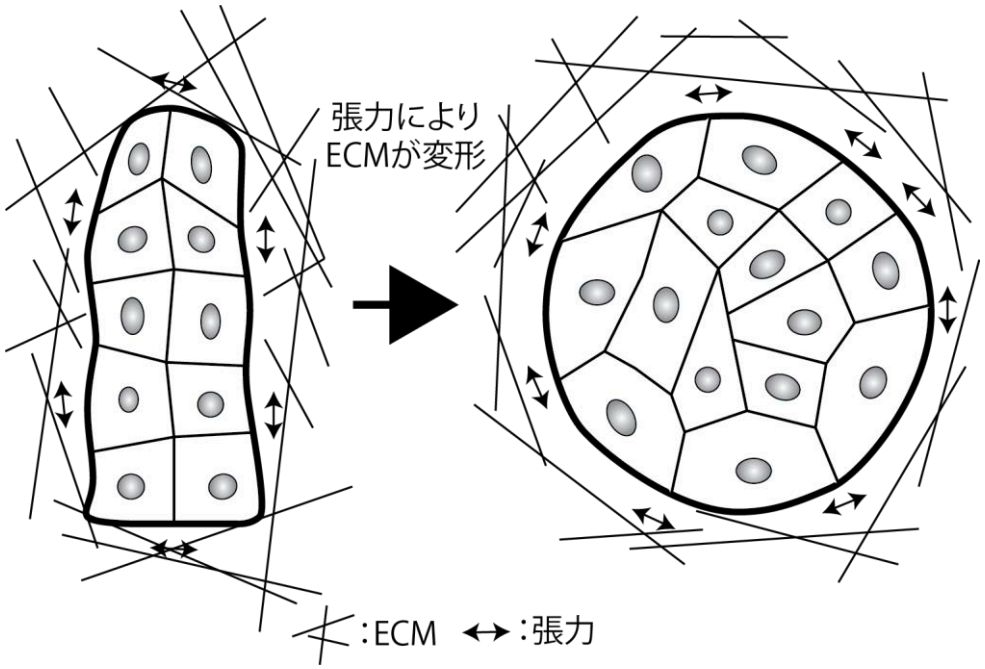
126　腫瘍組織の形態形成機構およびその意義の解明	加藤　琢哉

【目的】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様な意義を持つのかは明らかにされていない。我々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。

【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。

【結果】三次元浸潤実験の結果から、細胞集団におけるアクトミオシン活性の局在を撹乱することで浸潤部の肥厚化や、ECM 内での癌細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。また、ヌードマウスを用いた実験から、*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。今回の結果は、細胞集団の外縁部に局在するアクトミオシン活性が、集団外縁部に張力を発生させることで周囲の ECM を押しのける力が作用し、浸潤部位の肥厚化や ECM 内での高効率な増殖に繋がることを示唆している。

細胞間張力による増殖スペースの確保



126. 腫瘍組織の形態形成機構およびその意義の解明

加藤　琢哉

北里大学 医学部 病理学

Key words：癌細胞浸潤，形態形成

緒　言

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。がん細胞の移動・浸潤は大きく分けて単一細胞浸潤及び集団的浸潤の２種類に分けられる。単一細胞浸潤については従来よく研究されてきたが、最近の 10 年間で集団的移動・浸潤ががんの進展に果たす役割についても研究が進められてきた。その中で移動するがん細胞集団が鎖状、出芽様など複数の異なる形態を取りうることが明らかにされてきた［1］。しかしながら、当初の集団的移動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様な意義を持つのかは明らかにされていない。

生体内における腫瘍浸潤を再現するための研究の一環として、がん患者由来の組織片を用いた三次元腫瘍浸潤実験の経時観察を行なったところ、同一患者由来の組織片であっても部位によって異なる浸潤形態を示すということが観察された。このことから、異なる浸潤形態を示すがん細胞のヘテロな集団において、それぞれの細胞が各々の特性を発揮し、それらが組み合わさることで総体として腫瘍組織によく見られるような多様な形態を示すのではないかと考えた。この複雑な系を理解するためには、異なる浸潤形態においてがん細胞がどのように振る舞うのかを理解する必要がある。そこでまずそれぞれの浸潤形態がどのようなメカニズムで制御され、どのようにがんの進展に寄与しているのかを解明するため、本研究の発案に至った。

我々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。また、これらの細胞株が ECM に囲まれた環境で異なる増殖性を示すことが明らかとなった。そこで、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した。本研究は過去の浸潤・増殖研究とは異なるアプローチにより、腫瘍組織像とがんの悪性化との関連性について新たな知見を得ようとするものであり、その知見が従来の治療とは異なるコンセプトを基にした新規の治療・診断法開発の端緒となることが期待される。

方　法

過去の研究で、がん細胞の集団ではアクトミオシンの収縮が集団外縁部に限局され、細胞間接着部位においては抑制されることで細胞同士の協調的な運動が可能となることが示されている［2］。この情報を基に、浸潤部の増殖・形態形成においてもアクトミオシン収縮が空間的に制御され、がん細胞同士が協調的に働くことが重要ではないかと考えた。そこで、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（Y-27632）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、同時にこれらの細胞を ECM ゲル内に埋め込み、限定空間における増殖がどのように影響を受けるかを解析した。さらに、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を検討した。

1. 三次元浸潤実験系

Collagen I および Matrigel をそれぞれ 4 mg/ml、2 mg/ml となるように混合し、24 ウェルプレートに 1 ml ずつ加え、37℃で 2 時間ゲル化させた。ゲル上に 5×10^5の癌細胞と 2.5×10^5の CAF を混合して播種し、37℃、5% CO_2 で 24 時間静置した。ゲルでコートしたナイロンメッシュを敷いた金属メッシュ製のブリッジ上にゲルでコートしたナイロンメッシュを敷き、その上に細胞を乗せたゲルを移してゲルの下に培養液を満たして 6 日間培養した。ゲルを PFA にて 24 時間固定後、半割した切断面の画像を共焦点顕微鏡にて取得した。

2. 三次元培養

Collagen I および Matrigel をそれぞれ 4 mg/ml、2 mg/ml となるように混合し、種々の細胞株を 3.0×10^3/ml となるように加えた。混合ゲル 100 μl を 96 ウェルプレートに滴下し、37℃で 2 時間ゲル化させた後に 100 μl の培養液を加えた。培養開始後 4、6、8 日後に顕微鏡下で癌細胞集塊の撮影を行い、その長径と短径から体積を計算して定量化を行った。

3. ヌードマウス皮内腫瘍移植実験

Matrigel に癌細胞株を 5×10^7になるように懸濁し、20 μl をヌードマウスの耳の皮内に移植した。3～4 日毎に形成された腫瘍の長径と短径を計測し、体積を計算して定量化を行った。腫瘍が一定体積に達した時点でマウスを安楽死させ、頸部リンパ節を含んだ組織を固定し、リンパ節転移の有無を検討した。

結　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撹乱することが可能であることが明らかとなった。

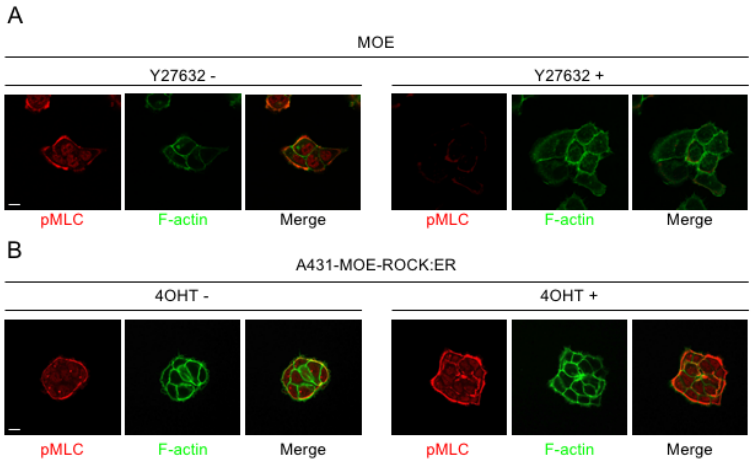


図 1. ROCK の阻害および活性化によるアクトミオシン活性の局在変化

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。スケールバーは 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。スケールバーは 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。

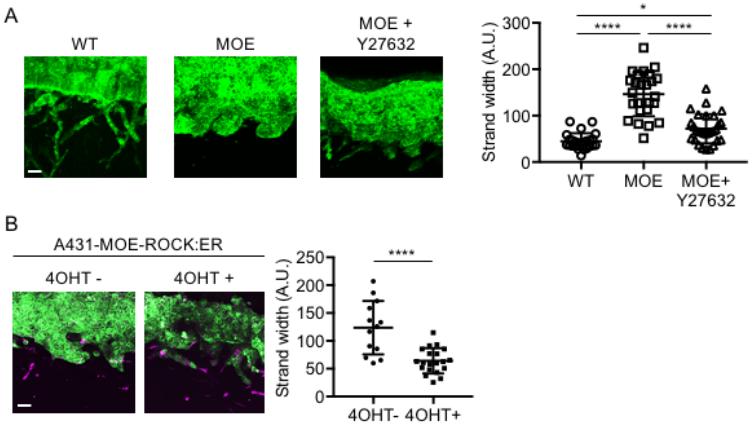


図 2. ROCK の阻害および活性化による浸潤部位の肥厚化への影響

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）。*p＜0.05、****p＜0.0001、One-way ANOVA。スケールバーは 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）。****p＜0.0001、Student's t-test。スケールバーは 50 μm。

3. ROCK の強制活性化による癌細胞増殖への影響

我々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撹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）。

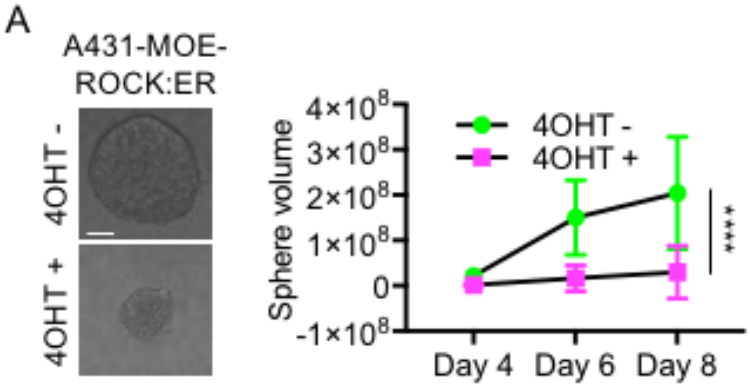


図 3. ROCK の強制活性化による癌細胞増殖への影響

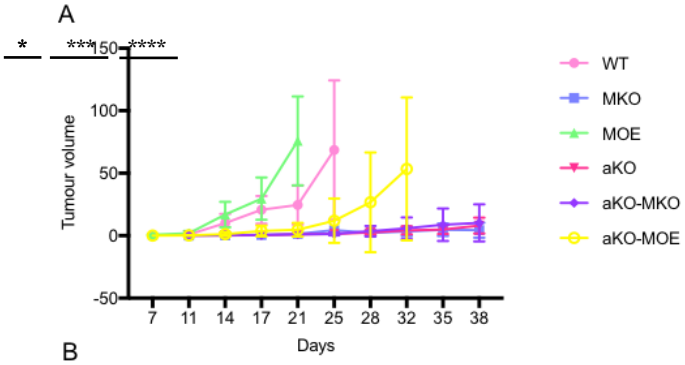
A431-MOE-ROCK:ER 細胞を用いた三次元培養実験。4OHT 処理群、未処理群に分けた。癌細胞塊の長径と短径を計測して体積を計算し、定量化した（右グラフ）。

****p＜0.0001、Student's t-test。スケールバーは 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

我々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。

A



B

	WT	MKO	MOE	aKO	aKO MKO	aKO MOE
Met +	3	0	8	0	0	2
Met -	5	3	1	3	4	4

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。*p＜0.05、***p＜0.001、****p＜0.0001、One-way ANOVA。

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トミオシン活性の局在を撹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 を押しのけ、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 を押しの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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、英国 The Francis Crick Institute、Tumour Cell Biology 研究室の Erik Sahai 博士および Robert Jenkins 博士である。

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.