あるいは、shRNA の遺伝子導入によって抑制した場合、あるいは、各遺伝子を強制的に発現させた場合における、細胞融合効率に与える影響を検討する。さらに、高浸潤性 MDA-MB-231 細胞と浸潤性の異なる乳癌細胞及び、正常乳腺上皮由来細胞との間で細胞融合が誘導されるか否か、される場合には、細胞融合と浸潤形質との関連を Matrigel invasion 活性や invadopodia 形成に与える影響を検討する。

(2) 骨髄由来細胞と癌細胞との異種細胞間融合への Arf6 及び、GEP100 の関与の検討

腫瘍組織の微小環境において、集積する骨髄由来細胞の中で、マクロファージの集積と癌の悪性度の進展との相関が乳癌をはじめいくつかの癌種で病理学的に示されている

ことから、骨髄由来細胞として、既に入手済みの乳癌モデルマウス、MMTV-PyMT マウスあるいは、MMTV-NeuT マウスから採取した TAM と、腫瘍組織から採取した癌細胞を用いる。各々の細胞のラベルについて、TAM は、Coussens らの文献 (DeNardo et al. *Cancer Cell* 2008) に従い分取した後、GFP-Fluc (puromycin 耐性遺伝子) の構築を遺伝子導入したものをを用い、癌細胞について、RFP-Rluc (hygromycin 耐性遺伝子) の構築を遺伝子導入する。細胞融合を誘導する実験条件として、マクロファージ細胞間で細胞融合を誘導するサイトカイン IL-4 及び、IL-13 を含む培地で行うが、効率が悪い場合は、RANKL、M-CSF、IL-17 を加えて誘導する培養系や TAM の集積や癌細胞の浸潤形質を亢進することが知られている低酸素下での培養条件などを検討する。引き続き、TAM あるいは、乳癌細胞において、Arf6、GEP100、AMAP1 遺伝子の発現を RNAi 法によって抑制した場合、逆に、強制的に発現させた場合における、細胞融合効率に与える影響及び、*in vitro* での浸潤活性に与える影響を検討する。

Arf6 を中心とした分子装置が関与することが示唆された場合、細胞間融合前後での Arf6 の活性化状態を測定するとともに、GEP100 及び、AMAP1 が相互作用する分子群を生化学的手法を用いて同定する。さらに、細胞間融合前後での遺伝子発現及び、miRNA 発現の網羅的解析を行い、細胞融合に伴う遺伝子発現のリプログラムについて検討を行い、浸潤形質獲得と胚性幹細胞様形質の誘導の有無を明らかにし、Arf6-GEP100-AMAP1 シグナル伝達経路の活性化に関わる候補分子群を同定する。網羅的解析について、RNA 調整までは自前で準備し、以降は外注する。

Arf6 を中心とした分子装置が関与することが示唆されなかった場合、創傷治癒の際、肝細胞、心筋細胞、プルキンエ細胞など様々な組織由来細胞と異種間細胞融合する能力を有する間葉系幹細胞と乳癌細胞との細胞融合の可能性を検討する。また、Arf6、AMAP1、GEP100 のタンパク質発現と悪性度との間に相関のあった、脳腫瘍、肺癌等を例として検討を進める。さらに、TAM と癌細胞との間の細胞間融合における網羅的解析結果に基づき、新規候補分子群の同定を進める。

平成23年度以降

(1) *in vivo* マウスモデルを用いた検討

マクロファージと細胞融合した乳癌細胞あるいは、細胞融合していない乳癌細胞の腫瘍形成効率、転移効率及び、転移部位（骨髄、肺、脳）の特異性について、ヌードマウスあるいは SCID マウスの乳腺部位に乳癌細胞を注入し、*in vivo* イメージング、免疫組織染色法などを駆使して測定する。さらに、Arf6、GEP100、AMAP1 あるいは、細胞融合において Arf6-GEP100 シグナル伝達経路の活性化に関わる候補分子群の遺伝子発現を抑制した場合、あるいは、増加させた場合の影響を検討する。

乳癌モデルマウスでのマクロファージと乳癌細胞との細胞間融合を *in vivo* で可視化するために、MMTV-PyMT マウスあるいは、MMTV-NeuT マウスと Cre タンパク質によって特異的に GFP を発現する R26R マウスとを掛け合わせる。引き続き、マクロファージ特異的に Cre 遺伝子を発現する Lys-Cre マウスと掛け合わせる。作製したマウスで形成される乳癌において、GFP を発現した乳癌細胞がマクロファージとの細胞間融合が誘導されたものと評価できる。また、乳癌モデルマウスと乳腺組織で特異的に Cre 遺伝子を発現する Wap-Cre マウスとを掛け合わせる。引き続き、R26R マウスから骨髄由来細胞を採取し、Wap-Cre 乳癌モデルマウスに静注し、上述の方法で細胞間融合を評価する。

Arf6-GEP100 シグナル伝達経路の関与を検討するために、GEP100 遺伝子条件付き欠損マウスを用いる。上述の Cre マウスと掛け合わせ、マクロファージ特異的あるいは、乳腺特異的 GEP100 遺伝子欠損マウスを用いて、上述の *in vivo* での評価系に導入し、マクロファージと乳癌細胞との細胞間融合効率、腫瘍形成効率、転移効率及び、転移部位特異性に与える影響を検討する。特に、マクロファージ特異的 GEP100 遺伝子欠損マウスについては、マクロファージ間の細胞融合による破骨細胞や巨核球の形成に与える影響を検討する。

(2) 病理学的解析

ヒト乳癌をはじめとし、肺癌、脳腫瘍での病理学的解析を進め、原発部位や転移巣における癌細胞及び、腫瘍微小環境に存在する骨髄由来細胞を含むストローマ細胞群での Arf6、GEP100 を中心とした分子装置の発現を調べ、癌細胞と骨髄由来細胞との細胞間融合の可能性について検討を行う。

4. 研究成果

当該研究期間において、骨髄由来細胞と癌細胞との細胞間融合における GEP100-Arf6-AMAP1 経路の関与の可能性を検討した。乳癌細胞 MDA-MB-231 を培養することにより誘導される同種細胞間融合系、及び、マクロファージ細胞 RAW264.7 を RANKL 刺激することにより誘導される同種細胞間融合系において、Arf6、GEP100 遺伝子を抑制した場合、それらの細胞間融合が顕著に抑制された。一方、AMAP1 遺伝子を抑制することによる影響は見られなかった。また、MDA-MB-231 細胞の細胞間融合によってある種の乳癌幹細胞マーカーを発現する細胞の割合が増加する傾向が見られた。これらのことから、骨髄由来細胞と癌細胞の同種細胞間融合において、Arf6 及び、GEP100 が必須であること、一方、細胞間融合における Arf6 のエフェクターが AMAP1 ではないことが示唆された。また、細胞間融合を介した癌幹細胞様の形質獲得に Arf6、GEP100 が関与する可能性が示唆された（論文準備中）。RANKL 刺激によって誘導される RAW264.7 細胞の同種間融合は、破骨細胞形成のモデルとしても知られており、GEP100-Arf6-AMAP1 経路が慢性炎症などに見られる過剰な破骨細胞形成を抑制する新規分子標的としての可能性が想定される。骨髄由来細胞と癌細胞との異種細胞間融合について、乳癌モデルマウスから採取した細胞を用いた培養系や *in vivo* での検討を進めた。マクロファージの同種細胞間融合は観察されるが、癌細胞との異種細胞間融合についてはこれまでのところ検出できていない。今後、癌幹細胞を enrich するなど細胞融合性の高い細胞群の同定と機能解析が必要である。

骨髄由来細胞と癌細胞の同種細胞間融合に関する解析から、破骨細胞形成過程あるいは癌幹細胞形質獲得過程において GEP100 と Arf6 が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、それらのプロセスにおける Arf6 活性化の分子機序を明らかにすると共に、Arf6 活性化のシグナルを伝える下流のエフェクターの同定とその機能に関する基盤的な解析を進める。骨髄由来細胞と癌細胞との異種細胞間融合については、乳癌モデルマウスから採取した癌関連マクロファージと癌細胞を用いた培養系や *in vivo* モデルマウスを用いた実験系に関して、癌幹細胞を enrich して

検討することを試みる。検出ができない場合、創傷治癒の際、肝細胞、心筋細胞、プルキンエ細胞など様々な組織由来細胞と異種間細胞融合する能力を有することが知られている骨髄由来の間葉系幹細胞と乳癌細胞との異種間細胞融合を例としてGEP100とArf6の関与を検討する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Hashimoto A., Hashimoto S., Ando R., Noda K., Ogawa E., Kotani H., Hirose M., Menju T., Morishige M., Manabe T., Toda Y., Ishida S. and Sabe H. GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. PLoS One, 査読有, 6:e23359, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0023359
- ② Menju T., Hashimoto S., Hashimoto A., Otsuka Y., Handa H., Ogawa E., Toda Y., Wada H., Date H. and Sabe H. Engagement of overexpressed Her2 with GEP100 induces autonomous invasive activities and provides a biomarker for metastases of lung adenocarcinoma. PLoS One. 査読有, 6:e25301, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0025301

[学会発表] (計4件)

- ① 橋本茂, EZH2 regulates Arf6 activity necessary for invasiveness of some breast cancer cells under normoxia and hypoxia, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ② 橋本茂, EZH2 is essential to Arf6 activation necessary for TGF β 1- and hypoxia-induced invasiveness of breast cancer cells, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋国際会議場(愛知県)
- ③ 橋本茂, Arf6 activation under hypoxia and its relationship to invasion, EMT conversion and stemness of breast cancer cells, 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月9日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ④ 橋本茂, Hypoxia-induced invasive activity of breast cancer cells involves Arf6 activation, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月24日, 大

阪国際会議場(大阪府)

[図書] (計1件)

- ① 橋本あり、杉野弘和、橋本茂、佐邊壽孝、メディカルレビュー社、乳癌レビュー 2012 EMT-基礎的観点から, 2011, 7, 29-35

[その他]

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~g21001/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 茂 (HASHIMOTO SIGERU)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 50311303

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: