

## デス小胞のコントロールする癌 — 間質細胞応答\*

伊藤 剛, 田中 正光

秋田大学大学院医学系研究科 分子生化学講座

(平成 30 年 4 月 25 日掲載決定)

### Cancer-stromal cells response controlled by death vesicles

Go Itoh and Masamitsu Tanaka

*Department of Molecular Medicine and Biochemistry, Akita University Graduate School of Medicine*

**Key words :** CAF, Cancer invasion, Apoptosis, Extracellular vesicles

#### 本研究の概略

播種型と圧排性増殖型の癌浸潤の選択に関わる新規浸潤システムについて紹介する。

まず、癌関連線維芽細胞 (CAF) による癌細胞のアポトーシス誘導を見つけた。CAF と接触した癌細胞はデス小胞 (Apo-EVs) を放出し、これに刺激された CAF は運動性を向上させた。小胞刺激後の CAF は組織深部へと浸潤し、引き続き癌細胞を牽引することで広範囲の播種型癌浸潤の原因となった。一転して、癌アポトーシスを抑制すると CAF の浸潤は減衰し、癌細胞は圧排性増殖型の組織浅部での浸潤を増加させた。

#### はじめに

癌が原発巣から転移して体内で拡散した場合、予後が悪くなる。一方、癌が転移せずに局所で増殖する場合は切除治療が可能であり、比較的予後が良くなることが知られている。前者の癌は一般に播種型、後者は圧排性増殖型の癌浸潤を原因としている (図 1)。

これら 2 つの癌浸潤モードの選択メカニズムはこれまでに明らかとされていない。

近年、播種型の癌浸潤メカニズムとして、癌細胞と間質細胞からなるヘテロな細胞集団における浸潤が注目されている。多くの癌細胞株は近接する間質層の線維芽細胞に作用し、癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblast : CAF) へと変貌させる<sup>1)</sup>。これまでに CAF 集団は癌細胞に先立って組織深部へと浸潤し、より広域へと癌細胞集団の浸潤を誘導する働きがあることが報告されている。また、癌細胞と CAF との相互作用は癌の増殖や転移に適した癌微小環境の整備にも関与することがわかっている<sup>2)</sup>。癌微小環境の構築は細胞集団間におけるさまざまなサイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリックス、細胞外小胞の産生および応答により促進することが報告されている<sup>3)</sup>。このように、癌悪性化は間質層の CAF によって飛躍的に

ヒト胃癌の組織切片

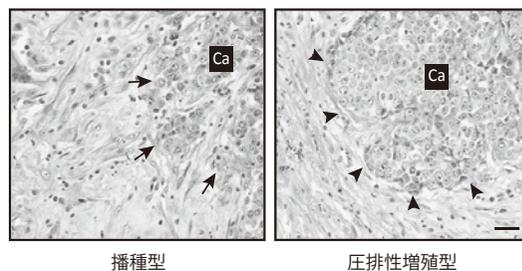


図 1. 矢印は癌細胞集団の播種型浸潤、矢尻は癌細胞集団の圧排性増殖型浸潤。Ca: 癌細胞集団領域。(文献 4 より引用、一部改変)

Correspondence : Go Itoh  
Department of Molecular Medicine and Biochemistry,  
Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1  
Hondo, Akita 010-8543, Japan  
TEL : 81-18-884-6078  
FAX : 81-18-884-6078  
E-mail : goitoh@med.akita-u.ac.jp  
\*平成 30 年 2 月 21 日秋田医学会学術奨励賞記念講演

(8)

デス小胞のコントロールする癌 — 間質細胞応答

亢進することが明らかとなってきた。

著者らは、これまでに癌細胞と間質細胞の細胞間応答について調べてきた。最近、播種型と圧排性増殖型の癌浸潤モード（図2）の選択につながる新規の浸潤システムを報告している<sup>4)</sup>。まず、CAFによるスキルス胃癌細胞のアポトーシス誘導を見つけた。CAFと直接接触した癌細胞は大型の細胞外小胞（Apo-EVs）を放出し、これに刺激されたCAFは運動性を向上させることを示した。一方、アポトーシス阻害剤 ZVAD の添加により癌アポトーシスを抑制した場合には、

MyrPalm-EGFP-44As3 と Dil-CAF の共培養（Invasion assay）

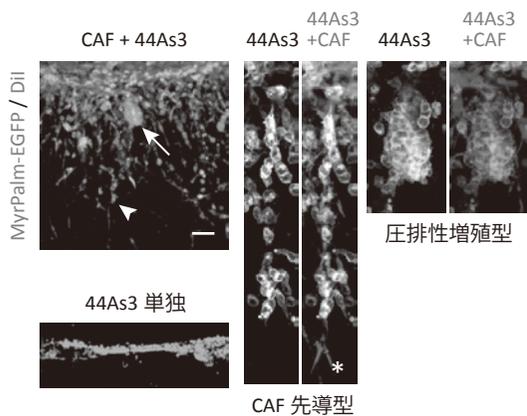


図2. 3Dゲル浸潤アッセイを用いた癌細胞とCAFの浸潤の観察。矢尻はCAF先導型の癌浸潤、矢印は圧排性増殖型の癌浸潤を示す。アスタリスクは浸潤するCAFの先導端。（文献4より引用、一部改変）

CAFの活性化は認められなかった。

この癌細胞死は癌浸潤の様相を大きく変える原因となった。胃癌細胞とCAFをゲル上で共培養した場合（3Dゲル浸潤アッセイ）、Apo-EVsに刺激されたCAFはゲル深部へと浸潤し、引き続き癌細胞を牽引することで広範囲の播種型癌浸潤となった。一転して、ZVADの添加により癌アポトーシスを抑制するとCAFの浸潤は減衰し、癌細胞は圧排性増殖型様のゲル浅部での浸潤を増加させることがわかった。さらに、これら癌アポトーシスに基づく癌浸潤システムはマウス個体の腫瘍形成についても反映されることを示した。近年、癌細胞のアポトーシスは腫瘍関連マクロファージへと作用することで最終的に癌増殖を亢進する働きがあることが報告されている<sup>5)</sup>。著者らが報告した新規の癌浸潤システムに加えて、癌アポトーシスは癌悪性化につながる未知のメカニズムを促進する可能性があるかもしれない（図3）。

### 1. CAFは胃癌細胞のアポトーシスを誘導する

著者らはCAFと44As3スキルス胃癌細胞をシャーレ上で共培養した際、癌細胞がアポトーシス様の形態で死ぬことを見いだした（図4）。一方、CAFにおける死細胞はほとんど観察されなかった。共培養後に癌細胞の核を調べると、アポトーシスの特徴である核の凝集や断片化が25%の44As3細胞で認められた。癌アポトーシス誘導の条件を検討した結果、CAFと44As3細胞が直接的に接触することが重要であった。

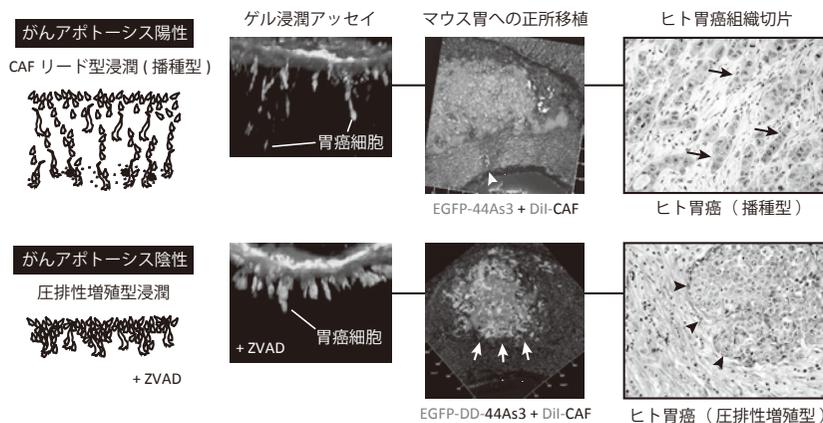


図3. 癌アポトーシスを原因とする癌浸潤モードの概要。白矢尻はCAF先導端、白矢印は筋層境界、黒矢印は播種型浸潤をおこなう癌細胞、黒矢印は圧排性増殖型の癌浸潤を示す。（文献4より引用、一部改変）

44As3 スキルス胃癌細胞と CAF の共培養

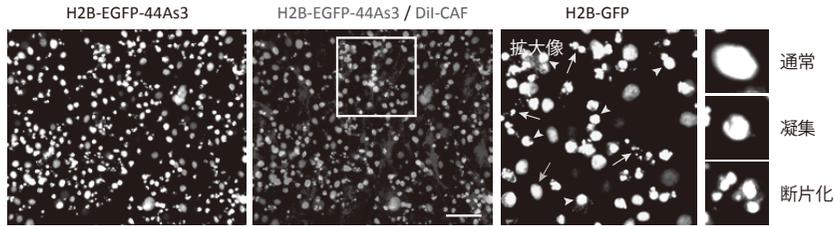


図4. 44As3 スキルス胃癌細胞における細胞死. 白矢印は核の断片化, 白矢尻は DNA の凝集, 矢印 (灰色) は通常の核を示している. (文献4より引用, 一部改変)

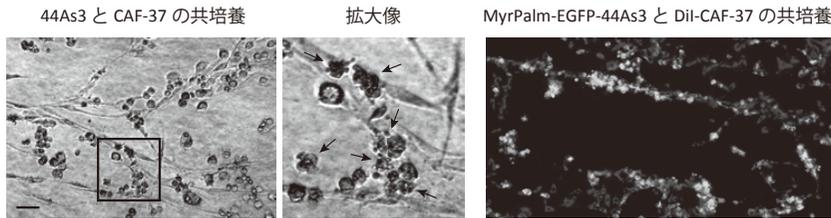


図5. 左は明視野顕微鏡像, 右は蛍光顕微鏡像. 矢印は癌死細胞を示している. 癌細胞と CAF の分布は異なることが多い. (文献4より引用, 一部改変)

興味深いことに, 共培養後の両細胞間において頻繁な接触が観察され, やがて多くの癌細胞は CAF の細胞体へと接着していった. アポトーシス 44As3 細胞は CAF の表面上に付着していた (図5). 一方, CAF の培養上清を回収し, この上清により 44As3 細胞を培養した場合にはアポトーシスは低頻度であったことより, 両細胞間の接触が癌アポトーシスの誘導にとって重要であることが考えられた.

## 2. CAF 誘導性の癌アポトーシスに関連する因子

44As3 細胞のアポトーシスについて免疫染色法により検討した結果, TUNEL 陽性であり, 活性型のカスパーゼ3と8に対しても陽性であることがわかった (図6). また, CAF と 44As3 細胞の共培養時に全カスパーゼ阻害剤 ZVAD を添加した場合は, CAF 誘導性の癌アポトーシスは抑制され, cleaved caspase-3 (活性型カスパーゼ3) の減衰が認められた (図7). CAF と胃癌細胞株でのアポトーシス関連分子の発現を調べた結果, 胃癌細胞においてデス受容体 DR4 (death receptor-4), DR4 と物理的に関連するアダプター受容体 FADD およびカスパーゼ8が高発現していることがわかった (図8). これらは CAF では低発

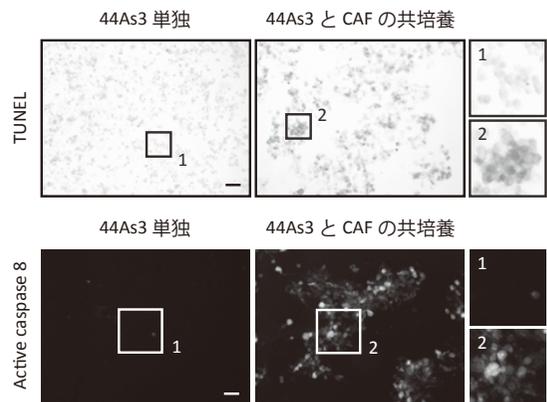


図6. 44As3 細胞単独, もしくは CAF とシャーレ上で共培養した場合での細胞死の検出. (文献4より引用, 一部改変)

現であった. 同様な発現パターンはマウスを用いた組織免疫染色法により *in vivo* でも確認された. 著者らは, DR4 発現を siRNA によりノックダウンした 44As3 細胞では, CAF との共培養後の癌アポトーシスを部分的に抑制できることを見つけた. また, DR4 低発現である HSC-59 胃癌細胞では CAF 誘導性のアポトーシスを受けないことがわかった. これらの結果より,

(10)

デス小胞のコントロールする癌 — 間質細胞応答

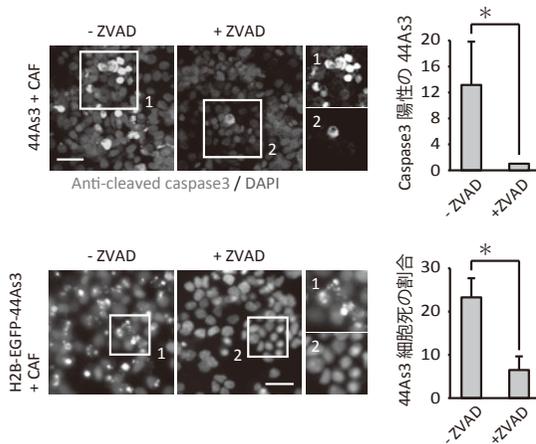


図7. 上図: アポトーシス阻害剤 ZVAD 添加 (有・無) での活性型 caspase3 の検出. 下図: ZVAD 添加の有無での 44As3 細胞の核および細胞死の割合. (文献 4 より引用, 一部改変)

DR4 の媒介するアポトーシス経路と癌細胞死が関連することが考えられた.

### 3. 癌アポトーシスは癌浸潤モードを転換させる

著者らは, CAF 誘導性の癌アポトーシスと癌浸潤との関連を検討するため, MyrPalm-EGFP (細胞膜に局在) を発現させた 44As3 細胞と DiI により染色 (主に細胞膜に分布) した CAF を細胞外マトリックス含有ゲル上で一週間ほど共培養し, 両細胞における浸潤過程を詳細に解析した (3D ゲル浸潤アッセイ, 図 9). 結果, 2 種の癌浸潤モードをこのアッセイにより見

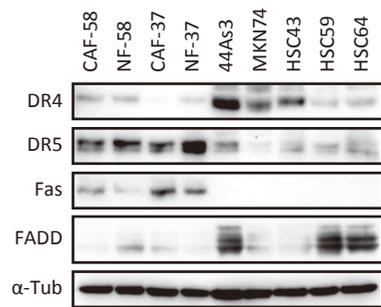


図8. 間質細胞株と癌細胞株におけるアポトーシス関連因子の発現比較. (文献 4 より引用, 一部改変)

だした. 1 つは, CAF 集団が癌細胞集団に先立ってゲル深部へと浸潤していき, 癌細胞が CAF を追従してより深部・広域へと進行していく CAF リード型である癌浸潤モード (播種型に相当する), もう 1 つは 44As3 集団細胞が楕円状の細胞塊を形成し, ゲルの比較的浅部にて進行する圧排性増殖型に近い浸潤モードであった. 癌浸潤は癌集団単独もしくは正常線維芽細胞との共培養ではほとんど認められないため, これらの浸潤モードは CAF 誘導性のメカニズムで進行することが考えられた. 次に, 3D ゲル浸潤アッセイを用いて浸潤過程の 44As3 細胞のアポトーシスを追跡した. ヒストン H2B-EGFP を発現させた 44As3 細胞における核を観察した結果, 核の凝縮または断片化は CAF 密度の高い領域において生じることが明らかとなった. 一方, この癌アポトーシスは ZVAD 添加によって抑制されることがわかった. さらに, ZVAD 処理後の CAF と 44As3 細胞の浸潤を観察すると, CAF 集団

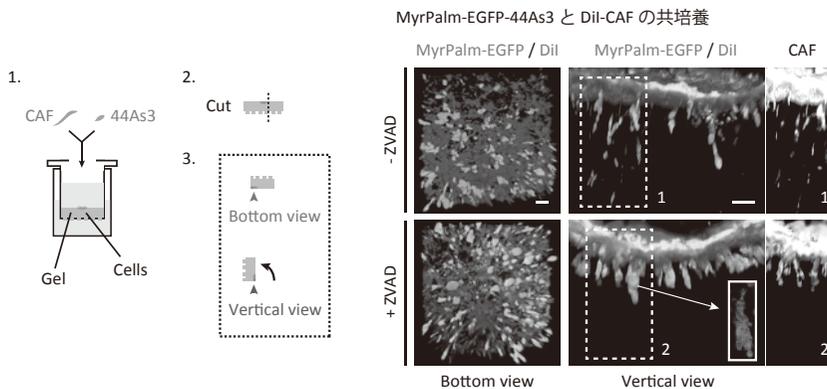


図9. 左: 3D ゲル浸潤アッセイによる浸潤観察の方法. 右: 同アッセイにより, 44As3 細胞と CAF をゲル上にて共培養し, 浸潤を観察. 癌浸潤モードは ZVAD 添加の有無により変わる. (文献 4 より引用, 一部改変)

のゲル内への浸潤距離が有意に短くなり、CAF リード型の特徴であるゲル深部への癌浸潤は減少することがわかった。代わりに圧排性の癌浸潤モードが広範な領域を占める様子が認められた。以上より、CAF 誘導性の癌細胞アポトーシスはCAFの浸潤を介して癌浸潤モードを転換させる鍵となる可能性が考えられた。

#### 4. 癌死細胞由来の細胞外小胞はCAFの浸潤を促進する

CAFの浸潤距離は癌アポトーシスの影響を受けたことから、癌死細胞の産生する細胞外小胞 (EVs) によるCAF浸潤性亢進の可能性を検証していった。著者らは、ZVAD添加の有無 (CAF誘導性の癌アポトーシス有り無し) での条件下におけるEVsの性質およびCAF活性化への影響を調べた。EVsはEVマーカーであるCD63-EGFPを発現させた44As3細胞とCAFをシャーレ上で共培養した培地から超遠心分離により収集した。EVs量を比較するために、ウェスタンブロットや共焦点レーザー顕微鏡画像によりCD63-EGFP量を検討した結果、ZVAD処理により癌アポトーシスを抑制した場合でのEVs総量は減少することがわかった。また、電子顕微鏡画像により各条件下で産生される癌EVs口径を比較すると、アポトーシス細胞では小型なEVであるエクソソーム・マイクロベシクルとともに比較的大型であるEV (Apo-EV) 産生 (>200 nm) が多く存在することが明らかとなった (図10)。CAFは本質的に高度な浸潤性を備えているが、3Dゲル浸潤アッセイを用いてEVs反応後のCAFはその浸潤性を促進できることがわかった。一方、ZVAD処理後に収集したEVsではCAF浸潤に影響を与えないこ

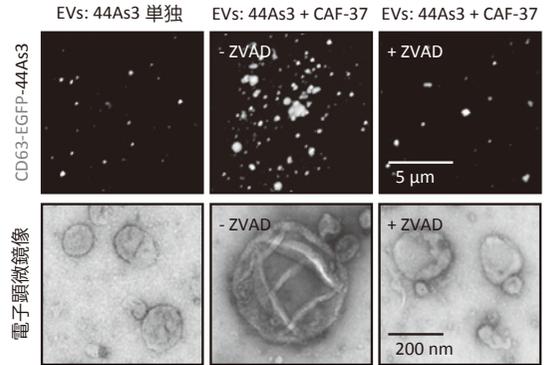


図10. 細胞外小胞の可視化。上: CD63-EGFPシグナルによる小胞量の比較。下: 電子顕微鏡観察による小胞の比較 (文献4より引用, 一部改変)

とが明らかとなった。また、著者らは、超遠心分離機を用いてEVsを分画・収集し、Apo-EVとエクソソームを得た。Apo-EV分画により刺激された線維芽細胞は浸潤性を亢進させることがわかった (図11)。これらの結果より、癌死細胞の放出する特異的なEVはCAFを刺激し、その運動性を亢進させることでCAFリード型の癌浸潤を促進できることが示唆された。

#### 5. デスドメイン (DD) 発現はCAF誘導の癌アポトーシスを抑制する

著者らはCAF誘導性で生じる癌アポトーシスを恒常的に抑制できる条件を検討していった。癌アポトーシスはDR4-カスパーゼ8シグナル伝達と関連することが示唆されたため、アポトーシス誘導はDRおよびプロカスパーゼ8、FADDで形成されるデス複合体を介して進行する可能性を考えた<sup>6)</sup>。これまでに、

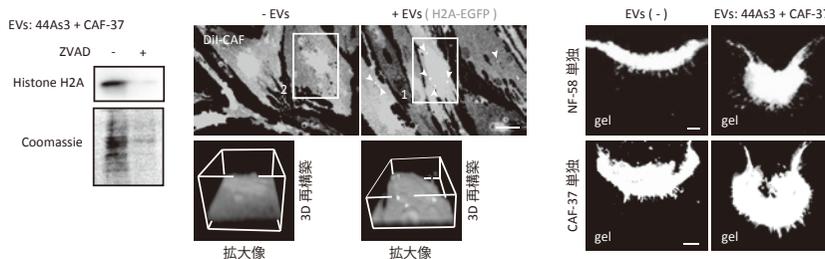


図11. 左: 細胞上清のウェスタンブロット。中央: H2A-EGFP-44As3細胞由来の細胞外小胞をCAFへと添加。右: 細胞外小胞 (有・無) の条件下、間質細胞の浸潤を3Dゲル浸潤アッセイにより評価した。(文献4より引用, 一部改変)

FADD の death domain (以下 DD) フラグメントはデス複合体形成を妨害するドミナントネガティブとしての作用が報告されている<sup>7)</sup>。そこで、本研究において EGFP-DD を 44As3 細胞に発現させ (EGFP-DD-44As3 細胞)、マウス個体での腫瘍部に含まれる EGFP-DD-44As3 のアポトーシス抑制効果について検討していった (図 12)。CAF および EGFP-44As3 または EGFP-DD-44As3 細胞をヌードマウスに皮下移植した後、TUNEL アッセイにより腫瘍部の癌アポトーシスについて調べた。EGFP-DD-44As3 細胞での TUNEL 陽性の割合は EGFP-44As3 細胞 (コントロール実験) を移植した場合よりも有意に低くなったため、EGFP-DD-44As3 細胞は CAF 誘導性の癌アポトーシスを抑制できる癌細胞株であることがわかった。また、CAF と EGFP-DD-44As3 細胞をシャーレ上で共培養した場合でも癌アポトーシスは抑制されたことも、これらの結果を支持していた。

## 6. 癌アポトーシスと腫瘍悪性化の関連が認められた

著者らは、CAF と EGFP-DD-44As3 細胞がゲル浸潤アッセイのためにゲル上にて共培養された場合、CAF リード型の癌浸潤が著しく抑制され、ZVAD 添加時に観察された圧排性増殖型と類似した癌浸潤が増加することを明らかにした (図 12)。次に、生体における CAF 誘導性の癌アポトーシスと癌浸潤の関連を調べるため、CAF とともに EGFP-44As3 (コントロール) もしくは EGFP-DD-44As3 細胞をヌードマウスの胃壁に局所移植した (図 13)。粘膜下層に分布した 44As3 細胞と CAF の浸潤過程を追跡した結果、EGFP-44As3 細胞と CAF (コントロール実験) 移植 5 日後に、CAF が癌浸潤に先立って筋肉層 (図 13: MP) に侵入していく CAF リード型の癌浸潤が認められた。一方、EGFP-DD-44As3 細胞と CAF を移植した場合は、両方の細胞は筋層の表面領域のみに存在し、筋層内への浸潤は確認できなかった。EGFP-DD-

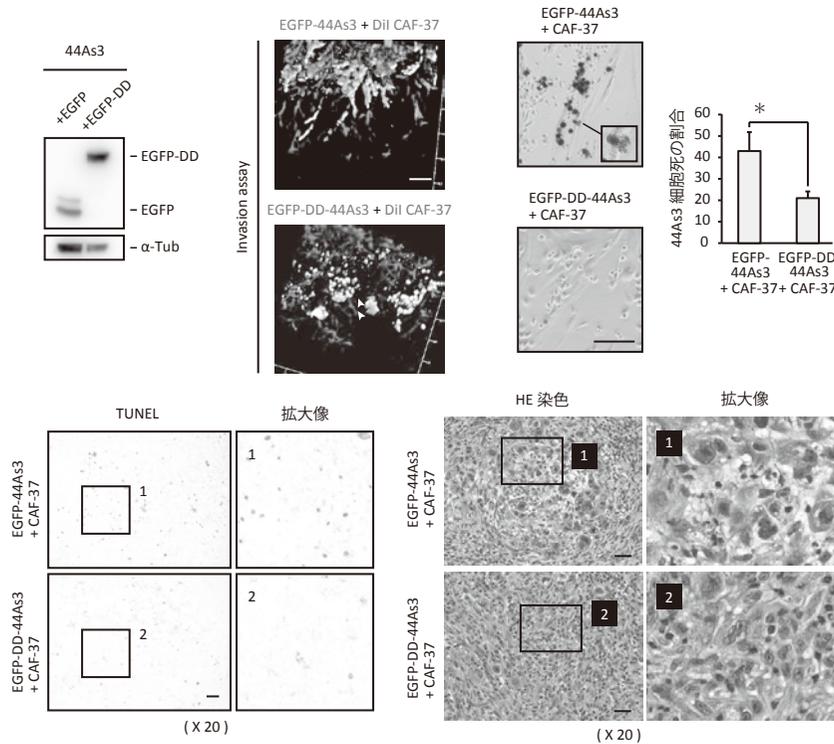


図 12. 上図: DD-EGFP-44As3 細胞の癌浸潤と細胞死の評価。下図: DD-EGFP-44As3 細胞のマウス皮下移植後の細胞死を評価。(文献 4 より引用、一部改変)

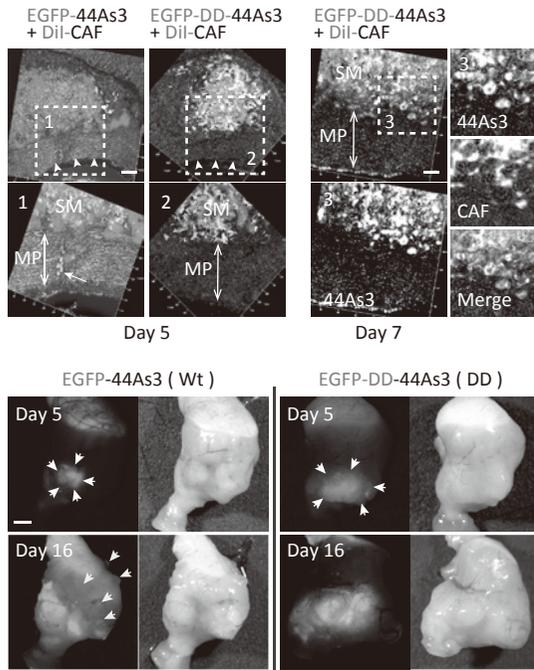


図 13. 上図: CAF と混合したコントロール EGFP-もしくは DD-EGFP-44As3 細胞を胃壁へと局所移植後、癌浸潤を比較した。下図: 移植後、5 日・16 日経過後の癌浸潤を評価。(文献 4 より引用、一部改変)

44As3 細胞はこの領域で増殖し、圧排性増殖型様の癌浸潤が認められた。移植 16 日後、EGFP-44As3 細胞により形成される腫瘍は不定形となり小さな結節の播種が確認された (図 13: Day16 矢印)。一方、EGFP-DD-44As3 細胞の形成する腫瘍では胃壁における圧排性増殖型の癌浸潤に収まった。さらに、腫瘍領域に対して癌マーカーである Cytokeratin19 とリンパ管内皮マーカー D2-40 により組織免疫染色を行った結果、EGFP-44As3 細胞のリンパ節転移が認められたが、EGFP-DD-44As3 細胞の移植では観察されなかった

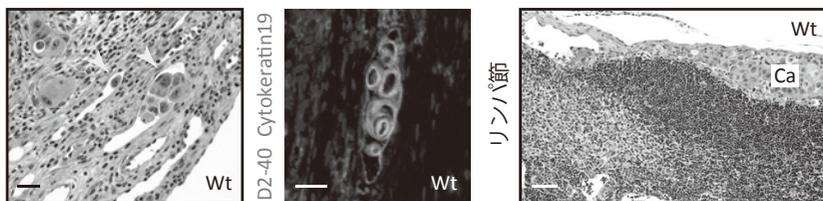


図 14. 胃壁への局所移植後の EGFP-および DD-EGFP-44As3 細胞のリンパ節転移を評価した。(文献 4 より引用、一部改変)

(図 14)。これらの結果から、CAF 誘導性の癌アポトーシスは生存した癌細胞における広域への癌浸潤 (CAF リード型) を可能とさせ、組織深部や他臓器への癌の播種・転移を導くことが示唆された。

## 7. さいごに

NF と CAF は一定の割合で癌アポトーシスを誘導できるメカニズムを備えていることがわかった。NF では浸潤能に乏しく癌浸潤を促進しないため、癌アポトーシス誘導は癌に対して抑制的に働くことが考えられた。ところが、CAF は癌アポトーシス時に産生される Apo-EV (細胞外小胞) によって浸潤能を充進させ、癌集団をより広域へと拡大させる浸潤モードへと転換することで癌の進展をむしろ促すことが示唆された (図 15)。

CAF と癌細胞はさまざまなサイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリックス、細胞外小胞の分泌により互いを制御している。エクソソームは細胞より細胞外へと分泌される 30~100 nm の細胞外小胞であり、シグナルペプチド、microRNA (miRNA)、脂質、DNA などの多様な生物活性因子を含むため、多岐にわたる癌シグナル伝達に関与することがわかってきた。エクソソーム miRNA の運搬は安定であり、隣接のみならず遠隔の細胞でも取り込まれ、特定の遺伝子発現を調節することが可能である。これにより癌増殖、浸潤、癌幹細胞増殖などの腫瘍進展にとって有利な癌微小環境を広域とする効果が考えられている。エクソソーム miRNA は CAF、NF、および癌細胞の細胞間クロストークに働くことが報告されている。たとえば、乳癌細胞はエクソソームにより miR-9 を NF へと運搬することで、CAF 様の表現型を引き起こす。miR-9 は NF から放出され、腫瘍細胞へと運ばれて細胞移動を促進することが可能であった<sup>8)</sup>。また、miR-409 の過剰発現でも NF の CAF 様表現型の誘導は認められ、この NF

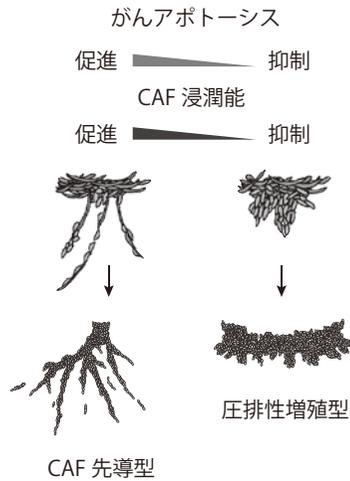


図 15. 癌アポトーシスと CAF 運動能の相関に基づく癌浸潤モード変換モデル。(文献 4 より引用, 一部改変)

から分泌されるエクソソーム miR-409 は腫瘍の誘導および前立腺癌細胞の EMT (上皮間葉転換: 上皮細胞としての特性を失い周辺組織に移動しやすい間葉系細胞としての特徴を獲得する現象) を促進することが報告されている<sup>9)</sup>。このように, 細胞外小胞は間質細胞と癌細胞の相互作用にとって重要であり, 著者らは現在, 癌死細胞の Apo-EV に含まれる CAF 浸潤を活性化する因子に注目し, その同定や解析を進めている。

癌細胞によって刺激された間質細胞は, 癌微小環境を充進することで癌悪性化を促進させる働きを持つが, 一方では癌に対して抑制的である相反する影響を担っていることが報告されている。本研究において, NF も CAF も一定の割合で癌アポトーシスを誘導できるメカニズムを備えていることがわかった。これまでに, ヒト間葉系幹細胞 (mesenchymal stem/stromal cells: hMSC) はサイトカイン TNF- $\alpha$  により活性化した場合, 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) の発現を上昇させ, *in vitro* および *in vivo* において TRAIL 感受性を有する MDA (MDA-MB-231) 乳癌細胞のアポトーシスを引き起こすことが報告されている<sup>10)</sup>。著者らは, CAF 誘導性である癌アポトーシスの分子メカニズムについても検討しており, 将来的に CAF の浸潤を減衰させ, 癌アポトーシス誘導に働く一面のみを促進させることが可能となれば, NF と同様な癌抑制的な効果が期待できるかもしれない。

## 謝 辞

本研究は本学分子生化学講座: 栗山正准教授, 相場なみ子助教ならびに分子医学部門機能情報系: 千田進介技術長, のご助言とご協力により論文報告に至りました。皆様に心よりの感謝を申し上げます。

## 引用文献

- 1) Hwang, R.F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K.D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D.B. and Logsdon, C.D. (2008) Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.*, **68**, 918-926.
- 2) Hsu, H.S., Lin, J.H., Hsu, T.W., Su, K., Wang, C.W., Yang, K.Y., Chiou, S.H. and Hung, S.C. (2012) Mesenchymal stem cells enhance lung cancer initiation through activation of IL-6/JAK2/STAT3 pathway. *Lung Cancer*, **75**, 167-177.
- 3) Yang, F., Ning, Z., Ma, L., Liu, W., Shao, C., Shu, Y. and Shen, H. (2017) Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Molecular Cancer*, **16**, 148.
- 4) Itoh, G., Chida, S., Yanagihara, K., Yashiro, M., Aiba, N. and Tanaka, M. (2017) Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours. *Oncogene*, **36**, 4434-4444.
- 5) Lauber, K. and Herrmann, M. (2015) Tumor biology: with a little help from my dying friends. *Curr. Biol.*, **25**, 198-201.
- 6) Lo, Y.C., Lin, S.C., Yang, C.Y. and Tung., J.Y. (2015) Tandem DEDs and CARDs suggest novel mechanisms of signaling complex assembly. *Apoptosis*, **20**, 124-135.
- 7) Sakamaki, K., Takagi, C., Kominami, K., Sakata, S., Yaoita, Y., Kubota, H.Y., Nozaki, M., Yonehara, S. and Ueno, N. (2004) The adaptor molecule FADD from *Xenopus laevis* demonstrates evolutionary conservation of its pro-apoptotic activity. *Genes Cells*, **9**, 1249-1264.
- 8) Baroni, S., Romero-Cordoba, S., Plantamura, I., et al. (2016) Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell Death Dis.*, **7**, e2312.
- 9) Jossion, S., Gururajan, M., Sung, S.Y., et al. (2015) Stromal fibroblast-derived miR-409 promotes epi-

- thelial-to-mesenchymal transition and prostate tumorigenesis. *Oncogene.*, **34**, 2690-2699.
- 10) Yoon, N., Park, M.S., Shigemoto, T., Peltier, G. and Lee, R.H. (2016) Activated human mesenchymal stem/stromal cells suppress metastatic features of MDA-MB-231 cells by secreting IFN- $\beta$ . *Cell Death Dis.*, **7**, e2191.