

圧縮ストレスが誘導するがん細胞の浸潤能獲得機構

北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞ダイナミクス科学研究室

石原 誠一郎

<背景>

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。がんは1984年以降日本人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。まずがん細胞が増殖してその塊（腫瘍）を形成し、次に周囲の組織を破壊しながら移動（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の上昇につながる。転移を食い止めるためには、その超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）を獲得する機構について詳細は不明である。

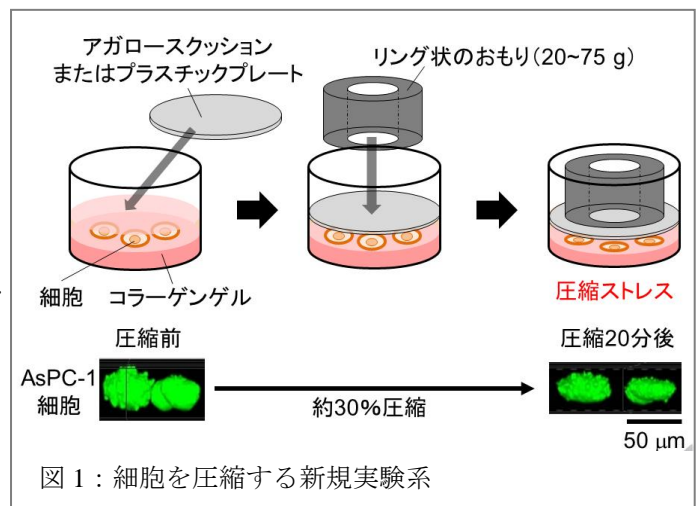
腫瘍中ではがん細胞が恒常的に圧縮ストレスを受けている。がん細胞は無限に増殖するため、それに伴い腫瘍の体積が増加する。腫瘍は他の組織に囲まれているため、腫瘍の体積の増加は周囲の組織の圧迫を引き起こす。その圧迫の反作用で腫瘍は圧縮され、その結果がん細胞が圧縮ストレスを受ける。がん細胞は様々なストレスに応答して浸潤能を変化させる。しかし、圧縮ストレスはがん細胞が恒常的に受けるストレスにも関わらず、圧縮ストレスががん細胞の浸潤能を変化させるかは未解明である。

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 (Kim *et al.*, Cell Death Dis., 2017)。一方、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。そこで申請者は、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 (Ishihara *et al.*, Oncotarget, 2015 等) を応用し、がん細胞が浸潤することが可能なゲル中での培養法を確立し、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。本研究ではがん細胞に加わる圧縮ストレスが浸潤能の上昇を引き起こすことを示し、それに寄与する分子機構を明らかにすることを目的とした。

<実験結果と考察>

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1上)。この系により体積比で約30%細胞(膵がん細胞株である AsPC1 細胞)を圧縮することに成功した(図1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。



2. 圧縮ストレスはミオシン調節軽鎖 (MRLC) の脱リン酸化を介して浸潤能を亢進させる

の脱リン酸化を介して浸潤能を亢進させる

我々はこれまでに、MRLC が二重リン酸化されるとがん細胞の浸潤能が低下することを報告している (Ishihara *et al.*, FEBS Lett., 2013). そこで圧縮ストレスにより肺がん細胞株である H1299 細胞の MRLC のリン酸化状態が変化するかを調べた. Western blotting の結果, 二重リン酸化された MRLC (2P-MRLC) の量が圧縮ストレスにより減少することを発見した (図 2A). さらに, MRLC リン酸化阻害剤 (Y27632) の投与により H1299 細胞の浸潤能が上昇することを確認した (図 2B). これらの結果より, 圧縮ストレスは H1299 細胞において MRLC の二重リン酸化を抑制することで浸潤能を亢進させることを示した (図 2C).

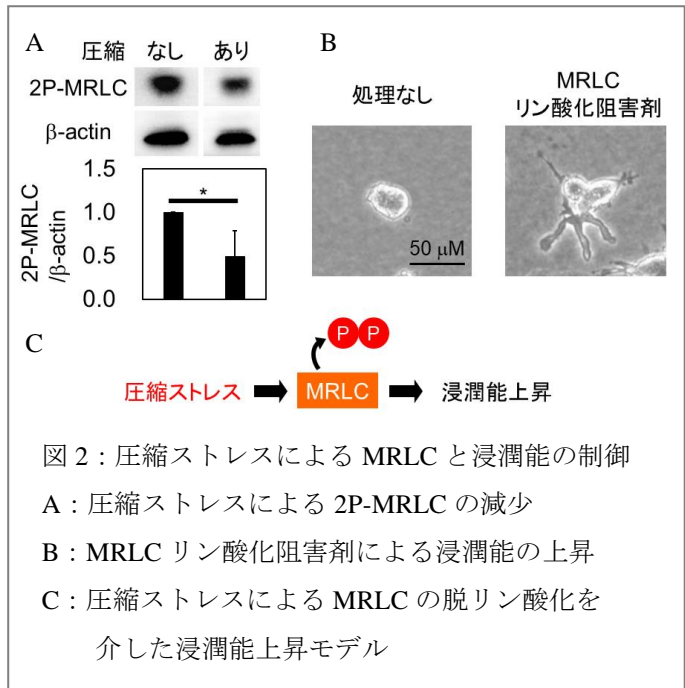


図 2: 圧縮ストレスによる MRLC と浸潤能の制御

A: 圧縮ストレスによる 2P-MRLC の減少

B: MRLC リン酸化阻害剤による浸潤能の上昇

C: 圧縮ストレスによる MRLC の脱リン酸化を介した浸潤能上昇モデル

3. 圧縮ストレスにより MMP1 の発現が増加する

さらに, 圧縮ストレスにより膵がん細胞株である 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, タンパク質分解酵素の一種である Matrix Metalloproteinase-1 (MMP1) の mRNA 発現が圧縮ストレスにより有意に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関連していることを見出した. 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. また, 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 3A). これらの結果に加えて実験を重ね, 下記のモデルを立てた. すなわち, 圧縮ストレスは膵臓がん細胞において, 水輸送を介して細胞体積を減少させ, 細胞内遊離亜鉛を増加させることで MEK/ERK 経路を活性化し, その結果 MMP1 の発現を誘導することを発見した (図 3B).

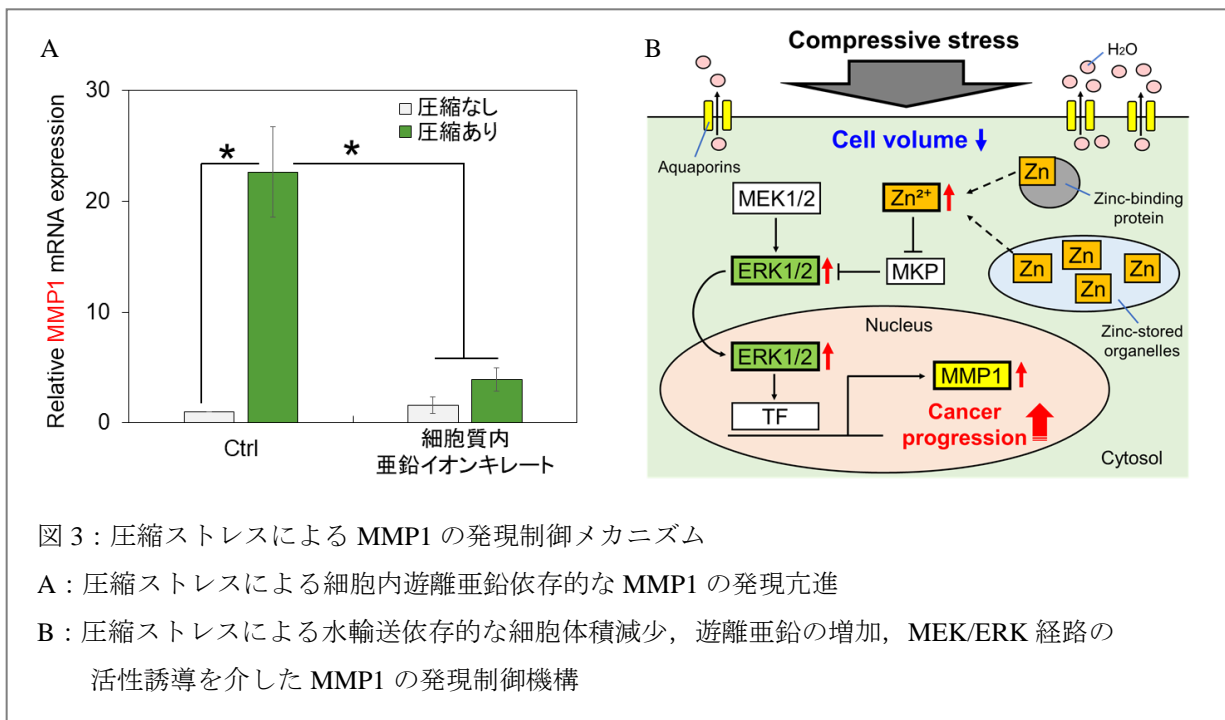


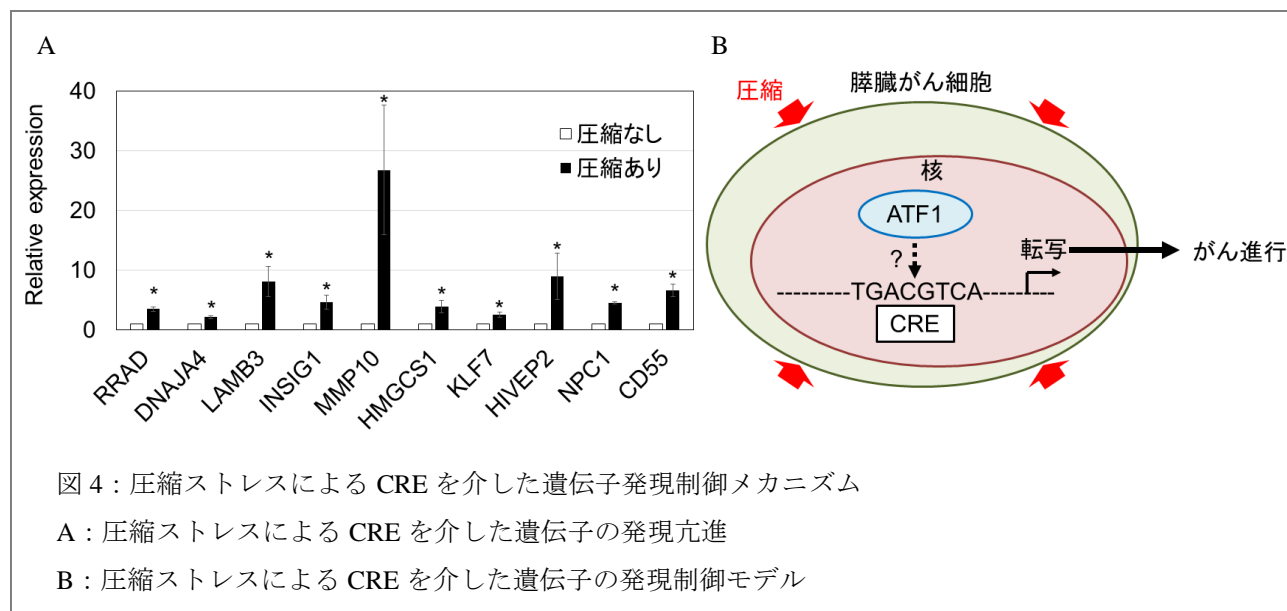
図 3: 圧縮ストレスによる MMP1 の発現制御メカニズム

A: 圧縮ストレスによる細胞内遊離亜鉛依存的な MMP1 の発現亢進

B: 圧縮ストレスによる水輸送依存的な細胞体積減少, 遊離亜鉛の増加, MEK/ERK 経路の活性誘導を介した MMP1 の発現制御機構

4. 圧縮ストレスにより CRE を介した遺伝子発現が増加する

加えて、圧縮ストレスにより AsPC1 細胞で遺伝子発現を制御するメカニズムの解析を目指した。ルシフェラーゼアッセイとマイクロアレイにより、AsPC1 細胞においてプロモーター領域に cAMP 応答配列 (CRE) をもつ遺伝子群の発現が圧縮ストレスにより上昇することを発見した。また Kaplan-Meier plotter database を用いた解析により、それらのうち膵がん患者の予後不良に相関する 10 の遺伝子 (MMP10 や LAMB3 等、ともに浸潤能に寄与する報告有) を同定した。さらに、これらの遺伝子の発現が圧縮ストレスにより増加することを qPCR により確かめた (図 4A)。現在はこれらの遺伝子制御を行う転写因子を同定すべく、さらなる解析を進めている。現在転写因子 ATF1 が関与することを示唆するデータが得られているため、今後はこの点について詳細を調べる予定である (図 4B)。



<謝辞>

本助成をいただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究会の関係者の皆様に深く感謝いたします。また北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞ダイナミクス科学研究室のメンバーの方々、特にご指導いただいた芳賀永教授、本研究の推進に中心的な役割を果たして頂いた平澤幸氏および二瓶達也氏、実験を進めていただいた佐野初美氏に深く感謝の意を表します。