

Title	「細胞集塊型転移」の過程で、癌細胞は線維芽細胞をいかに調教するか?
Sub Title	How cancer cells condition fibroblasts for metastasis with them?
Author	鈴木, 繁紀(Suzuki, Shigeki) 羽藤, 泰(Hato, Tai)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014. )
Abstract	(1) スフェロイド培養下で, がん細胞は線維芽細胞と直接接触により"突起"を発生する。(2) 癌細胞と線維芽細胞のスフェロイド共培養により抗アポトーシス活性が高まる。(3) 癌細胞と線維芽細胞のスフェロイド共培養により細胞傷害性に対する薬剤耐性は高まるが, EGFR阻害剤に対する耐性は影響を受けない。(4) 癌細胞と線維芽細胞の共培養によりAngptl4発現が増強する。(5) スフェロイド共培養がと転移の関連を調べるin vivoモデルを樹立した。 1) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, their form was changed in a strange morphology. 2) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, cell proliferation activity and anti-apoptotic activity was shown to increase. 3) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, anti-cytotoxic drug resistance was increased. But they not effect for resistance to EGFR-TKIs. 4) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, the expression of angptl4 in them was enhanced, but the detailed mechanism is necessary to examine. 5) We tried to create the in vivo model to examine the relevance of spheroid co-culture for metastasis.
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2013 ~ 2014 課題番号: 25861249 研究分野: 呼吸器外科, 癌
Genre	Research Paper
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25861249seika">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25861249seika</a>

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861249

研究課題名(和文)「細胞集塊型転移」の過程で、癌細胞は線維芽細胞をいかに調教するか？

研究課題名(英文)How cancer cells condition fibroblasts for metastasis with them?

研究代表者

鈴木 繁紀(Shigeki, Suzuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80645672

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)：(1)スフェロイド培養下で、がん細胞は線維芽細胞と直接接触により“突起”を発生する。(2)癌細胞と線維芽細胞のスフェロイド共培養により抗アポトーシス活性が高まる。(3)癌細胞と線維芽細胞のスフェロイド共培養により細胞傷害性に対する薬剤耐性は高まるが、EGFR阻害剤に対する耐性は影響を受けない。(4)癌細胞と線維芽細胞の共培養によりAngpt14発現が増強する。(5)スフェロイド共培養がと転移の関連を調べるin vivoモデルを樹立した。

研究成果の概要(英文)：1) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, their form was changed in a strange morphology. 2) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, cell proliferation activity and anti-apoptotic activity was shown to increase. 3) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, anti-cytotoxic drug resistance was increased. But they not effect for resistance to EGFR-TKIs. 4) As a result of co-culture of cancer cells and fibroblasts, the expression of angpt14 in them was enhanced, but the detailed mechanism is necessary to examine. 5) We tried to create the in vivo model to examine the relevance of spheroid co-culture for metastasis

研究分野：呼吸器外科、癌

キーワード：肺癌 共培養 線維芽細胞 細胞集塊型転移

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 転移の過程でのがん微小環境の役割

単一細胞型転移の研究が精力的になされてきた。2000年代には、転移後発細胞株に特徴的な遺伝子を、網羅的遺伝子発現解析を用いて抽出する研究が報告されてきた。これらの遺伝子群は性質上、がん細胞そのものに関わる遺伝子群と、がん細胞-間質細胞間の相互作用に影響する遺伝子群に大別して考えることができる。がん細胞の中にも階層的な heterogeneity が存在し、原発巣から上皮間質移行を介して血管外へ遊走するような細胞運動関連遺伝子や、転移した先で「転移巣という臓器」を再構築できるような幹細胞的な振る舞いが可能な転移しやすい特徴をもった細胞が存在することが知られている。その一方で、がん細胞は単独の行動以外に、間質細胞を都合の良いように駆使している側面もある。原発巣においては、癌組織に含まれる線維芽細胞やマクロファージをはじめとする血球系細胞に TGF- $\beta$  などの遊走促進因子を作らせ、angpt12 や angpt4 などを通じて血管外への脱出を図っていたりする。血管内に遊走したがん細胞は血小板を巻き付けて血小板由来の TGF- $\beta$  と血小板とがん細胞が接触することでがん細胞内に NF- $\kappa$ B を介するシグナル伝達を通じて、遊走や血管内での生存を可能にしている。さらには、転移巣を形成するよりも前に、VEGFR1+の骨髄由来細胞を pre-metastatic niche とよばれる転移予定地に集結させて転移がしやすくなるように仕向けるとする報告すら存在する。以上述べてきたように、がんの転移の全プロセスにおいて、がん細胞は微小環境を自らの都合の良いように細工、調教して転移を形成していることが明らかと成りつつある。

### (2) 細胞集塊型転移

過去の基礎実験の多くが単独細胞型の転移を中心に研究されてきた。しかしながら、単

一細胞が原発巣から間質を遊走し、血管内腔へと飛び出して、免疫監視機構をかいくぐって血管内を漂い、転移予定地で血管外へと再び移動し、そこで都合良く増殖を開始するという長い旅路をたどるというパラダイムは、一見非現実的ではある。我々は以前、がん細胞が細胞集塊 clump を形成して、原発巣から脱落して、間質細胞共々血液中を漂って、転移巣を形成するという in vivo の xenograft 実験から示した。Paget らは腫瘍が増殖するには、種 seed に相当するがん細胞のみならず、土壌 soil に相当する微小環境が重要だという仮説を提唱した (seed and soil 仮説)。すでにできあがった癌原発巣ではその微小環境はがんの発育に適したものになっていることが推察される。細胞集塊型転移は単一細胞型転移と異なり、seed のみならず soil をも転移先に同時に転送することによって、がん細胞の生存確率や転移した先での増殖そのものを保証する、理にかなった強力な転移形式である。臨床病理学的に、切除検体の血管浸潤部位などでみられるがん細胞は、単独細胞として認識される、いわゆる isolated tumor cell の形態をとることもあるが、多くは複数細胞が集塊を形成している。最近では循環血中などに浮遊する上皮細胞を circulating tumor cells として定量し、予後予測を行うことが乳癌をはじめとする癌の臨床で行われているが、実際の担癌患者の肺静脈血中に含まれる細胞のスミアの所見でも、複数細胞集塊を形成した細胞を見ることは多々ある。臨床的にがんが細胞集塊を形成して転移することは現実的な転移形式である。がん細胞と間質細胞が集塊を形成することの重要性は大まかに示されたが、その詳細な分子機構は不明のままである。細胞集塊型転移は、いつ頃からいかにしてがん細胞の転移促進に働くか、がん細胞の生存に多細胞であることがいかに有利なのか、集塊となることで幹細胞的特性を獲得する可能性

などについて、分子生物学的機構を解析する必要がある。しなしながら、線維芽細胞、血球系細胞、血管系細胞、間質線維などの間質には複雑なクロストークが存在すると思われる、in vivoでの解析には限界がある。

## 2. 研究の目的

我々は3Dスフェロイド共培養を行うin vitro実験によって、がん細胞の細胞集塊型転移をモデル化するとともに、形成されたスフェロイドを静脈注射しin vivoでの評価を組み合わせ、細胞集塊転移の分子機構を明らかとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞:A549およびTIG3はATCCから細胞を購入した。MRC5は理研細胞バンクから購入した。スフェロイド培養:本研究では、がん細胞と間質細胞の相互作用をモデル内で観察するために、3Dのスフェロイド培養系を用いて、微小環境を究極的に簡易化し、直接的・分子生物学的解析を行った。培養に用いる特殊な足場としてnanoculture plate(Scivax)を用いた。ウエスタンブロット:シグナル伝達解析に用いた抗体はbeta actinをのぞき全てCell signaling社から購入した。抗beta actin抗体はThermo社の製品(BA3R)を用いた。磁気ビーズ細胞分離:スフェロイドからA549のみを回収する目的で磁気ビーズを用いた。とくに癌の幹細胞様形質の存在を期待して抗EpCAMビーズを用いてA549細胞を回収した。スフェロイドから単一細胞を形成する方法は、まず培養上清を23G針を用いて低圧で慎重に吸引する。ついで24穴プレートであれば1mlの0.5%トリプシン-EDTA溶液を添加し、37°Cで10分インキュベートする。インキュベート後に1mlのピペットマンを用いて物理的にサスペンションを行い、鏡検で単一細胞になっていることを確認した。確認後、PBS10mlとともに15mlファルコンチューブに移送し、遠心および洗

浄の後、バッファ-80ulに対し磁気ビーズ20ulを添加し、30分on iceでインキュベートした。その後、auto MACS(Miltenyi Biotec社)でEpCAM陽性細胞分画だけを回収した。mRNA回収およびcDNA作成 mRNA回収に供する細胞はTRIZOL(Invitrogen)内に回収し、フェノール-クロロホルム沈殿法を用いてmRNAを回収した。回収したmRNAはPrime Script(Takara Bio)をもちいてcDNAに転写した。定量的PCR:PCR反応にはSYBR Premix Ex Taq II(Takara Bio)およびMX3000p(Stratagene)を用いた。PCRアレイはQiagen社から購入した。抗癌剤耐性評価試験:スフェロイド共培養したコロニーに抗癌剤(分子標的薬)を投与してCTGアッセイを行い、細胞死を評価し、癌細胞が線維芽細胞と集塊を形成する状態における感受性低下を立証した。

TIG3+A549を用いて、A549のみ、TIG3+A549(A549:TIG3=9:1)、TIG3のみの3つのグループに分け、NCP96穴を用いて3次元培養を行った。はそれぞれ10000cells/well、は20000cells/wellでそれぞれ20wellずつ播種した。プレ実験においてスフェロイドの形成を経時的に観察し、培養開始3日目で細胞が十分にNCPに生着し、スフェロイドが形成されることを確認した。また、薬剤の投与に関しては先行論文において、gefitinib投与72時間でA549に対してIC50=5μMと報告されている。よって本研究においてはスフェロイド培養後3日目にgefitinibを投与し、薬剤投与後3日目に効果判定を行うこととした。薬剤はGefitinib(TOCRIS社,446.902g/mol)を用いた。Gefitinibの投与濃度は先行文献を参考とし、0μM/0.1μM/1μM/5μM/10μMの5段階で検討した。Gefitinibの効果判定は、Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay Protocol(Promega)に従い、Luminometerを用いてグループ - の発行

シグナルすなわち ATP 量を測定した。同様に細胞傷害性薬剤として Gemcitabine を投与し、生存率を MTT アッセイで評価した。

#### 4. 研究成果

(1) スフェロイド培養下で、がん細胞は線維芽細胞と直接接触により“突起”を発生する

生体内の癌細胞と線維芽細胞の共存状態を可及的単純な実験系で評価する目的で in vitro でがん細胞と線維芽細胞をスフェロイド共培養した。がん細胞株として肺癌細胞株 (A549), 線維芽細胞株として肺線維芽細胞 (TIG-3) を用いた。がん細胞株と線維芽細胞株を  $5.0 \times 10^4$  個 / ml となるように Nanoculture plate (NCP) 上で培養した。

(図1)。培養開始後 72 時間頃に、各々を単独で培養した場合( )には球形の整形のスフェロイドを形成した。一方で両者を共培養( )してスフェロイドを形成させると、混じり合った後に、複数の突起をもつ歪なスフェロイドを形成し、これを約 2 週間長期間培養するとスフェロイド間で架橋を形成する。このようなスフェロイドから突出する突起がいかにして形成されるか興味深いが、一つの可能性として上皮間質移行シグナルが関与する可能性を考えられた。

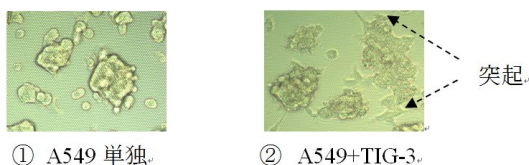


図 1 “Pod” formation in co-cultured spheroids

培養条件を検討すると、スフェロイド中のがん細胞株と線維芽細胞株の割合は、線維芽細胞が少なくとも全体の 25%以上存在するとスフェロイドに突起が生じた。継続的に顕鏡すると、およそ 3 日目で TIG3 から突起が出

現し、A549 間の橋渡しをするような増殖像が認められた。次に同様の共培養及びそれぞれの単独培養を NCP を用いて 3D 培養すると、約 3 日目でスフェロイドが形成され、1 週間以上観察すると、A549 単独では球体に近いコロニーが形成され、TIG3 を混じると突起を混じた不整な形状になった。また、TIG3 単独ではアノキス抵抗性が無いためか、細胞はほぼ死滅した。A549, TIG3 のスフェロイド共培養は細胞集塊型転移 突起 モデルとして有用であることを確認した。

次いでこのスフェロイドについて、培養 3 日目における細胞増殖活性を MTT アッセイを用いて評価した。A549, TIG3 をそれぞれ個別のウェルで培養したもの、個別培養後にそれらを混合して MTT を投与したもの、はじめから A549 と TIG3 を共培養したものを比較した (図 2)

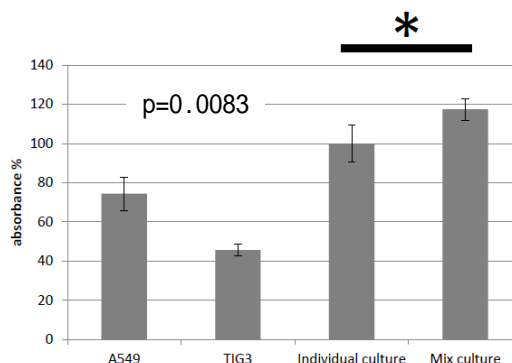


図 2 MTT assay for different types of co-culture

(2) 癌細胞と線維芽細胞のスフェロイド共培養により抗アポトーシス活性が高まる

共培養によって、個別培養と比較するとわずかながら細胞増殖が促進される結果となった。ただし、共培養群のウェル内では細胞密度が高く、低 pH 低酸素傾向にあったことも実験結果に影響したものと推察した。

共培養が癌細胞の増殖および生存に有利なシグナルを伝達するか否かを調べるため、スフェロイド共培養 3 日目のスフェロイドを回

収し、Erk-MAPK, Akt のリン酸化をウェスタンブロットで評価した。(図3)

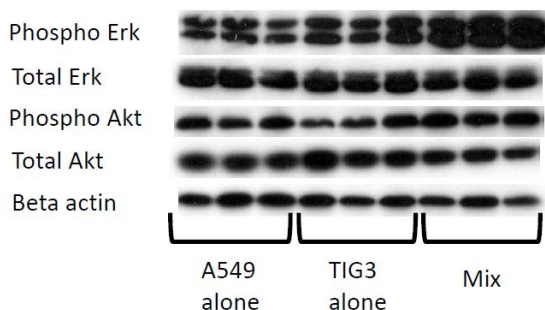


図3 スフェロイド培養系におけるシグナル伝達 共培養において phospho-Erk および phospho-Akt のシグナル増幅が確認できる (n=3)。

MTT アッセイの結果と同様、Erk のリン酸化が共培養で促進されることを確認した。同時に Akt もリン酸化されることを確認した。共培養によって抗アポトーシス経路のシグナル伝達が生じることが示唆された。

(3) 癌細胞と線維芽細胞のスフェロイド共培養により細胞傷害性に対する薬剤耐性は高まるが、EGFR 阻害剤に対する耐性は影響を受けない

単一細胞における薬剤に対する影響と2種の細胞の共培養下での薬剤に対する影響を対等に評価するために、A549のみ(10000cells/well)とTIG3のみ(10000cells/well)の2つのグループの総和とTIG3+A549(20000cells/well)を比較した(Figure 1&2)。まず Gemcitabine に関して評価すると、個別のスフェロイド培養に比して、線維芽細胞との共培養の方が明らかに薬剤耐性が高かった。非生理的な高濃度 Gemcitabine 環境においては、両群間の差は近接するものの、標準的治療量の範囲においては共培養によって抗がん剤耐性メカニズムが機能していることが示唆された。一方、Gefitinib を用いた試験では、共培養群においても単独細胞群に比較して Gefitinib の効

果が大きく減退しているという傾向は見られず、ともに薬剤濃度依存性に細胞数が低下した。すなわち、EGFR 阻害剤に関しては癌細胞と間質細胞が共存する癌微小環境下において、薬剤耐性が誘導されることを今回の研究においては立証することができなかった。結果の差異が生じた原因として、Gefitinib 投与モデルでは gemcitabine モデルに比して、細胞の生死が安定せず、技術的な困難が存在したことは否定できない。しかしながら、癌微小環境下で癌細胞と間質細胞の相互作用により薬剤耐性が誘導される可能性はこれまでに報告されており、今後培養条件、評価時の検討を要する。

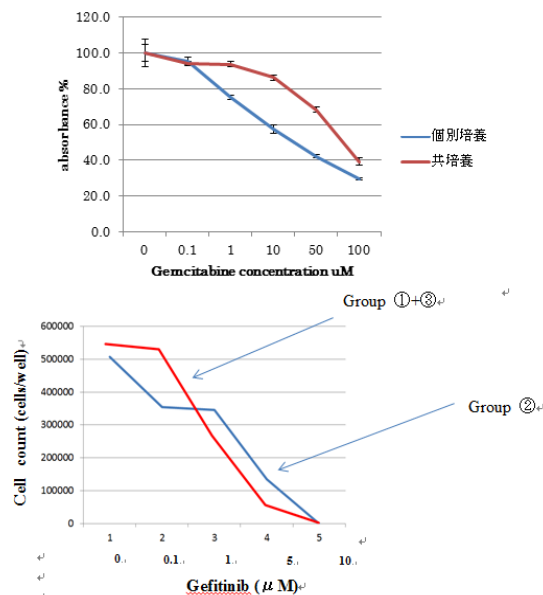


図4 抗がん剤耐性試験

(4) 癌細胞と線維芽細胞の共培養により Angpt14 発現が増強する

共培養により 転移浸潤に関わるシグナル伝達が高まること、抗アポトーシス活性や薬剤耐性メカニズムが高まることから、このシステムに上皮間質相互関連にかかわる因子が働いているものと推察した。すなわち、癌細胞との接触で線維芽細胞由来の TGF-beta が逆行性に癌細胞に働きかけ、下流の遺伝子発現が促進してくることが形質に

影響しているのではないかと、という仮説を立てた(図5)

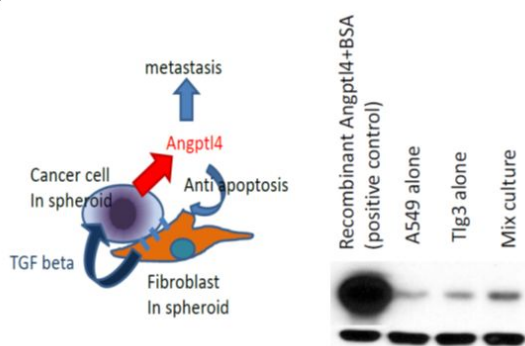


図5 左) 仮説モデル 線維芽細胞由来 TGFbeta 刺激が癌細胞の Angpt14 発現を介してスフェロイドの表現形を左右する 右) Angpt14 蛋白発現解析(ウエスタンブロット)

そこで、培養したスフェロイドを回収し Angpt14 発現をウエスタンブロットで解析したところ、共培養モデルで Angpt14 発現が高くなることが確認された。興味深い事に、Angpt14 発現は線維芽細胞内にも確認された。スフェロイドをトリプシン処理および物理的サスペンションで分離し、磁気ビーズ法で A549 細胞を回収した上で定量的 PCR で Angpt14 発現を調べたところ、Angpt14 mRNA は単独培養の場合に比して 4 - 6 倍上昇することが確認できた (Data not shown)。以上から、このモデルにおける Angpt14 の関与が示唆されたが、時間的制約でそれ以上の追究には至らなかった。

#### (5) スフェロイド共培養がと転移の関連を調べる in vivo モデルの樹立

癌細胞(A549)単独で 2D 培養した場合 NCP を用いて癌細胞をスフェロイド培養(3D 培養)した場合 線維芽細胞(TIG3)と癌細胞をスフェロイド共培養した場合の 3 つのグループに分けてそれぞれ培養し、同量をヌードマウスに尾静注し、4 週間後に形成された肺転移巣の肉眼的個数を比較した。いずれにおいても肺転移巣は形成されたがスフェロイ

ド共培養下ではより転移巣が目立つ傾向にあった。スフェロイド培養を用いて細胞集会型転移を検討するための再現性のある実験モデルを確認し、これらをマウスに尾静注することで肉眼的に転移高率の差を比較することができるという転移形成モデルを作成した。現時点でモデルの安定性に難があることと、通常培養モデルでも転移頻度が高いため、条件検討を継続したいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他] なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 繁紀 (SUZUKI SHIGEKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 80645672

##### (2) 研究協力者

羽藤 泰 (HATO TAI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 10365281