

## がん細胞と正常間質細胞との相互作用の研究

現在の所属 東京理科大学生命医科学研究所発生及び老化研究部門  
昆 俊亮

### 1. 研究の背景及び目的

腫瘍組織の微小環境では、がん細胞によって教育された癌関連線維芽細胞 (CAF) や腫瘍関連マクロファージ (TAM) などの間質細胞が腫瘍進展に有利に作用することが知られている。しかしながら、がん細胞が間質組織に初めて出現したとき、がん細胞と正常間質細胞との間でどのような細胞間相互作用が生じているのか、その実態は未だ謎のままである。また、正常間質組織の抗腫瘍的な‘場’としての側面も多報報告されており、がん細胞が誕生した際の間質組織の役割について包括的に理解する必要がある。

上皮細胞層にがん変異を有した細胞が産生したとき、隣接する正常上皮細胞と変異細胞間で互いに生存を争う「細胞競合」現象が生じ、変異細胞は上皮層から管腔側へ押し出されるように排出されることが明らかとなってきた<sup>(1,2)</sup>。我々の研究グループでは、腸管上皮の最終分化した吸収上皮細胞に活性化 Ras 変異をモザイクに発現誘導できる細胞競合マウスモデルを作出し (Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウス)、Ras 変異細胞の大多数は細胞競合により管腔へと排除されることを報告した<sup>(3)</sup>。ヒト家族性大腸がんは APC→Ras の変異蓄積が好発することから、このマウスモデルの解析を深化させ、APC→Ras の変異蓄積によって細胞競合の機能がどのように変容するかを続いて検討した (APCmin/Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウス)。その結果、APC 欠損下で活性化 Ras 変異をモザイク誘導すると、細胞競合が脱制御した結果、基底膜へとびまん性に浸潤する変異細胞が増加することを見出した。さらには、基底膜へとびまん性に浸潤した変異細胞は絨毛上部間質内で拡張し、腫瘍を形成した。この腫瘍発生領域の周辺には腺腫様変化の成分が全く認められなかったため、正常粘膜より直接的に発がんしたと結論づけた。興味深いことに、Ras 単独変異細胞も極めて少数ではあるが基底膜へと浸潤するが、間質内では増殖することなく完全に駆逐された。このことから、正常間質組織は本来抗腫瘍的な場であり、Ras 単独変異など比較的悪性度の低い変異細胞は排除するのに対し、APC/Ras 二重変異など悪性度の高い細胞はその逆境に打ち勝ち、腫瘍進展に有利になるような間質環境を構築することが推察された。そこで本研究では、Ras 単独変異もしくは APC/Ras 二重変異の悪性度の異なるがん細胞と正常間質細胞、具体的には正常線維芽細胞との間でどのような細胞間相互作用が生じるかを解析することを目的とした。

### 2. 研究方法

上記「研究の背景及び目的」で記述した APCmin/Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウスで観察された APC/Ras 変異細胞のびまん性浸潤を培養細胞を用いて再現するため、APC 欠損と同様に Wnt シグナルを活性化する  $\beta$ -catenin の N 末欠損変異体を恒常的に発現する細胞株 ( $\beta$ -cat  $\Delta$ N 細胞) と  $\beta$ -catenin の N 末欠損変異体を恒常的に発現し、かつテトラサイクリン依存的に活性化 Ras 変異を発現する細胞株を樹立した ( $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞)。上記細胞株を 50:1 の比率でコラーゲンゲル上に混合培養し、細胞層形成後、テトラサイクリン添加により Ras 変異を誘導し、マウスと同様の条件を模倣した。その結果、 $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞の単独培養時にはコラーゲンゲルへの浸潤は認められなかったが、 $\beta$ -cat  $\Delta$ N 細胞との混合培養時にコラーゲンゲルへと浸潤する  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞が著しく増加することが分かり、マウスで観察されたように細胞非自律的な  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞のびまん性浸潤を再現することに成功した。一方、RasV12 単独変異細胞 (RasV12 細胞) を正常細胞と混合培養すると、基底膜へと浸潤する細胞は認められず、管腔側へと逸脱する<sup>(3)</sup>。そこでこれらの細胞株を用いて、悪性度の異なるがん変異細胞と正常線維芽細胞との細胞間相互作用を解析するため、RasV12 細胞もしくは  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞を単独培養、もしくは正常線維芽細胞である NHDF 細胞と 1:50 の比率 (がん変異細胞:NHDF 細胞=1:50) で混合し、プラスチックディッシュ上に播種、もしくはマトリゲルに包埋したものを培養し、各々の細胞の挙動を観察した。

### 3. 研究結果

プラスチックディッシュにがん変異細胞と NHDF 細胞とを混合培養し、24 時間、48 時間、72 時間後の変異細胞と正常線維芽細胞の挙動をはじめに評価した。比較対象として、RasV12 細胞もしくは  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞を単独で培養したところ、変異細胞はコロニー状に経時的に増加していくことを確認できた。続いて、 $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞を NHDF 細胞と共培養した場合、単独培養時と同程度に変異



細胞は生存、増殖しており、NHDF 細胞存在下でも目立った変化は認められなかった。一方、RasV12 細胞を NHDF 細胞と共培養すると、時間経過とともに細胞が肥大化していき、細胞増殖能が著しく低下し、明らかに性状変化している様子が観察された(図1)。これらの結果から、NHDF 細胞は RasV12 細胞の増生を抑制する機能を有することが示唆され、RasV12 変異に  $\beta$ -catenin の活性化変異をさらに負荷すると、この抑制効果が干渉されることがわかった。

続いて、より生理条件に近い環境下でのがん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用を解析するため、マトリゲルに細胞を包埋して培養を行った。RasV12 細胞または  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞を単独培養したとき、二次元培養のときとは異なり、変異細胞は cyst 様の構造を形成し増殖した。一方、NHDF 細胞と共培養したがん変異細胞は、Ras 単独変異もしくは  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 変異の場合でも、cyst 様の構造は形成されず、仮足伸長を伴った間葉系細胞様に形態変化した(図2)。さらには、NHDF 細胞と接触した RasV12 細胞の一部では核が断片化し、細胞死が誘導された細胞が認められた。そこで、死細胞の割合を計測したところ、RasV12 細胞を単独培養したときに比し、NHDF 細胞と共培養した RasV12 細胞では死細胞数が増加した。一方、 $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞ではこのような細胞非自律的な細胞死の誘導はほとんど認められなかった(図3)。これらの結果より、マトリゲルに存在する正常線維芽細胞はがん変異細胞に EMT 様な変化を誘導するとともに、Ras 単独変異細胞には細胞死を誘導することが示唆された。今後は、培養時間をより長くして観察することやタイムラプスイメージングを行うことにより、より詳細にがん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用の実態を解析していく予定である。

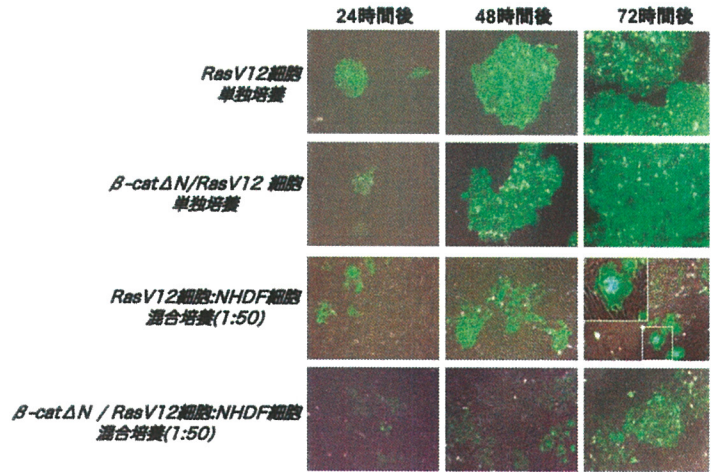


図1. プラスチックディッシュ上でのがん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用

RasV12 細胞または  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞を単独培養、もしくは NHDF 細胞と共培養したときの様子を示す。NHDF 細胞と共培養した RasV12 細胞は肥大化する(72時間後、拡大図)。

RasV12 細胞または  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 変異の場合でも、cyst 様の構造は形成されず、仮足伸長を伴った間葉系細胞様に形態変化した(図2)。さらには、NHDF 細胞と接触した RasV12 細胞の一部では核が断片化し、細胞死が誘導された細胞が認められた。そこで、死細胞の割合を計測したところ、RasV12 細胞を単独培養したときに比し、NHDF 細胞と共培養した RasV12 細胞では死細胞数が増加した。一方、 $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞ではこのような細胞非自律的な細胞死の誘導はほとんど認められなかった(図3)。これらの結果より、マトリゲルに存在する正常線維芽細胞はがん変異細胞に EMT 様な変化を誘導するとともに、Ras 単独変異細胞には細胞死を誘導することが示唆された。今後は、培養時間をより長くして観察することやタイムラプスイメージングを行うことにより、より詳細にがん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用の実態を解析していく予定である。

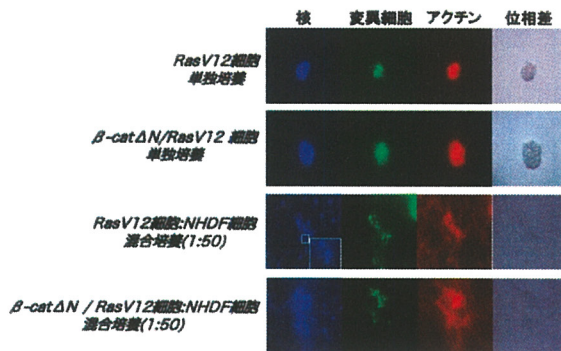


図2. マトリゲル内でのがん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用

RasV12 細胞または  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞を単独培養、もしくは NHDF 細胞と共培養したときの様子を示す。NHDF 細胞と共培養した RasV12 細胞の一部は細胞死する(核染色、拡大図)。

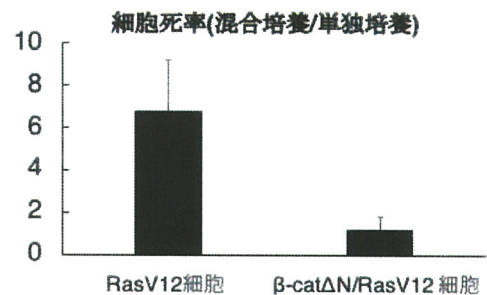


図3. 細胞死率の定量

マトリゲル内で RasV12 細胞または  $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 細胞を単独培養、もしくは NHDF 細胞と共培養したときの細胞死の比率を示す。

#### 4. 考察

本研究成果より、正常線維芽細胞とがん変異細胞が共存したとき、がん変異細胞の悪性度の違いによって、変異細胞は異なる表現型を示すことがわかった。具体的には、RasV12 単独変異など悪性度の低いがん変異細胞は細胞増殖が抑制されるのに対し、 $\beta$ -cat  $\Delta$ N/RasV12 変異など比較的悪性度が高い細胞は、正常線維芽細胞による増殖抑制圧に対して抵抗性を獲得することが示唆された。一般的に、腫瘍間質に存在する線維芽細胞は CAF に形質転換し、増殖因子、サイトカインや細胞外基質の分解酵素を分泌することにより、がん細胞の増殖と転移を助長することが知られており、線維芽細胞はがん進展に有利に作用するというのが現在の趨勢である。他方、線維芽細胞は制がん機能を有することも提唱されており、古くは Miceal Stoker 博士らの研究グループによって、ポリオーマウイルスによってがん化した細胞を正常線維芽細胞と共培養すると、がん細胞の増殖が顕著に抑制されることが報告されている<sup>4)</sup>。また近年では、膵がん発症モデルの実験結果より、線維芽細胞が膵がん細胞の増生に抑制的に機能することが報告

された<sup>6)</sup>。これらの知見を統合すると、がん種(遺伝的背景や細胞種など)や腫瘍環境のコンテキスト依存的に線維芽細胞はがん促進的に作用するし、抑制的にも作用し得ることが考えられる。従って、これまで線維芽細胞のがん促進効果ばかり着目されていたが、正常線維芽が有する制がん機能の作用機序ならびに分子論的メカニズムを明らかにすることができれば、線維芽細胞が担う抗腫瘍機能を活用した革新的な制がん戦略の基盤が構築できるものと期待でき、今後さらに研究を発展していきたい。

## 5. 謝辞

2018年度に研究室を立ち上げた私にとりまして、公益財団法人アステラス病態代謝研究会からの御支援がなければ本研究を進めることができませんでした。この場を借りまして厚く御礼申し上げます。

## 6. 参考文献

1. Ishibashi, K., Egami, R., Nakai, K. and Kon, S. An anti-tumorigenic role of the Warburg effect at emergence of transformed cells. *Cell Struct. Funct.*, 2018, 43, 171-176
2. Kon, S. Physiological and pathological relevance of cell competition in fly to mammals. *Dev. Growth Differ.*, 2018, 60, 14-20
3. Kon, S., Ishibashi, K., Katoh, H., Kitamoto, S., Shirai, T., Tanaka, S., Kajita, M., Ishikawa, S., Yamauchi, H., Yako, Y., Kamasaki, T., Matsumoto, T., Watanabe, H., Egami, R., Sasaki, A., Nishikawa, A., Kameda, I., Maruyama, T., Narumi, R., Morita, T., Sasaki, Y., Enoki, R., Honma, S., Imamura, H., Oshima, M., Soga, T., Miyazaki, J., Duchon, M. R., Nam, J. M., Onodera, Y., Yoshioka, S., Kikuta, J., Ishii, M., Imajo, M., Nishida, E., Fujioka, Y., Ohba, Y., Sato, T. and Fujita, Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.*, 2017, 19, 530-541
4. Stoker, M. G., Shearer, M. and O'Neill, C. Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 1966, 1, 297-310
5. Ozdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J. L., Zheng, X., Wu, C. C., Simpson, T. R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S. V., De Jesus-Acosta, A., Sharma, P., Mahmood, U., Chin, L., Moses, H. L., Weaver, V. M., Maitra, A., Allison, J. P., LeBleu, V. S. and Kalluri, R. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 2014, 25, 719-734