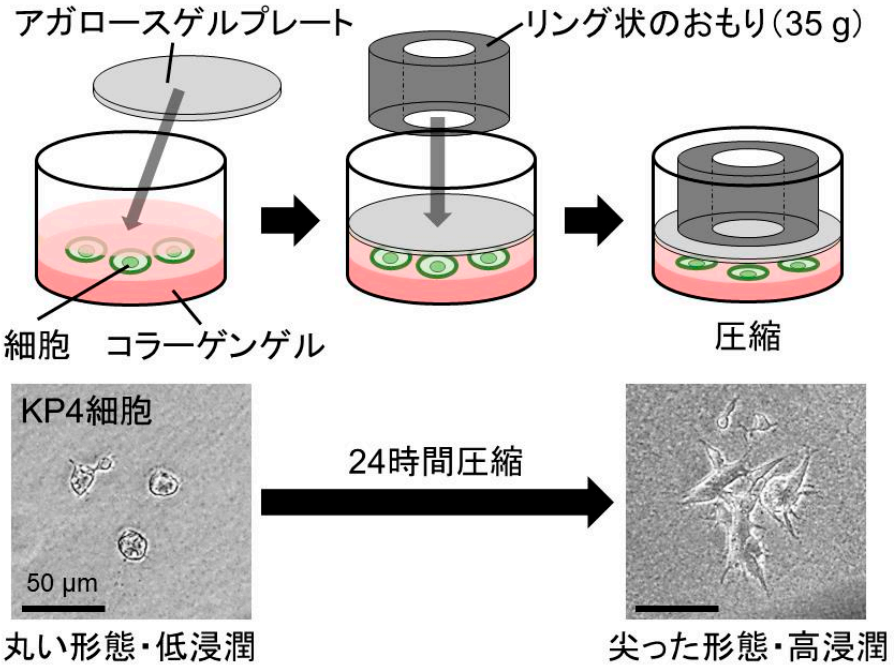
128　圧縮ストレスに引き起こされるがん細胞の浸潤能獲得	石原　誠一郎

【目的】本研究では、がん細胞が圧縮されることにより受けるストレス（圧縮ストレス）が、がんという病態を悪化させることを示し、その機序を明らかにすることを目指した。腫瘍中ではがん細胞は圧縮ストレスを受けている（図上）。がんが進行しがん細胞が増殖するにつれて腫瘍の体積が増加する。これにより周囲の組織が押されて、同時にその反作用で腫瘍中のがん細胞が圧縮ストレスを受ける。がん細胞は種々のストレスに応答して浸潤能を変化させることが知られている。しかし、圧縮ストレスががん細胞の浸潤能を変化させるかは未解明である。本研究では圧縮ストレスががん細胞の浸潤能を上昇させると仮説を立て、それを検証した。がん細胞が周囲の組織を破壊する能力を得ると、浸潤能は上昇する。それに大きく寄与するのが組織を分解する酵素である Matrix metalloproteinase（MMP）である。そこで圧縮ストレスにより MMP の発現増加が起こるかを検証した。また MMP が圧縮ストレスにより発現増加する分子メカニズムの解明を目指した。

【方法】我々は、がん細胞が浸潤することができるゲル（コラーゲンゲル）中に細胞を埋め込んだのちに細胞を圧縮する実験系を確立した（図中）。この方法では、コラーゲンゲル中で細胞を培養したのちにアガロースゲルプレートを載せ、その上からリング状のおもりを載せることにより細胞を圧縮することを可能とした。実際に細胞は体積比で 30% ほど圧縮されていた。リング状のおもりを用いることにより、その穴を通して細胞を観察することが可能である。

【結果】上記の実験系を用いて、圧縮後に膵臓がん細胞株 KP4 細胞がコラーゲンゲルを押しのけて広がっていく様子、すなわち浸潤する様子を観察することに成功した（図下）。さらに、圧縮された膵臓がん細胞株 AsPC1 細胞はコラーゲン分解能をもつ分子である MMP1 の発現を増加させることを発見した。加えて、圧縮ストレスによる MMP1 の高発現は、亜鉛依存的に活性化する ERK によって誘導されることを見出した。以上より、圧縮ストレスにさらされた膵臓がん細胞は MMP1 依存的に浸潤能を獲得することが示唆された。

圧縮ストレスを受けたがん細胞の浸潤を観察する新規実験系



128. 圧縮ストレスに引き起こされるがん細胞の浸潤能獲得

石原　誠一郎

北海道大学 大学院先端生命科学研究院 細胞ダイナミクス科学研究室

Key words：がん，圧縮ストレス，浸潤，MMP1，ERK

緒　言

がんは1984年以降日本の死因第一位の病気であるため、治療法の改善が強く望まれている。がんの悪化は以下の過程を経て起こる。すなわち、がん細胞が増殖してその塊（腫瘍）を形成し、周囲の組織を破壊しながら運動（浸潤）し、最終的には別の場所で腫瘍を形成（転移）して患者を死に至らしめる。がんによる死因の 90%以上は転移によるものであるため、転移の抑制はがん患者の生存率上昇につながる。転移を抑制するためにはその初期段階である浸潤を抑制することが重要である。しかしながら、がん細胞が浸潤する能力（浸潤能）を獲得する仕組みの詳細は不明である。

腫瘍中ではがん細胞は圧縮ストレスを受けている（図 1）。がんが進行しがん細胞が増殖するにつれて腫瘍の体積が増加する。これにより周囲の組織が押されて、同時にその反作用で腫瘍中のがん細胞が圧縮ストレスを受ける。しかしながら、圧縮ストレスががん細胞に与える影響についてはほとんど研究されていない。

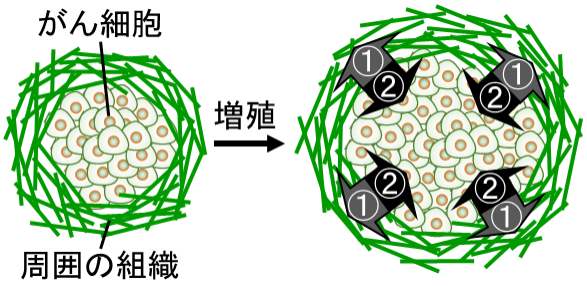


図 1. がん細胞が受ける圧縮ストレス

① がん細胞は無限に増殖し周囲の組織を圧迫する。

② その反作用でがん細胞が圧縮ストレスを受ける。

最近になって、アルギン酸ゲルに埋め込んだがん細胞を圧縮すると VEGF などの分子の発現が上昇することが示された［1］。一方、圧縮ストレスががん細胞の浸潤能に影響を与えるかは不明である。がん細胞はアルギン酸ゲルを破壊することができないため、先行研究の実験系は浸潤を観察する上では不適であった。そこで我々は、これまでに独自に確立した三次元コラーゲンゲル中での培養法［2］を応用し、がん細胞が浸潤することが可能なゲル中でがん細胞を培養し、その状態でがん細胞を圧縮することができる実験系を確立した。本研究では圧縮ストレスががん細胞の浸潤能を増加させることを示し、加えてそれに寄与する分子を特定することを目指した。

がん細胞が周囲の組織を破壊する能力を得ると、浸潤能は上昇する。それに大きく寄与するのが組織を分解する酵素である Matrix metalloproteinase（MMP）である。そこで圧縮ストレスにより MMP の発現増加が起こるかを検証した。また MMP が圧縮ストレスにより発現増加する分子メカニズムの解明を目指した。

方　法

1. コラーゲンゲル中で細胞を圧縮する実験系の新規確立

コラーゲンゲルに細胞を埋め込んだ状態で圧縮ストレスを与え、その前後で細胞の形を観察することが可能な培養法を独自に確立した（図 2 上)。コラーゲンゲルはもろく崩れやすいため壊さずに圧縮することが難しかったが、アガロースゲルプレートと適切な重さのおもりを用いることでゲルを崩すことなく圧縮することに成功した。実際に細胞は体積比で 30%ほど圧縮されていた。またリング状のおもりを使うことでその穴を通して細胞を観察することを可能とした。この方法を用いて膵臓がん細胞株である KP4 細胞を圧縮したところ、丸い形態で低浸潤性の細胞が圧縮後に突起を伸ばしながら浸潤する様子がみられた（図 2 下)。以降はこの実験系を用いて細胞に圧縮ストレスを与え、細胞の応答を調べた。

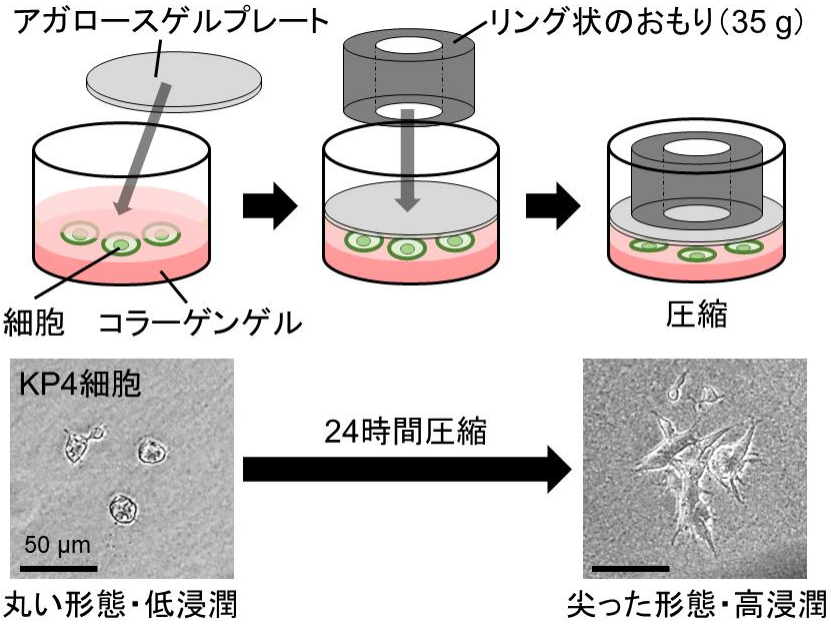


図 2.　コラーゲンゲル中で細胞に圧縮ストレスを与える新規培養法
コラーゲンゲル中で細胞を培養したのちにアガロースゲルプレートを載せ、その上からリング状のおもりを載せることで細胞を圧縮することが可能となった。圧縮前の膵臓がん細胞株（KP4 細胞）は丸く低浸潤性の形態を示すが、24 時間の圧縮後には尖った高浸潤性の形態に変化した。

2. qPCR

圧縮ストレスによって発現増加する mRNA を調べるために、膵臓がん細胞である AsPC1 細胞に圧縮ストレスを付加して 24 時間後に RNA を抽出し、逆転写反応の後に qPCR を行った。内在性コントロールとして beta-actin（ACTB）を用いた。

3. Western blotting

圧縮ストレスによって発現増加または活性変化するタンパク質を調べるために、AsPC1 細胞に圧縮ストレスを付加して 24 時間後に SDS sample buffer を用いてタンパク質を抽出し、Western blotting を行った。内在性コントロールとして beta-actin（ACTB）を用いた。

結果および考察

1. 圧縮ストレスにより MMP1 の発現が増加する

圧縮ストレスにより AsPC1 細胞で発現増加する遺伝子を qPCR で網羅的に解析した。その結果、MMP の一種である MMP1 の mRNA の発現が圧縮ストレスにより 20 倍程度増加することを発見した（図 3a）。さらに、膵臓がん患者のデータベースを用いた解析により、MMP1 の高発現と予後不良が相関していることを見出した（図 3b）。これらの結果から、圧縮ストレスを受けた膵臓がん細胞は、MMP1 を介して膵臓がんの予後不良をもたらすことが示唆された。

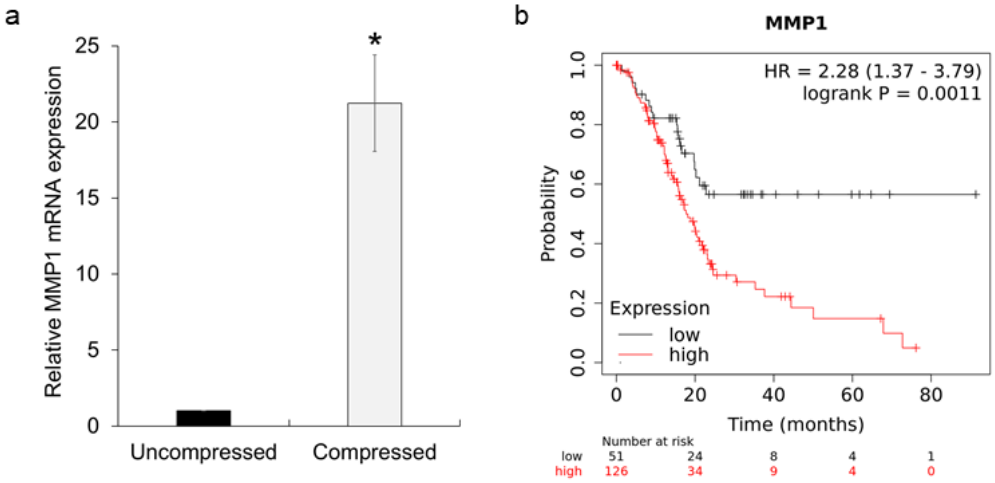


図 3. 圧縮ストレスによる MMP1 の mRNA 発現増加

a） qPCR によって検出した MMP1 の mRNA 発現。ACTB で規格化。Uncompressed：非圧縮、Compressed：圧縮（24 時間）。Mean±S.E.（N＝3 experiments）、*P＜0.01（Welch's t-test）。

b） KM plotter データベースで解析した膵臓がん患者の予後と MMP1 発現の相関。

2. 圧縮ストレスにより ERK の活性化が起こることで MMP1 の発現が増加する

次に、圧縮ストレス依存的な MMP1 の高発現をもたらす分子機構を調べるために、薬剤スクリーニングにより MMP1 の発現低下をもたらす分子の同定を試みた。その結果、MEK／ERK 経路の阻害剤である U0126 の投与により、圧縮ストレス依存的に上昇する MMP1 の mRNA 発現が有意に抑制されることを発見した（図 4a）。この結果から、圧縮ストレスにより活性化された MEK／ERK 経路が MMP1 の高発現を引き起こすと考えた。そこで、圧縮ストレスが MEK／ERK 経路の活性化を誘導するかを調べるために、本経路の主要な分子である ERK1/2 において、活性化の指標となるリン酸化が圧縮ストレスにより上昇するかを Western blotting により検証した。その結果、圧縮ストレスにより ERK1/2 の総タンパク質量とリン酸化 ERK1/2 の量が増加することを見出した（図 4b、c、d）。加えて、MMP1 のタンパク質量も圧縮ストレスにより増加し、また U0126 の投与により MMP1 のタンパク質量が減少することを明らかにした（図 4b、e）。以上より、圧縮ストレスは膵臓がん細胞の MEK／ERK 経路を活性化させることで MMP1 の高発現を誘導することが明らかとなった。

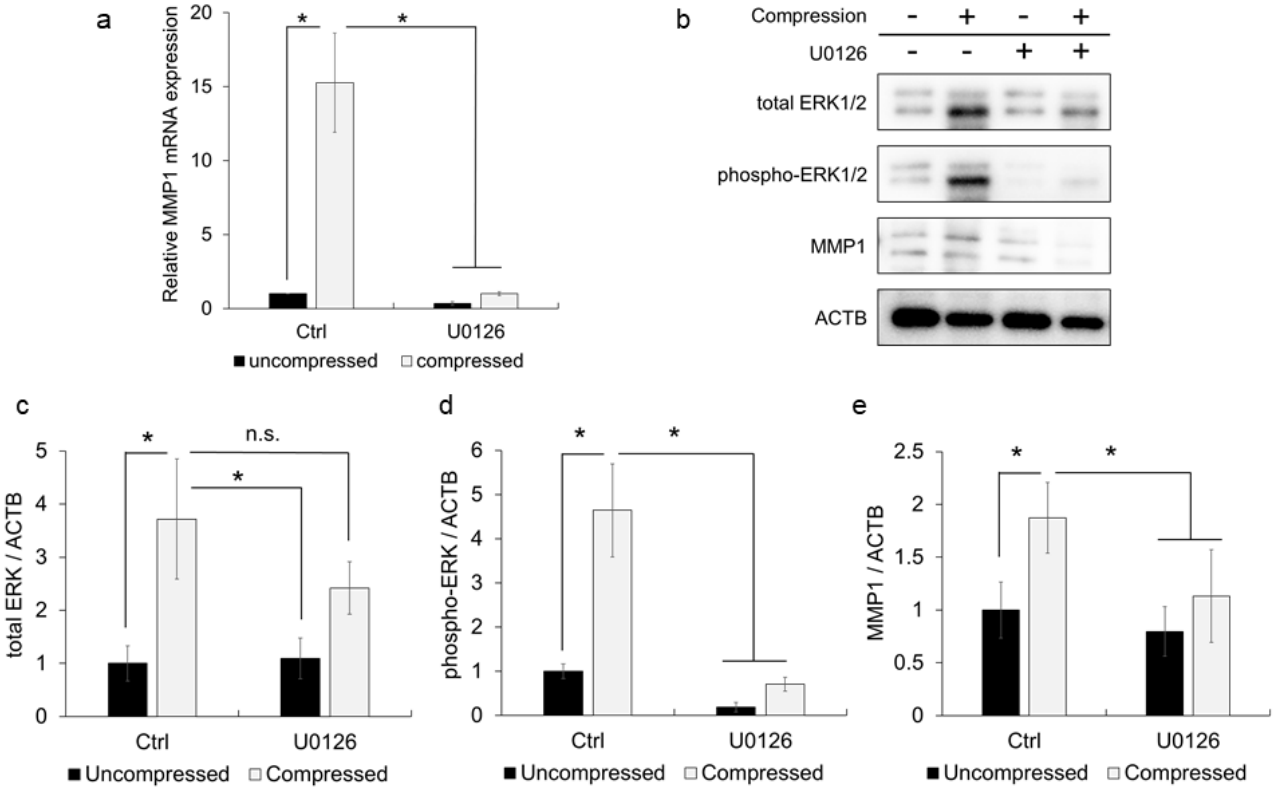


図 4. 圧縮ストレスによる MEK／ERK 経路依存的な MMP1 の発現増加

a) qPCR によって検出した MMP1 の mRNA 発現。ACTB で規格化。
Uncompressed：非圧縮、Compressed：圧縮（24 時間）。mean ± S.E.
（N＝3 experiments）、*P＜0.01（Welch's t-test）。

b) Western blotting によって検出したタンパク質の発現。

c、d、e) b）の定量結果。ACTB で規格化。mean±S.D.（N=3 experiments）、
n.s.：有意差なし、*P＜0.01（Welch's t-test）。

3. 圧縮ストレスによる MMP1 の発現増加と ERK の活性化は細胞内亜鉛に依存して起こる

最後に、圧縮ストレスが MEK／ERK 経路を活性化させるメカニズムに迫った。細胞内亜鉛をキレート剤（TPEN）によって枯渇させたところ、MMP1 の mRNA が有意に減少することを発見した（図 5a）。ERK1/2 の総タンパク質量は TPEN の投与により有意に変化はしなかった一方で（図 5b、c）、TPEN の投与によりリン酸化 ERK1/2 のタンパク質量は有意に減少した（図 5b、d）。また圧縮依存的に起こる MMP1 のタンパク質量増加も TPEN 投与により抑制された（図 5b、e）。以上より、圧縮ストレスは膵臓がん細胞において、細胞内亜鉛依存的に MEK／ERK 経路を活性化させ、MMP1 の発現を誘導することが示された。

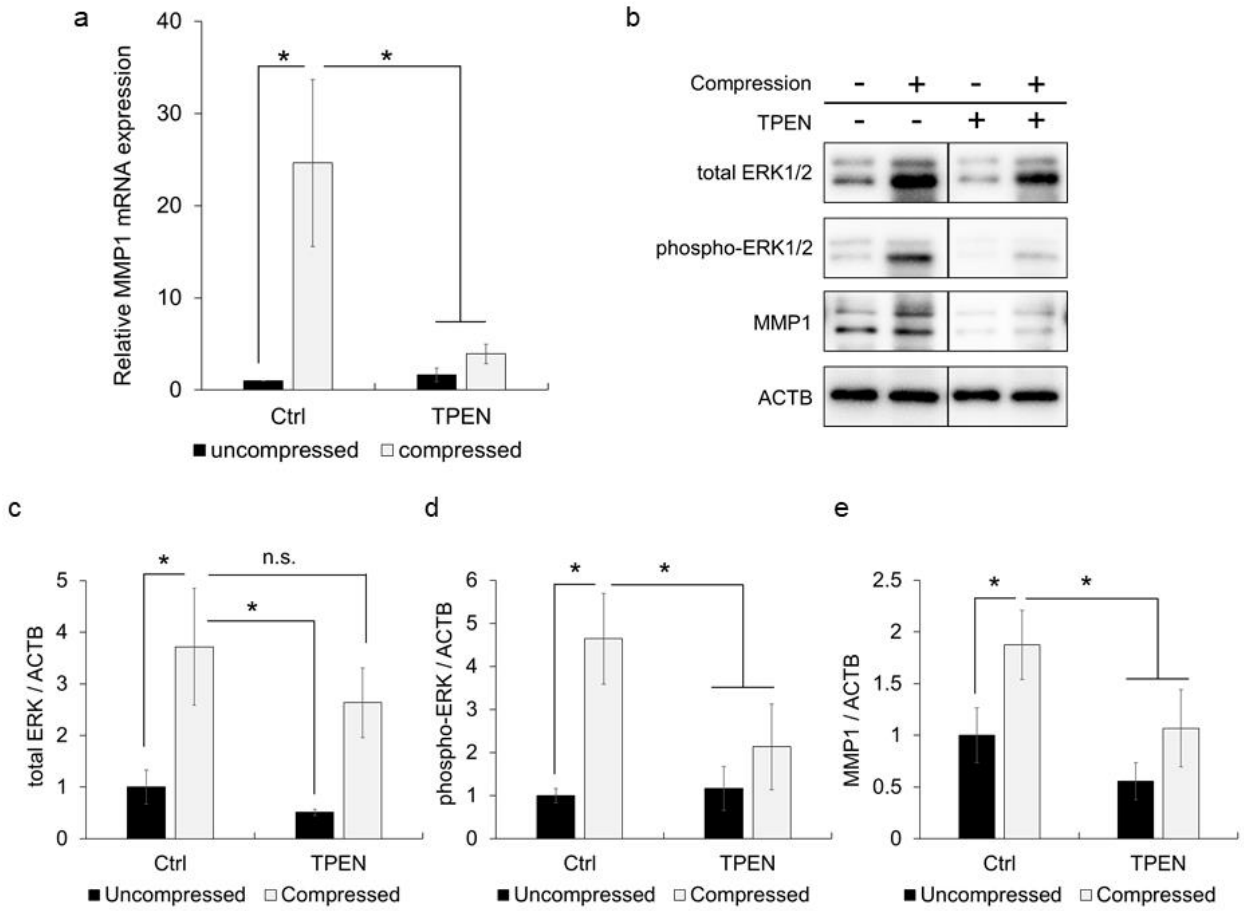


図 5. 圧縮ストレスによる細胞内亜鉛依存的な ERK1/2 活性化と MMP1 の発現増加

a) qPCR によって検出した MMP1 の mRNA 発現。ACTB で規格化。Uncompressed : 非圧縮、Compressed : 圧縮 (24 時間) 。mean±S.E. (N=3 experiments) 、*P<0.01 (Welch's t-test) 。

b) Western blotting によって検出したタンパク質の発現。

c、d、e) b) の定量結果。ACTB で規格化。mean±S.D. (N=3 experiments) 、n.s. : 有意差なし、*P<0.01 (Welch's t-test) 。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞ダイナミクス科学研究室のメンバーの方々である。特にご指導いただいた芳賀永教授、中心的な役割を果たして頂いた二瓶達也氏に深く感謝の意を表したい。

文 献

1) Kim BG, Gao MQ, Kang S, Choi YP, Lee JH, Kim JE, Han HH, Mun SG, Cho NH. Mechanical compression induces VEGFA overexpression in breast cancer via DNMT3A-dependent miR-9 downregulation. Cell Death Dis. 2017 Mar 2;8(3):e2646. doi: 10.1038/cddis.2017.73. PMID: 28252641; PMCID: PMC5386566.

2) Ishihara S, Yasuda M, Ishizu A, Ishikawa M, Shirato H, Haga H. Activating transcription factor 5 enhances radioresistance and malignancy in cancer cells. Oncotarget. 2015 Mar 10;6(7):4602-14. doi: 10.18632/oncotarget.2912. PMID: 25682872; PMCID: PMC4467102.