

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790221
 研究課題名（和文） 3-D 上皮細胞組織化モデルにおける動的細胞分化転換と形態制御の研究
 研究課題名（英文） Research of dynamic differentiation and morphogenesis in 3-D epithelial tubulogenesis
 研究代表者
 酒井 克也（SAKAI KATSUYA）
 金沢大学・がん進展制御研究所・助教
 研究者番号：10523318

研究成果の概要（和文）：本研究では、3-D 培養における上皮組織化や浸潤性獲得の分子基盤を明らかにすることを主たる目的とした。研究全体を通して以下の成果を得た。1) 乳腺上皮細胞の *in vitro* 組織化において4倍体細胞の形成とその後の動態・増殖能を解析し、細胞増殖は核の倍数性に影響されないという結果を得た。2) 腫瘍細胞の3-D 浸潤には細胞膜の MT1-MMP によって活性化される MMP-2 が必要であること、3-D 培養で選択的に起こる MMP-2 の活性化には MT1-MMP の細胞膜局在の増加によって引き起こされることを明らかにした。MMP-2 の発現制御はエピジェネティックに制御されており、その分子機構と標的遺伝子群を明らかにした。3) Met の発現の有無によって、乳腺上皮細胞や悪性黒色腫の分化転換を検出できる示唆を得た。分化転換の動態やその分子機構を明らかにする基盤を得た。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate molecular mechanisms of epithelial cell invasiveness and differentiation underlying epithelial cell morphogenesis. Our results are as follows. 1) Mammary epithelial cell replication is not influenced by polyploidy. 2) Activation of MMP-2 by MT1-MMP is required for 3-D invasiveness. Cell surface localization of MT1-MMP was depend on 3-D. MMP-2 expression was strongly correlated to invasiveness and regulated by epigenetics. We identified epigenetic factors and these target genes possibly involved in cancer malignancy. 3) Cell surface Met was heterogeneously expressed in mammary epithelial cells and malignant melanomas. This might reflect invasive and malignant cell phenotypes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：癌、形態形成、細胞分化

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：浸潤、再生医学、組織幹細胞、がん化、Tetraploid

1. 研究開始当初の背景

3次元構造をもった器官や臓器を培養下で再構築することは再生医療が汎用性の高い医療として定着するための基礎となる。培養細胞を用いるほとんどの研究は、単層培養

系で行われるが、近年、コラーゲンゲルなど細胞外基質中での3次元（3-D）培養下における細胞の分化や動態に関する研究が進み、細胞運動や細胞分化は2次元環境と3次元環境で大きく異なることが明らかになってきた。とりわけ、臓器固有の組織形態と機能

を支える上皮細胞は 3-D での培養、ならびに HGF (hepatocyte growth factor) に代表される間葉由来の形態形成誘導因子との組み合わせによって初めて、生体内の組織に類似する高度に枝分かれした管腔構造を形成する。この過程においては、細胞形質の転換(上皮-間葉転換)や浸潤形質の獲得と終息などが秩序だって制御されていると考えられるが、その分子基盤の詳細は明らかでない。

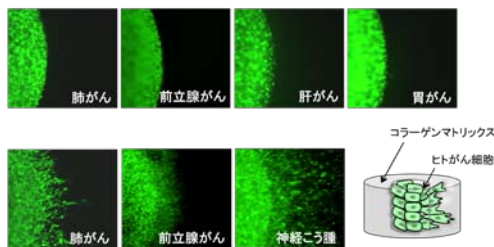
2. 研究の目的

本研究では、3-D 培養における上皮組織化の利点を生かし、一過的・動的な浸潤性形質の獲得とその終息に着目し、このような個々の細胞群を可視化・標識化する手法と分子細胞生物学的手法を用いることで、組織形成の時空間的制御とその分子基盤を明らかにすることを主たる目的とした。これらを理解することは、幹細胞から組織を構築するための基盤となり再生医学などに貢献すると同時に、秩序だった組織の回復・再生の破綻によって生じる慢性疾患や癌などの病態形成の理解につながると考えた。

3. 研究の方法

(1) 浸潤性に関わる因子とその発現制御機構の解明

がん細胞をコラーゲンマトリックス内で 3次元培養すると、明確な浸潤性の違いを呈する。

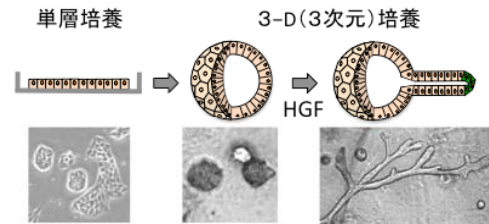


3次元培養における浸潤能の有無と発現が相関する、浸潤に必要である遺伝子の同定を行った。さらにこの遺伝子発現の制御機構について解析を行い、がん細胞の浸潤性に関わる遺伝子発現の制御機構の解明を目指した。

(2) 分化転換の可視化と動態解析、細胞分取と網羅的比較解析による分化転換制御因子群の同定と機能解析

乳腺上皮細胞は 3-D での培養、ならびに HGF との組み合わせによって初めて、生体内の組織に類似する枝分かれした管腔構造

を形成する(下図)。上皮組織化の過程では、細胞の位置情報(先端・分枝部など)に対応した、一過的な上皮→間葉→上皮の分化転換と細胞の移動が起こると考えられる。そこで、分化転換した細胞群をビメンチンプロモーター-GFP レポーター、あるいは HGF の受容体である Met の発現量によって可視化・標識化する方法を検討した。これに基づいて、ヘテロな細胞集団の分化動態の解析や、ヘテロな細胞集団の分取とその細胞間の遺伝子発現の網羅的な解析によって分化転換制御因子群の同定を試みた。



4. 研究成果

(1) 浸潤性に関わる因子とその発現制御機構の解明

3次元培養における浸潤能の有無と発現が相関する、浸潤に必要である遺伝子として MMP-2 を同定した。MMP-2 はコラーゲンマトリックス内での 3次元培養において効率的に活性化されるが、これは MMP-2 を活性化する MT1-MMP の細胞表面への局在がコラーゲン 3次元培養に依存しているためであり、インテグリンやマトリックスの弾力性によらないことを報告した (Sakai K et al., BBRC, 2011)。

さらに MMP-2 の発現制御機構について解析し、MMP-2 の発現はエピジェネティックに制御されていること、特徴的な抑制性のヒストン修飾があることを ChIP 法により検出した (学会発表④)。現在 shRNA によるノックダウンを用いて MMP-2 の発現抑制に関わる因子を特定しており、この因子が MMP-2 以外に様々ながん悪性化に関わる遺伝子発現に関与することをマイクロアレイを用いて網羅的に同定した (学会発表①②)。

今後は、今回明らかにしたエピジェネティックな抑制機構がどのように破綻することが、がんの悪性化に関わっているかを明らかにしたい。

(2) 分化転換の可視化と動態解析、細胞分取と網羅的比較解析による分化転換制御因子群の同定と機能解析

① Met 発現による分化転換の可視化と動態解析

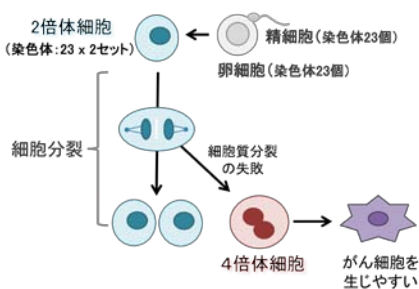
乳腺上皮細胞の間葉系形質への分化転換を可視化するためビメンチン-GFP レポーターをレンチウイルスベクターを用いて乳腺上皮細胞に導入した。しかし期待したように分化転換をモニターできなかった。理由としてはGFPの半減期などの問題が考えられた。

次に細胞表面の Met の発現量をフローサイトメーターで定量し、乳腺上皮細胞の数%の細胞集団のみ Met を発現することが分かった。Met の発現細胞がごく少数でその後の生化学的解析が困難であったため、その他のがん細胞でも検討したところ、悪性黒色腫細胞において Met の発現量がヘテロな集団であることが分かった。Met 発現量に基づいて分取した悪性黒色腫細胞を限界希釈によってクローニングし、その後の Met の発現の動態を解析したところ Met 陰性細胞から Met 陽性細胞が生じることが判明した。

今回の結果から Met の発現の有無によって、乳腺上皮細胞や悪性黒色腫の分化転換を検出できる示唆を得た。今後、分化転換の動態やその分子機構を明らかにするため、現在、Met の発現の有無による細胞形質の違いや遺伝子発現の網羅的な比較を行っている。

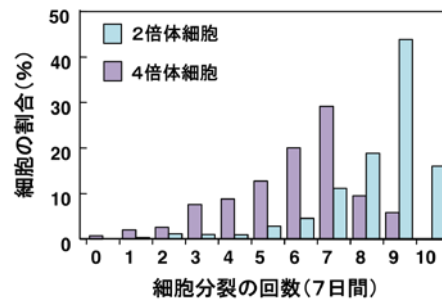
② 乳腺上皮細胞における4倍体細胞の形成とその後の動態・増殖能の解析

乳腺上皮細胞の *in vitro* 組織化において多倍体染色体を有する細胞の多くが間葉・幹細胞で発現されるビメンチン-GFP レポーターを発現していることを観察した。がんの発生過程においては4倍性染色体が異数性に先だって観察され、4倍性染色体の形成がその後の染色体の不均等な分配によって異数性細胞につながる。染色体の異数性と不安定性は、ほとんどのがんの特徴であり、より悪性度の高いがんへの進行の要因になる。このように4倍体細胞の存在はがん化のリスクとなる。従来、細胞周期チェックポイントの働きによって4倍体細胞は増殖を停止すると考えられていた。



そこで乳腺上皮細胞のタイムラプス解析を行うことで、4倍体細胞の形成過程とその後の動態、増殖能を解析した。その結果細胞増殖は核の倍数性に影響されることが分かった。しかし倍数性が増加すると細胞質分裂に失敗や細胞死の確立が高まることが分

かった(学会発表③)。



この結果から、生体内ではがん細胞に特徴的な染色体の異数性や不安定性につながる4倍体細胞の出現そのものを低く抑える仕組みが機能している一方、4倍体細胞がさらなる倍数性細胞(4倍体、8倍体...)のルーツとなり、それにより染色体の異数性や不安定性につながる可能性が考えられる。現在、生体内の乳腺上皮細胞における4倍体細胞の発生率や、4倍体細胞の形成に対する乳腺組織の細胞系譜(乳腺幹細胞、筋上皮細胞、管腔上皮細胞)の影響を解析している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Nakayama M, Sakai K, (他4名). Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine*. 62: 446-452. (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.006.
- ② Michikoshi H, Nakamura T, Sakai K, (他4名). α -Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*. 335(2): 472-478. (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.canlet.2013.03.008.
- ③ Xu Q, Nakayama M, Suzuki Y, Sakai K, Nakamura T, Sakai Y, Matsumoto K. Suppression of acute hepatic injury by a synthetic prostacyclin agonist through hepatocyte growth factor expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 302: 420-429. (2012) 査読有 DOI: 10.1152/ajpgi.00216.2011.
- ④ Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, Imizu T, and Matsumoto K. 3-D collagen-dependent cell surface expression of MT1-MMP and MMP-2 activation regardless of integrin β 1 function and matrix stiffness. *Biochem*

Biophys Res Commun, 412: 98-103. (2011) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.050.

- ⑤ Sakai K., Wang W, Yamada T, Matsumoto K, (他 9 名). Pleural Mesothelioma Instigates Tumor-associated Fibroblasts to Promote Progression via a Malignant Cytokine Network. Am J Pathol. 179: 1483-1493. (2011) 査読有 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.05.060.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Sakai K., Nakamura T, Suzuki Y, Suzuki T, Yano S, Takahashi C, and Matsumoto K. Dysfunction of polycomb group CBX protein is possibly involved in tumor malignancy. 第 3 回新学術領域発がんスパイラル国際シンポジウム&金沢国際がん生物学シンポジウム, 2013 年 1 月 24 日、25 日, 金沢エクセルホテル東急 (石川県)
- ② Sakai K., Matsumoto K. Aberrant Regulation of Epigenetic Silencing in 3-D Tumor Invasion. Japan - Korea Cancer Research Workshop. 2011 年 11 月 30 日、12 月 1 日, Westin Chosun Hotel (Korea)
- ③ 酒井 克也. 松本 邦夫, マウス乳腺上皮細胞における 4 倍体細胞の形成と増殖能の解析, 第 7 1 回 日本癌学会, 2012 年 9 月 21 日, ロイトン札幌 (北海道)
- ④ Sakai K., Yano S, Matsumoto K. Epigenetic dysregulation of MMP-2 expression confers mesothelioma cell invasion. 日本分子生物学会第 1 1 回春季シンポジウム&金沢国際がん生物学会シンポジウム, 2011 年 5 月 25 日、26 日, 石川県立音楽堂 (石川県)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Sakai K., Nakamura T, Kinoshita T, Nakamura T, Matsumoto K. HGF-Antagonists: Structure, Activities, and Anti-cancer Approach. Current Signal Transduction Therapy 6: 191-199. (2011) 査読有 DOI:<http://dx.doi.org/10.2174/157436211795659964>

[図書] (計 1 件)

- ① Sakai K., Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K. Significance, Mechanisms, and Progress of Anticancer Drugs Targeting HGF-Met. InTech (2011) 査読有 <http://www.intechopen.com/books/adva>

nces-in-cancer-therapy/significance-mechanisms-and-progress-of-anticancer-drugs-targeting-hgf-met

[その他]

ホームページ等

http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/shu_youdoutaiseigy/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 克也 (SAKAI KATSUYA)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 10523318

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし