

## 研究題目 がんの共食い現象の分子基盤の確立とその意義の解明

### 研究組織

研究代表者：常松 貴明（徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子病態学分野）  
 共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）  
 研究分担者：石丸 直澄（徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子病態学分野）  
 新垣 理恵子（徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子病態学分野）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

がん組織中では Cell-in-cell appearance と呼ばれるプロフェッショナルな貪食細胞ではないがん細胞自身によるがん細胞の貪食像がみられるものの、その生物学的意義はほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、培養細胞株を用いた貪食実験系にプロテオーム解析を応用することで、共食したがん細胞特異的に発現するタンパク質を網羅的に探索し、その分子基盤と生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

死細胞は主にマクロファージや樹状などのプロフェッショナルな貪食細胞によって貪食され、除去されることが古くから知られている。一方、がんにおいては Cell-in-cell appearance と呼ばれるプロフェッショナルな貪食細胞ではないがん細胞自身によるがん細胞の貪食像がみられ、高悪性度の腫瘍ほど多く出現することが報告されているものの (*Nat Review Cancer*, 2018, 図 1 参照)、その生物学的意義はほとんど明らかとなっていなかった。最近、乳癌細胞を用いた

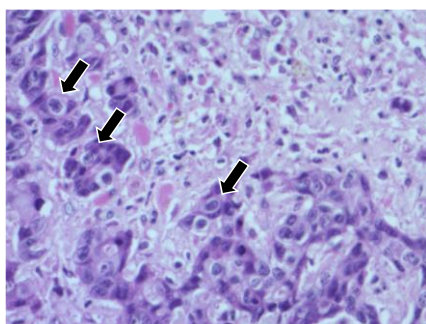


図1: 頭頸部癌症例でのがんの共食い現象( Cell-in-cell appearance) が観察される (図矢印)

研究で貪食した腫瘍細胞は生存能を獲得し、化学療法に対する治療抵抗性

に寄与する可能性が示された (*J Cell Biol*, 2019)。従って、化学療法抵抗性を示す悪性腫瘍の新たな治療ターゲットとしてのポテンシャルを有していると考えられるが、その分子機構は不明な点が多い。

#### [1-2]研究の方法・経過

前述のように、“がん細胞の共食い”の分子機構はほとんど明らかにされていないため、特異的な阻害薬が存在せず、アクチンの重合阻害薬である Cytochalasin D が貪食を阻害することができるものの (図 2 参照)、細胞の遊走や浸潤も阻害してしまうため、共食い現象自体の生物学的意義を解析するのは困難である。そこで本研究では、申請者らが既に確立したがんの共食い現象を *in vitro* で定量可能な実験系にプロテオーム解析を応用し (図 2 参照)、がん細胞を貪食したがん細胞で特異的に発現変動するタ

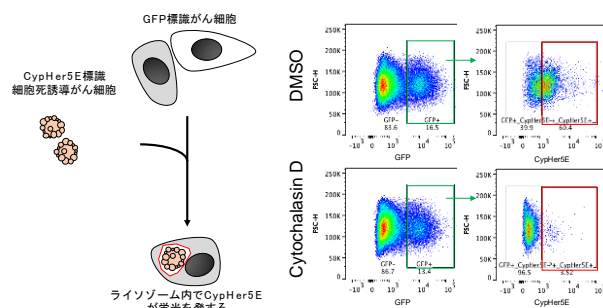


図2: “がんの共食い現象”の定量的評価系

抗がん剤などで細胞死を誘導した癌細胞株を CypHer5E\*で標識し、GFP\*\*を遺伝子導入した癌細胞株とともにインキュベーションする。貪食され、ライソソームに達すると蛍光を発する。  
 \*CypHer5E標識はライソソーム内で蛍光を発する=貪食を意味する  
 \*\*GFP標識は細胞死を誘導した癌細胞株と貪食する癌細胞を識別するため  
 Cytochalasin Dはアクチン重合阻害薬で貪食がブロックされる

ンパク質群を探索することで、がんの共食い現象の分子基盤や生物学的意義の理解を進めたい。

具体的には、図2に示す *in vitro* の実験系を用いる。これまでに細胞死を誘導したがん細胞を pH 感受性蛍光色素 (pH が低下すると蛍光を発する) である CypHer5E で標識し、細胞死を誘導していないがん細胞とインキュベートすることで、2 時間で 30% 程度、4 時間で 60% 以上のがん細胞が死細胞を貪食することを明らかにしている。

研究当初は細胞のタンパク抽出液を用いる計画であったが、培養上清中のタンパク質をプロテオーム解析する計画に変更して本共同研究を実施した。具体的には図3のような実験条件で、①非貪食がん細胞培養上清、②貪食がん細胞培養上清 (細胞死を誘導したがん細胞とインキュベートしたもの)、③②の条件に Cytocalasin D 処理を行ったものの培養上清、④②の条件でがん細胞と細胞死を誘導したがん細胞の間に 0.4 $\mu$ m のメンブレンを置いたものの培養上清の 4 群を用いてプロテオーム解析を行った。

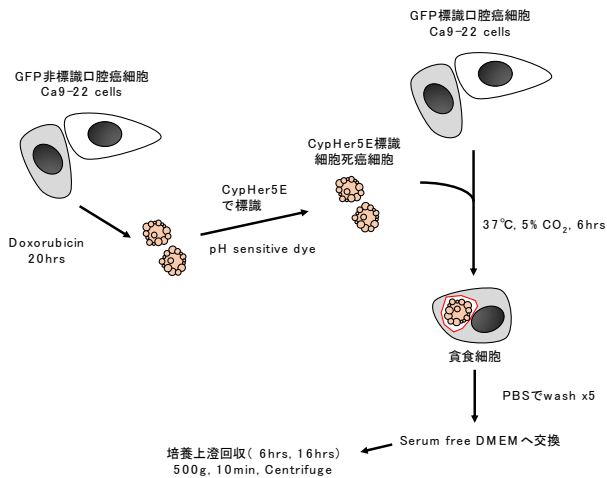


図3:本共同研究の実験条件の詳細

## 【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

図3で示した実験条件でプロテオーム解析を

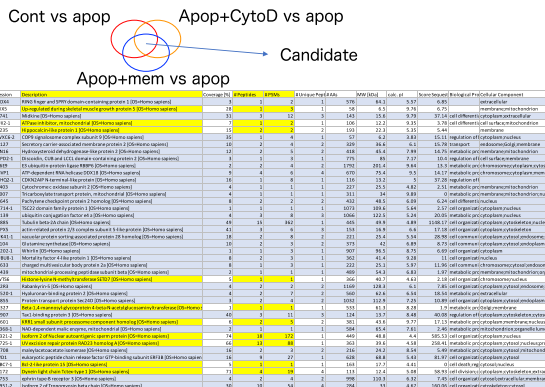


図4:本研究により得られた研究成果

を行い、図4のように①と②の比較、②と③の比較、②と④の比較を行い、それらを統合し、②で特異的に検出されるタンパク質を抽出した。

解析の結果、いくつかの分泌タンパクを同定した。今後はこれらを ELISA などの方法を用いて、検出し、検証実験を行う計画である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

前述のように、がんの共食現象によって貪食細胞が分泌するタンパク質の候補を同定することができた。今後はこれらの機能解析を行うことで、ほとんど明らかとなっていないがんの共食現象の生物学的意義の解明に迫ることができるのではないかと考えている。本年度の共同利用終了後も引き続き、小迫教授と連携して研究を進めていきたい。

## 【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表  
なし

[3-2]学会発表  
なし

[3-3]成果資料等  
なし

## 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本年度の共同研究で得られた研究成果より、検出されたタンパク質に細胞内タンパク質が多く含まれていたことから、死細胞由来のタンパク質がノイズとして含まれてしまうと考えられた。対応策として、Wash をより厳密に行うなどが挙げられる。また、がん細胞と死細胞のインキュベーション後、Serum free DMEM で培養し、培養上清を採取したが、血清飢餓による細胞の障害がみられたため、長時間の培養は困難であった。血清存在下でプロテオーム解析可能な方法を検討するなどが今後必要となると考えられた。