

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461698

研究課題名(和文)再プログラム因子導入による間葉上皮移行の誘導と癌浸潤の制御

研究課題名(英文) Induction of mesenchymal to epithelial transition and suppression of cancer invasion by introduction of the reprogramming factors

研究代表者

高石 樹朗 (TAKAISHI, MIKIRO)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：10303223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉-上皮移行が人工多能性幹細胞(iPS細胞)誘導過程で起こることが報告されたことを受けて、本研究ではこの現象を利用して再プログラミング因子(RFs)を有棘細胞癌で発現させた際の作用を検討した。RFsが導入された有棘細胞癌細胞(RICs)は、より強い上皮細胞の特性を獲得し、移動能そして浸潤能が著しく低下した。また、免疫不全マウスへの細胞移植実験ではRICsのリンパ節転移が減弱していた。従って、がん細胞においてもRFs導入により間葉-上皮移行が誘導されて、がん悪性度が低下したと考えた。この様ながん細胞における間葉-上皮移行を理解することは新たながん治療開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have indicated that mesenchymal to epithelial transition (MET) is observed during the generation of induced pluripotent stem cells by the reprogramming factors (RFs). In the present study, we investigated the effects of RFs on squamous cell carcinoma (SCC) cells. RFs-introduced cancer cells (RICs) demonstrated the enhanced epithelial characteristics in morphology with altered expression of molecular markers. The motility and invasive activities of RICs in vitro were significantly reduced. Furthermore, xenografts of RICs on immune deficient mice exhibited no lymph node metastasis, whereas metastasis was detected in parental SCC-inoculated mice. Thus, we concluded that RICs regained epithelial properties through MET and showed reduced cancer malignancy in vitro and in vivo. Therefore, the understanding of the MET process in cancer cells by introduction of RFs may lead to the designing of a novel anticancer strategy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん制御 間葉-上皮移行

1. 研究開始当初の背景

現代の死亡原因において、悪性腫瘍が第1位に位置付けられるようになって久しい。医療の進歩と共に癌が原発巣に局在するときの治癒率は改善してきているが、遠隔転移が形成された進行例の予後は今尚極めて不良であり、腫瘍治癒のためには転移の制御が必須である。皮膚科領域における癌は患者自ら発生を認識して早期に治療を開始できる場合が多いが、悪性黒色腫は早期より遠隔転移を起こす予後の悪い腫瘍として知られており、また比較的局所制御率の高い有棘細胞癌などでも、時に遠隔転移を繰り返す場合がある。

上皮-間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal transition, EMT) は 1980 年代初めに Elizabeth Hay らが提唱した、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象である。EMT は胚の初期発生、発生における器官形成だけでなく、癌細胞の浸潤との関連が示唆されている。皮膚科領域において遠隔転移をきたしうる有棘細胞癌、悪性黒色腫あるいは乳房外 Paget 病でも、癌細胞と EMT の関連が報告されている [1]。一方で、遠隔臓器に到達した癌細胞がその場に定着し、癌組織が形成される過程に関わるとされる間葉-上皮移行 (Mesenchymal-Epithelial transition, MET) については、詳細な検討がほとんどされていない。そのような研究背景の中で、Ronghui Li らは人工多能性幹細胞 (iPS cells) の誘導に必要な再プログラミング因子の導入が、iPS 細胞誘導の初期過程において、マウス線維芽細胞に MET を引き起こすことを報告した [2-3]。

2. 研究の目的

我々は、再プログラミング因子の導入により、癌細胞においても MET が誘導されるのではないかと考えた。癌細胞に MET が誘導出来れば、それに伴い細胞の浸潤能・転移能が減じる可能性がある。ヒト有棘細胞癌由来細胞株を用いて、再プログラミング因子の導入による MET 誘導の有無、*in vitro*、*in vivo* での浸潤、転移能の変化を検索する。さらにはその分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 再プログラミング因子による間葉上皮移行の誘導

再プログラミング因子導入には iPS 細胞作成に用いられる piggyBac トランスポゾンベクターを使用する。このベクターは再プログラミング因子として、*POU5F1* (*OCT3/4*)、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC*、*LIN28* を発現する。これらの発現ユニットが導入された細胞はピューロマイシン耐性として選択される。結果として得られた細胞は、間葉-上皮移行が誘導されているのか、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて形態学的な評価がなされる。分子マーカーの変化は RT-PCR、ウェスタンブロッティ

ング法、フローサイトメトリー、免疫蛍光染色にて確認された。

(2) *In vitro* での細胞機能評価

細胞の増殖能および移動能は、それぞれ MTS アッセイ、スクラッチアッセイにて評価された。細胞浸潤能はマトリゲルコーティングされたボイデンチャンバーを用いて検討された。

(3) *In vivo* での造腫瘍能、局所転移能および遠隔転移能の評価

腫瘍細胞を 2×10^5 cells /mouse としてヌードマウスの舌内へ移植し舌内での腫瘍の増大および付随リンパ節への転移を評価する。舌内の腫瘍は組織切片を作成して顕微鏡下でその大きさを計測する。所属リンパ節への腫瘍細胞の転移はヒトサイトケラチン 18 の発現をもって判断した。また、遠隔転移能を評価する目的では、 2×10^5 cells /mouse としてヌードマウスの尾静脈より移植し、主要臓器への転移が認められるか否か、肉眼的・組織学的に検討した。さらに、右肺前葉を用いてヒトサイトケラチン 18 の検出を RT-PCR にて試みた。

(4) マイクロアレイを用いた間葉-上皮移行関連遺伝子の探索

4 種類のヒト有棘細胞癌由来細胞株とそれらに再プログラミング因子を導入して得られた細胞において、発現遺伝子の変化をマイクロアレイにて検討した。候補遺伝子の発現は定量的 RT-PCR にて確認を行った。

4. 研究成果

(1) 再プログラミング因子による間葉上皮移行の誘導

有棘細胞癌由来であるが上皮間葉移行を経た細胞 2 株、HOC313 と TSU に再プログラミング因子を導入した結果、細胞形態は紡錘形の間葉系細胞様から多角形で敷石状配列を呈する上皮細胞様に変化した。OSC-19 は元来上皮細胞様の形態を示すが、再プログラミング因子が導入されて、より密な細胞コロニーを形成するようになった (図 1)。

以降さらなる解析は HOC313 と OSC-19 の親細胞と再プログラミング因子導入細胞 (Reprogramming factor Introduced Cancer cells; RICs) を用いて行った。

これらの細胞が、再プログラミング因子導入により iPS 細胞様に変化したのか検討した。多分化能細胞が発現する TRA-1-60、TRA-1-81 は親細胞ならびに RICs では発現しなかった。iPS 細胞を樹立するための特殊な培地を使用しなかったために、iPS 細胞様の未分化状態に至らなかったと考えられる。

次に、これらの細胞で発現する上皮系および間葉系分化マーカー遺伝子を定量的 RT-PCR により検討した。その結果、種類、程度に差があるものの、上皮系マーカー遺伝子

の発現上昇と間葉系マーカー遺伝子の発現低下が RICs で確認された。ウェスタン解析でも E-cadherin (*CDH1*)、 β -Catenin (*JUP*)、Desmocollin 2 (*DSC2*) の発現増加が HOC313

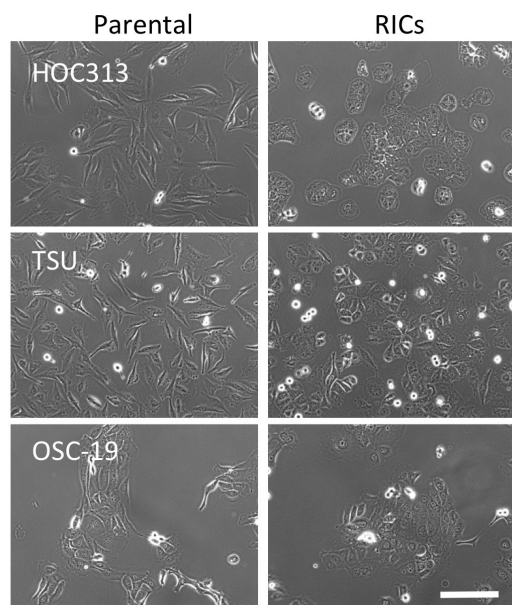


図1 再プログラム因子導入によるヒト有棘細胞癌細胞の形態変化

RICs と OSC-19 RICs において示された。また、Snail2 タンパク質の減少が HOC313 RICs で明らかとなった (図 2A)。

免疫蛍光染色ではケラチン類の増加が両 RICs で示されて、OSC-19 RICs ではさらに E-cadherin、Desmocollin 2 の発現増加が明らかとなった (図 2B)。

RICs はより密な細胞集団を形成し、細胞間接着分子およびケラチンの発現増加が認められたことから、細胞間接着の微細構造を電子顕微鏡を用いて観察した。RICs ではトノフィラメントを有するデスモゾームが確認された。その一方で親細胞では成熟したデスモゾームを欠いていた (図 2C)。

上皮細胞の特徴である E-cadherin の発現は転写制御分子である Snail1/2、Zeb1/2、Twist1/2 のなどにより抑制される。一方これらの分子は、miR-200 ファミリー、miR-203、miR205 等により制御されている。HOC313RICs では Snail1、Snail2、Zeb2 の mRNA 量が減少していたため、miR-200 ファミリー、miR-203、miR205 の発現を RT-PCR 法を用いて確認した。

miR-200 ファミリー (miR-200a、-200b、-200c、-141、-429) miR-203、miR-205 のいずれも、HOC313 親細胞に比較して RICs において発現が増加していた。この結果は、Snail1/2、Zeb2 の減少に一致する。一方、OSC-19RICs では ZEB1/2、SNAIL1/2、TWIST1/2 の減少は見られなかった。また、miR-203、miR-205 の増加は見られたが、miR-200 ファミリーは増加しなかった。OSC-19 の親細胞は元来上皮性の特徴を有している、これらの分子の発現変化が少ないのかもしれない。

(2) *In vitro*での細胞機能評価

再プログラミング因子は細胞増殖に関わるため、再プログラミング因子発現する RICs

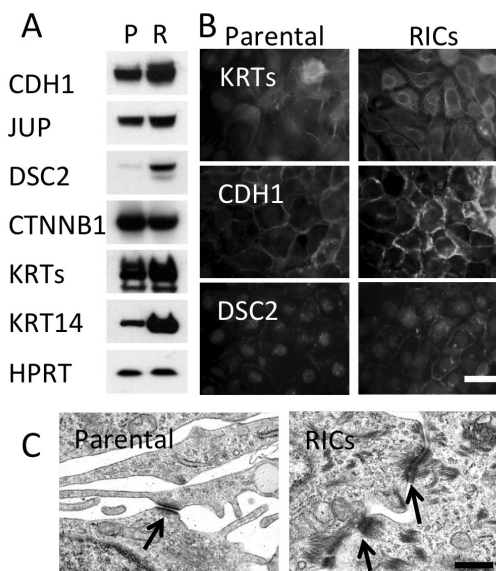


図2 間葉-上皮移行の評価

OSC-19細胞の結果を示す。(A) Western analysis、P、Parental cells、R、RICs (B) 免疫蛍光染色、(C) 細胞間接着の電子顕微鏡像、矢印はデスモゾーム様構造を示す。

においても増殖に変化をもたらす可能性がある。よって、細胞増殖能が MTS アッセイ法により検討されたが、親細胞と RICs の間で有意な差は確認出来なかった。細胞の移動能はスクラッチアッセイにて検討した。HOC313 RICs と OSC-19 RICs いずれの細胞も親細胞に比較して著しく移動能が抑制されていた。同様に *in vitro* 浸潤能は RICs において明らかに減弱していた。このように、RICs の *in vitro* での移動能、浸潤能の低下が示された (図 3)。

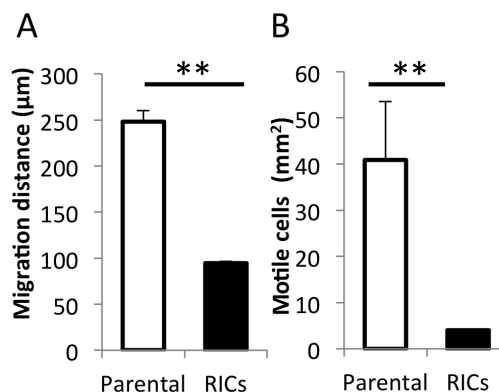


図3 *In vitro* 細胞機能評価

OSC-19細胞の結果を示す。(A) 移動能、(B) 浸潤能。

(3) *In vivo*での造腫瘍能、局所転移能および遠隔転移能の評価

OSC-19 細胞はヌードマウスの舌内へ移植されると、その場で増殖し腫瘍を形成するとともに頸部の所属リンパ節へ転移することが知られている。このように OSC-19 RICs を移植してその造腫瘍能およびリンパ節への転

移を検討した。親細胞と RICs はそれぞれ 15 匹のヌードマウス舌に移植して、21 日後に実験を終了して判定を行った。OSC-19 RICs に由来する腫瘍は親細胞に由来する腫瘍と比較して明らかにその大きさを減じた。組織学的には、OSC-19 RICs に由来する腫瘍は、より強い角化傾向を示す分化した細胞からなる。また、より強い Desmocollin 2 の発現が免疫染色により示された。これらは *in vitro* で検討された結果に一致する。リンパ節への転移はヒトサイトケラチン 18 の検出により検討された。OSC-19 親細胞と RICs はヒトサイトケラチン 18 をほぼ等しく発現する。リンパ節はサイトケラチン 18 を発現せず、この遺伝子の検出は、OSC-19 細胞のリンパ節転移を示す。サイトケラチン 18 の発現すなわちリンパ節転移は親細胞を移植したヌードマウス 15 匹の中 6 匹で確認された。一方、RICs を移植されたヌードマウスではリンパ節転移は検出されなかった (図 4)。

遠隔転移はヌードマウスの静脈血内へ細胞を移植して、一定期間観察した後に、各種臓器での腫瘍の増大により評価した。OSC-19 親細胞および RICs はそれぞれ 4 匹のヌードマウスの尾静脈より移植された。細胞移植後、週 3 回体重を測定し外観を観察したが、異常は認められずに経過し、47 日目に実験を終了した。剖検の結果、胸腔および腹腔内臓器に腫瘍の増大は確認出来なかった。肺、肝臓、脾臓、腎臓については組織学的な検索も行ったが、組織内に腫瘍細胞は確認出来なかった。

右肺前葉を RT-PCR に供してヒトサイトケラチン 18 の検出を試みたところ、親細胞を移植したマウス 4 匹中 2 匹でサイトケラチン 18 の発現を検出した。一方、RICs を移植したマウスではサイトケラチン 18 を検出出来なかった。よって、RICs では遠隔転移能が减弱していることが示唆された。以上より再プログラミング因子を導入にすることにより、MET が誘導され、がん細胞の悪性度が低下することが *in vivo* においても示された。

(4) マイクロアレイを用いた間葉上皮移行関連遺伝子の探索。

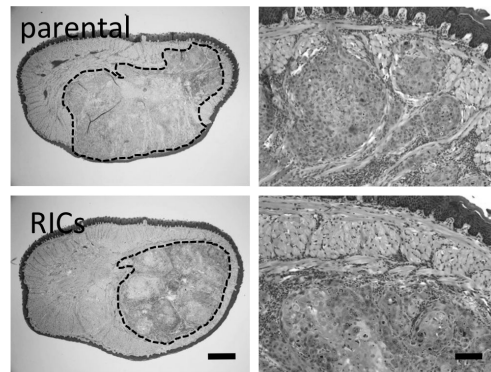
ヒト有棘細胞癌 4 株とそれらに由来する RICs について、マイクロアレイを用いて発現遺伝子を網羅的に解析した。結果、RICs に共通して変動する mRNA および long non-coding RNA (lncRNA) を見いだした。RICs で発現が増加する 8 遺伝子、減少する 6 遺伝子については RT-PCR 法で確認した。これらの遺伝子が MET を誘導するのか、あるいはがん悪性度が減弱化するのか、といった問題は今後検討すべき課題である。

〔参考文献〕

1. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. Nakamura M, Tokura Y., J Dermatol Sci. 2011 Jan;61(1):7-13.

2. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. Li R et al., Cell Stem Cell. 2010 Jul 2;7(1):51-63.
3. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. Samavarchi-Tehrani, P. et al., Cell Stem Cell. 2010 Jul 2;7(1):64-77.

A



B

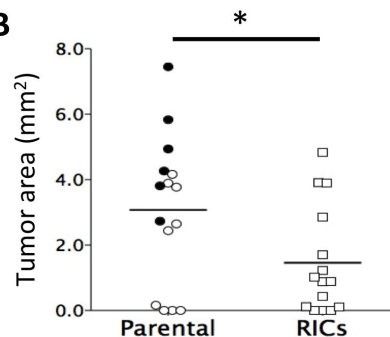


図4 *In vivo* がん悪性度評価
(A) 移植部の腫瘍、H&E染色。腫瘍の境界を点線で囲む。(B) 舌組織内での腫瘍の大きさ、所属リンパ節への転移が確認された個体を黒丸で示す。

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1件)

Mikiro Takaishi, Masahito Tarutani, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano. Mesenchymal to epithelial transition induced by reprogramming factors attenuates the malignancy of cancer cells. PLoS One. 2016 Jun 3;11(6): e0156904. doi: 10.1371/journal.pone.0156904. 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

Attenuation of human SCC malignancy by introduction of reprogramming factors.

Mikiro Takaishi, Masahito Tarutani, Junji Takeda, Shigetoshi Sano

第29回表皮細胞研究会、2015年11月14日、佐賀県、佐賀市、ホテルニューオータニ佐賀

Attenuation of human SCC malignancy by introduction of reprogramming factors.

Mikiro Takaishi, Masahito Tarutani, Junji Takeda, Shigetoshi Sano.

European Society for Dermatological Research

2015年9月9日～9月12日、オランダ、ロッテルダム

Epigenetic regulation of E-cadherin in the reprogramming gene-introduced cancer cells.

Mikiro Takaishi, Masahito Tarutani, Junji Takeda, Shigetoshi Sano.

The 39th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology.

2014年12月12日～12月14日、大阪府、吹田市、ホテル阪急エキスポパーク

Introduction of the reprogramming factors into B16 murine melanoma cells attenuated in vivo metastasis through promoting mesenchymal-epithelial transition.

Mikiro Takaishi, Masahito Tarutani, Junji Takeda, Shigetoshi Sano.

International Investigative Dermatology.

2013年5月8日～5月11日、英国、スコットランド、エジンバラ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高石 樹朗 (TAKAISHI, Mikiro)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号: 10303223

(2) 研究分担者

寺石 美香 (TERAISHI, Mika)

高知大学・医学部付属病院・特任助教

研究者番号: 40437736

中島 英貴 (MAKAJIMA, Hideki)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号: 70314995

佐野 栄紀 (SANO, Shigetoshi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号: 80273621