

2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	Ex vivo 筋層培養系の確立による大腸癌浸潤メカニズム解析
キーワード	①大腸癌、②浸潤、③ex vivo 培養

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ホシ ダイスケ 星 大輔
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	金沢医科大学 医学部 病理学I 助教
現在の所属先・職位等	金沢医科大学 医学部 病理学I 助教
プロフィール	2015年信州大学医学部医学科卒業。2017年に東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻博士課程に入学、オルガノイド培養を用いたがん研究に従事し、2021年博士（医学）取得。2021年より金沢医科大学医学部病理学I助教。臨床の病理診断に従事しつつ、がん研究、特に浸潤の研究を行っている。

1. 研究の概要

大腸癌は2019年がん罹患数で第1位、2020年がん死亡数統計で第2位を占め、罹患数も増加傾向にある重要な疾患である。がんの基本的な性質の一つに浸潤がある。浸潤によって臓器の機能が障害され、大腸では腸閉塞や大腸穿孔を生じる。また、血管等に浸潤することで遠隔臓器に癌が移動し、転移巣を形成する。転移は大腸癌による死亡の主因である。このように浸潤は重要な現象であるが、生体内でどのようなメカニズムによって生じるかは未解明の部分が多い。一方で、生体内をそのまま観察することは技術的な課題が多い。そのため、本研究では生体内環境をそのまま外部に取り出すex vivo培養によって、生体内の浸潤メカニズムを解析し、治療に繋がる新規の知見を得る事を目指した。

2. 研究の動機、目的

大腸を含め消化管は層構造を有し、癌の浸潤がどの層まで達するかは予後決定因子の一つである。浸潤の発生メカニズムとして、上皮間葉転換(EMT)によって癌細胞が接着因子等の上皮形質を失い、移動能の高い間葉形質を得ることで生じるという説が有力である。実際、細胞接着因子E-cadherinの欠損が浸潤を増加させることが報告されている(Padmanaban, Nature, 2019)。EMTを誘導する因子には、ZEB1、Twist1/2等の転写因子が同定してきた。ヒト大腸癌の浸潤端では簇出(腫瘍細胞4個以下)や低分化胞巣(同5個以上)と呼ばれる個在性胞巣が知られ、予後へも影響する。これらの胞巣は浸潤を担うとされ、EMTが生じているはずである。しかし、これら胞巣にEMT誘導因子の発現を証明した報告は無い。また、

我々は浸潤端での癌細胞の p16 発現と、p16 高発現かつ p21 低発現で予後不良なことを見出したが（図 1、Kin* and Hoshi* (*co-first authors) et al, Pathol Int, 2022）、in vitro の解析では p16 発現と EMT 形質は相反するとされる（AL-Khalaf et al, Mol Carcinog, 2016; LaPak et al, Mol Cancer Res, 2014）。これらのこととは、浸潤端で EMT が生じていない可能性を示唆する。定説と矛盾するこの知見に対し、原因を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の結果

生体内の浸潤を再現した実験系の構築および p16 と細胞骨格関連タンパク質の活性の関連を解析した。

①Ex vivo 実験系の構築

本研究によって ex vivo 筋層培養系を構築し、癌細胞の添加による浸潤の観察を試みた。ホルマリン固定、パラフィン包埋後の組織切片を作成し、筋束間へ大腸癌細胞が浸潤することを確認した。また、固定後の蛍光顕微鏡においても観察可能である事を実証した（図 2）。

②p16 と Rac1/Cdc42 活性の検討

浸潤における p16 の影響を検討するため、細胞のアクチン骨格を制御する Rac1 および Cdc42 の Förster resonance energy transfer (FRET) バイオセンサーを利用した。HeLa 細胞でそれぞれのバイオセンサーを安定的に高発現する細胞を樹立し、そこに p16 を過剰発現させると、いずれのタンパク質の活性も有意に低下した（図 3）。Rac1, Cdc42 の活性化はいずれもアクチン再構成を誘導し、細胞突起を伸長させて EMT 形質に寄与すると考えられており、上述の in vitro の報告と整合している。

4. 研究者としてのこれからへの展望

Ex vivo 実験系を構築できたが、観察の効率に課題が残っている。そのため、今後は他の細胞株の利用や培養条件の改善を検討し、より効率的に浸潤を観察する。また、ex vivo 実験系に in vitro で行った操作を適用し、ex vivo と in vitro の差異を見る。In vitro の実験は簡便で数多くの知見が蓄積されているものの、本来の目標である生体内の結果と必ずしも一致しない。ヒト生体の細胞を常に観察する病理診断医は、ある意味で生体内の正解を知っている存在であり、臨床の知見を基礎に活かせると考えている。この立場をうまく活用し、研究に邁進していきたい。

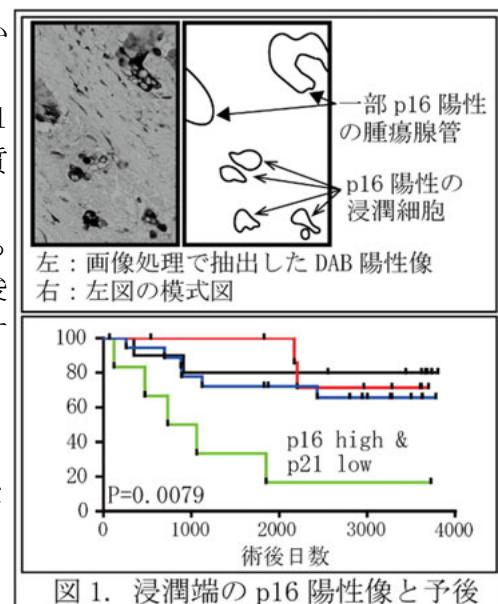


図 1. 浸潤端の p16 陽性像と予後

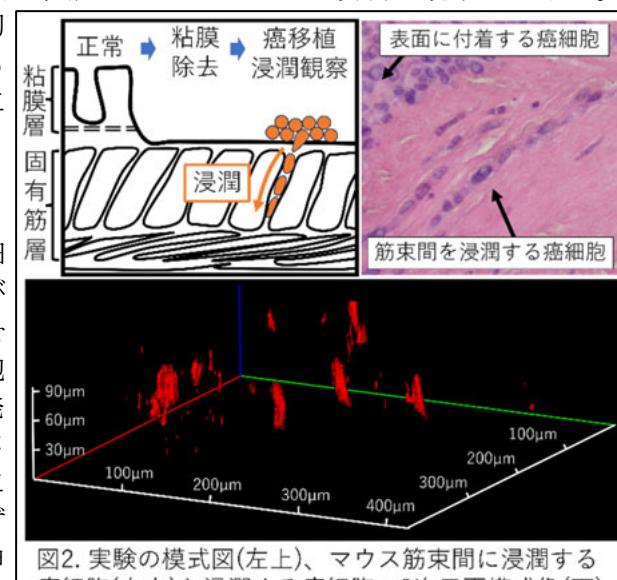


図 2. 実験の模式図(左上)、マウス筋束間に浸潤する癌細胞(右上)と浸潤する癌細胞の3次元再構成像(下)

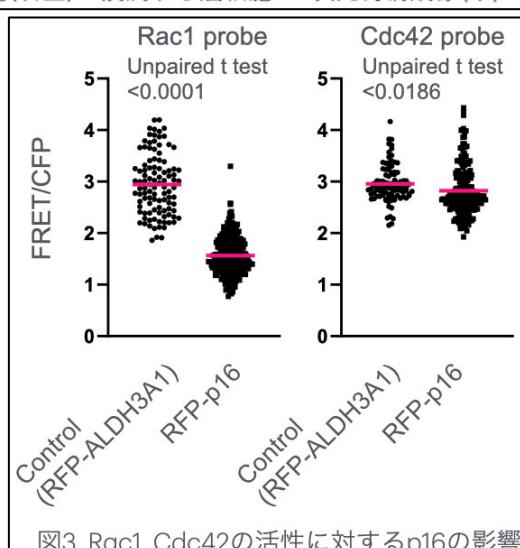


図 3. Rac1, Cdc42 の活性に対する p16 の影響

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、若手研究者奨励金を授与して頂き、誠にありがとうございました。ご支援によって、癌浸潤研究のための新規の実験系を立ち上げることができました。やるべき事は山積していますが、まずは貴重な一歩を踏み出せたと考えております。がん患者を死に至らしめる浸潤を理解し、制御する手法を編み出せるよう、今後とも精進して参ります。