

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01401

研究課題名(和文) 転写調節因子MKL1によるがん関連線維芽細胞誘導機構の解明とがん治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of underlying mechanism of MKL1-mediated induction of cancer associated fibroblasts and its clinical applications

研究代表者

佐谷 秀行 (Saya, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：80264282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,800,000円

研究成果の概要(和文)：種々の間質細胞(線維芽細胞、間葉系前駆細胞および脂肪細胞)を骨肉腫細胞の培養上清で処理するとMKL1が活性化し、がん関連線維芽細胞(CAFs)への転換が誘導された。種々の間質細胞にMKL1の発現を惹起すると、CAF関連遺伝子の発現が増加し、CAFの特徴を獲得した。また、転写因子のSRFとの結合が、MKL1誘導によるCAF分化に必要であることも分かった。さらに、ROCK阻害剤のFasudilはアクチンの動態変化を介してMKL1を負に制御すること、またin vivoにおいてCAF分化を阻害し骨肉腫形成を抑制することを見出した。以上から、MKL1がCAF分化の主たる制御分子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子あるいは転写制御シグナルを標的とした薬剤が見出されていない現状において、本研究成果は、アクチン細胞骨格の動態を低分子化合物によって変化させることでMKL1および転写因子を調節し、それによってCAFへの分化を阻害し微小環境制御により腫瘍抑制するという先駆的治療法の開発の可能性を見出しており、学術的に新しい概念を生み出すだけでなく、社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：In various stromal cells (fibroblasts, mesenchymal progenitor cells, and adipocytes), conditioned medium obtained from cultured osteosarcoma cells enhanced the activation of megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1) which is a transcriptional regulator as well as induced the transition of these cells to cancer-associated fibroblasts (CAFs). We induced expression of MKL1 in various stromal cells and found that they increased expression of CAF-related genes and acquired CAF phenotypes. We also found that the interaction with serum response factor (SRF) is required for MKL1-induced CAF differentiation. In addition, we found that Rho-kinase inhibitor fasudil prevented nuclear translocation of MKL1 via actin dynamics and suppressed CAF differentiation as well as tumor formation in mouse osteosarcoma model. These findings suggest that MKL1 is a master regulator of the transition of stromal cells to CAFs and blocking CAF differentiation may provide a novel therapeutic approach for cancers.

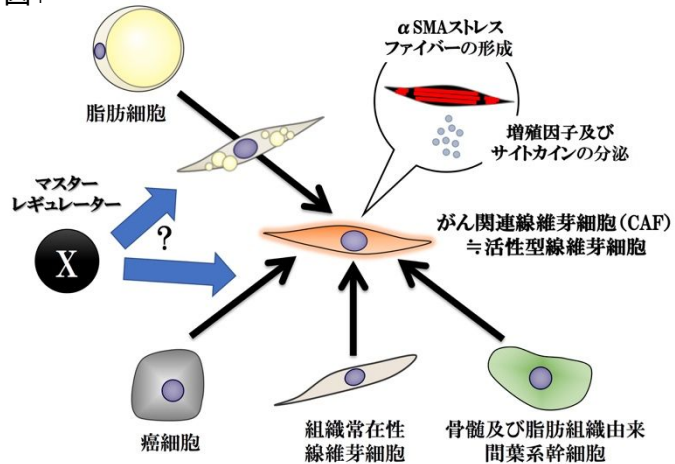
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん関連線維芽細胞 アクチン細胞骨格 MKL1

1. 研究開始当初の背景

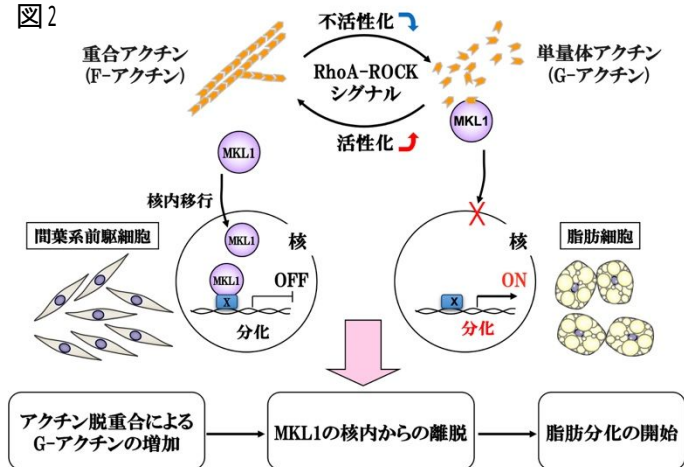
がん組織は、がん細胞とそれを支持する間質から構成されている。とりわけ、間質の構成要素の主であるがん関連線維芽細胞(CAF)は、様々な増殖因子やサイトカインやマトリクスを分泌して、がん細胞の増殖、生存、転移および血管新生を促進することが明らかにされており、がん治療の新たな標的として近年注目されている。これまでの多くの研究から、組織常在性の線維芽細胞、骨髄由来および脂肪組織由来の間葉系幹細胞が、増殖因子やケモカインおよびサイトカイン等の刺激を受けると、SMAを高発現した活性型線維芽細胞を経て、CAFへと分化することが知られている(図1-)。さらに、脂肪細胞がCAFの起源であるとの説も提唱されており、脂肪細胞ががん細胞と接触することで脂肪分解が引き起こされ、線維芽細胞様へと形態変化したのち、CAFとして働くと考えられている(図1-)。このように、CAFの起源や特性については明らかにされつつあるが、CAFの分化を決定する分子機構、またそれを制御するマスターレギュレーターは未解のままである。

図1



他方、研究代表者らはこれまでに、細胞骨格構成要素であるアクチンの重合状態を変化させると、転写調節因子MKL1が核内から離脱し、それがシグナルとなって脂肪分化が誘導することを明らかにした(図2; Nobusue et al., Nat Commun, 2014)。また、研究代表者らは最近、種々の分化細胞においてMKL1の発現を惹起すると、リプログラミングが誘導されること、さらにそのプロセスにおいて細胞が活性型線維芽細胞並びにCAF様の特徴を示すことを発見した。これらのことから、MKL1がCAF分化を決定するマスターレギュレーターとして働く可能性が示唆された。

図2



2. 研究の目的

本研究は、我々が見出したMKL1がマスターレギュレーターとしてCAF分化を制御することを明らかにし、その分子機構を解明することを本研究の第一の目的とした。そして、その所見に基づいて、MKL1およびアクチン動態を薬剤制御することで、CAFへの分化を阻害し微小環境制御により腫瘍抑制するという新たな腫瘍治療戦略を構築することを本研究の第二の目的とし実施した。

3. 研究の方法

(1) 骨肉腫細胞による間葉系細胞のCAF分化誘導: 研究代表者らがこれまでに樹立した骨肉腫人工幹細胞(骨肉種iCSC: Shimizu et al., Oncogene, 2010)から培養上清を回収し、それらを線維芽細胞、間葉系前駆細胞DFATあるいは脂肪細胞へと処理したのち、アクチン細胞骨格の動態変化、MKL1タンパク質の発現および局在変化、種々のCAF分化マーカーのmRNAの発現状況について検討した。

(2) 転写調節因子MKL1によるCAF分化誘導効果の検討: DFAT細胞および脂肪細胞にドキシサイクリン(DOX)依存的にMKL1を発現誘導するシステムを導入し、DOX添加に伴ってCAFの特性を獲得するか調べた。

(3) CAF分化を制御する主転写因子の同定: MKL1のTetOn発現誘導ベクターを導入したDFAT細胞において、MKL1を発現誘導することにより発現が変化する遺伝子セットをDNAマイクロアレイおよびBioinformaticsを駆使して明らかにし、その発現を制御する主転写因子の同定を試みた。

(4) アクチン動態作動性薬剤によるCAF分化阻害および腫瘍抑制効果の検討: DFAT細胞に種々のアクチン動態作動性薬剤(ROCK阻害剤Y-27632およびFasudil、アクチン重合阻害剤Latrunculin A)で処理し、アクチン細胞骨格の動態変化、MKL1タンパク質の局在変化について

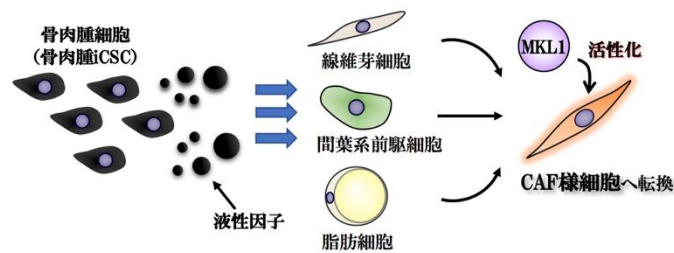
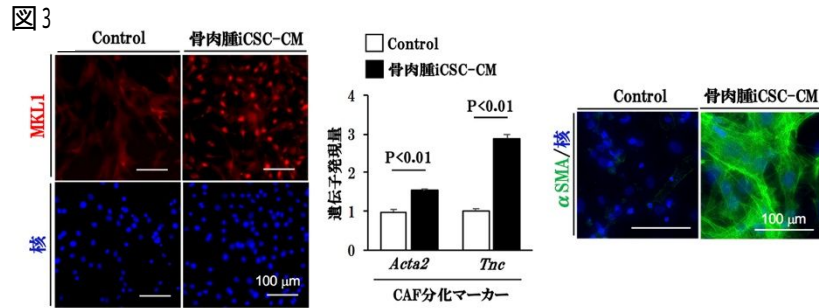
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

調べた。次いで、GFP 標識した骨肉種 iCSC を同系統の C57BL/6 マウスに皮下移植したのち、リード化合物の単剤投与によって、CAF 分化を阻害し腫瘍抑制できるか調べた。また、リード化合物と抗癌剤 Doxorubicin を併用することで、より効果的に腫瘍抑制できるか検討した。

4. 研究成果

(1) 骨肉腫細胞による間葉系細胞の CAF 分化誘導

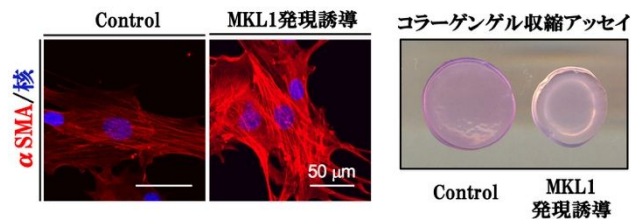
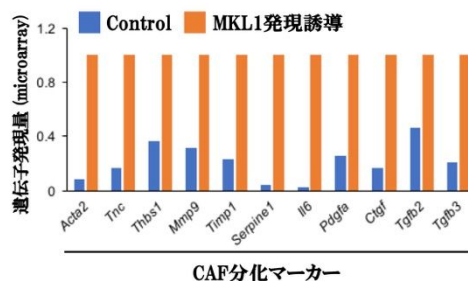
骨肉種 iCSC から培養上清 (骨肉腫 iCSC-CM) を回収し、種々の間質細胞 (線維芽細胞、DFAT 細胞および脂肪細胞) に添加し、その影響を調べた。その結果、骨肉腫 iCSC-CM 添加によって、MKL1 の核内移行が促進された (図 3)。また、Control 群と比較して、CAF 分化マーカーである *Acta2* および *Tnc* の発現量が有意に増加した (図 3)。さらに、骨肉腫 iCSC-CM 添加によって、CAF の特徴である SMA ストレスファイバーの形成が亢進された (図 3)。これらの結果から、骨肉腫 iCSC-CM に含まれる液性因子が MKL1 の核内移行および転写活性化を促し、CAF 様細胞への転換を誘導することが明らかとなった。また、これらの現象は種々の間質細胞において普遍的に起こることが示唆された。



(2) 転写調節因子 MKL1 による CAF 分化誘導効果の検討

DFAT 細胞および脂肪細胞に TetOn システムを用いて MKL1 の発現を惹起させ、それに伴って CAF 分化が誘導されるか検討した。マイクロアレイ解析の結果、MKL1 発現誘導によって、種々の CAF 分化マーカーの発現が増加することを見出した (図 4)。加えて、MKL1 を発現誘導した細胞では SMA ストレスファイバーの形成が著しく亢進された (図 4)。さらに、MKL1 発現誘導によって、CAF の特徴の一つである細胞収縮力が著しく増加した (図 4)。即ち、MKL1 の発現のみで種々の間質細胞が CAF の特性を獲得することが可能であり、MKL1 が CAF 分化を決定するマスターレギュレーターとして働くことが強く示唆された。

図 4

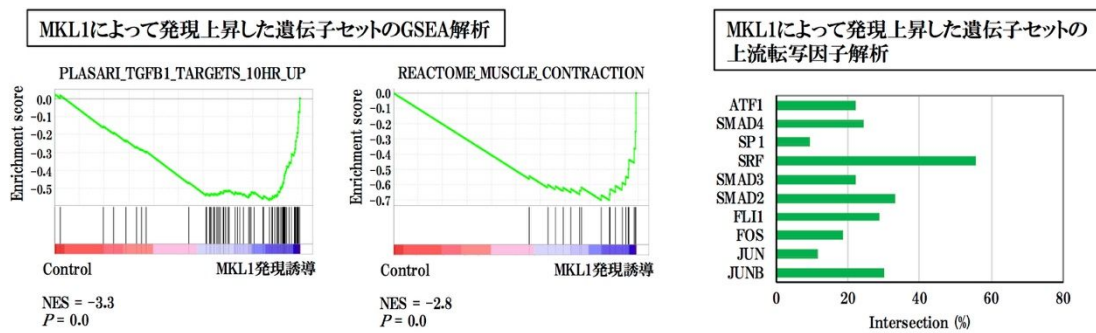


(3) CAF 分化を制御する主転写因子の同定

上記実験にて実施した MKL1 を発現誘導した DFAT 細胞のマイクロアレイデータを用いて、発現変動した遺伝子セットを同定し、その発現を制御する上流転写因子を探索した。MKL1 発現誘導によって 2 倍以上発現が増加した遺伝子は 1456 個であり、これらの遺伝子セットを Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により機能解析を行った。その結果、"TGF 標的遺伝子" や "筋収縮"、といった CAF に関連する機能が有意にエンリッチすることが分かった (図 5)。また、これら MKL1 によって発現増加した遺伝子セットが、どのような転写因子によって制御されるか検討を行った。その結果、SRF、SMAD2、SMAD3 及び SMAD4 といった転写因子によって制御されることが分かった (図 5)。とりわけ、SRF は MKL1 と直接結合する転写因子として既に知られており、DFAT 細胞に SRF との結合部位を欠損させた MKL1 変異体を発現誘導すると、CAF 分化が抑制されることも明らかとなった。以上の結果から、SRF が主転写因子として、MKL1 とともに CAF 分化の

制御に関与することが強く示唆された。

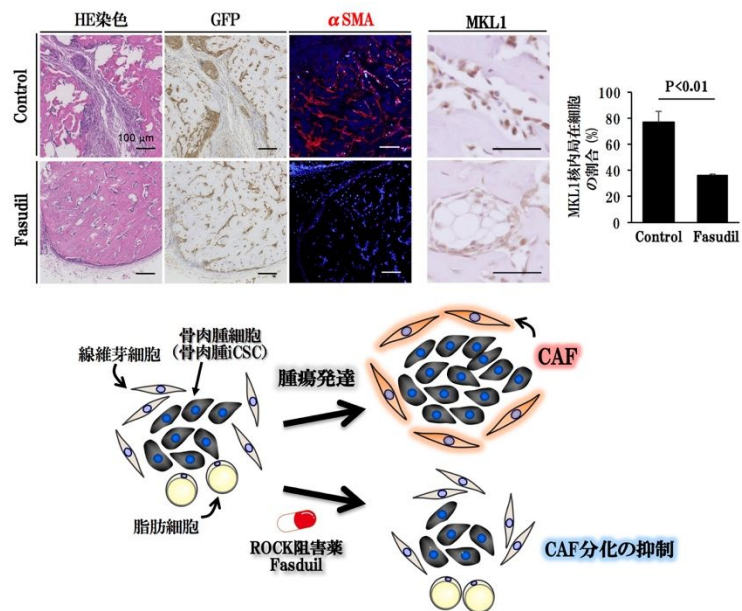
図5



(4) アクチン動態作動性薬剤による CAF 分化阻害および腫瘍抑制効果の検討

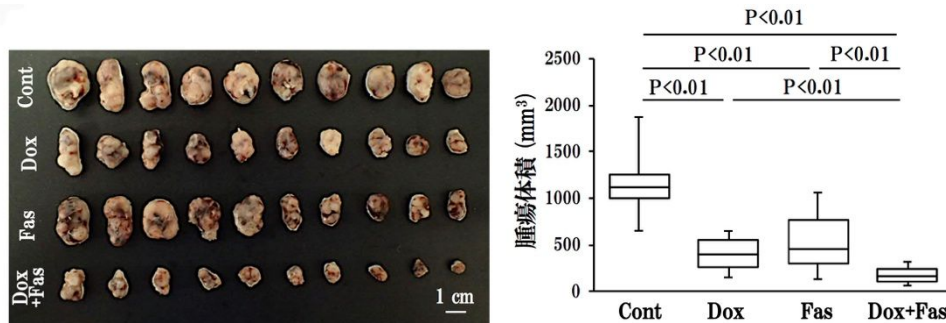
DFAT 細胞に種々のアクチン動態作動性薬剤を処理し、アクチン細胞骨格の動態変化および MKL1 タンパク質の局在変化について検討した。その結果、ROCK 阻害剤 Y-27632 および Fasudil、アクチン重合阻害剤 Latrunculin A を添加すると、アクチンの脱重合を促し、MKL1 の核内移行を抑制した。検討した化合物の中で、Fasudil は細胞毒性が少なく、かつ効果的に MKL1 を阻害することを見出し、Fasudil をリード化合物として取得できた。次いで、リード化合物として見出した Fasudil が in vivo における骨肉腫の腫瘍形成性を抑制できるか検討した。その結果、Fasudil 投与マウスにおいて腫瘍縮小効果が認められた。また、SMA の発現を指標として CAF の動態を調べたところ、コントロール群では腫瘍内部に多数の CAF が発生していたが、Fasudil 投与群では腫瘍間質は存在するものの、SMA 陽性の CAF はほとんど認められなかった (図6)。また、Fasudil 投与群の腫瘍組織では MKL1 を核内で発現する細胞は有意に減少した (図6)。以上の結果から、Fasudil は、アクチン細胞骨格の脱重合を介して MKL1 を負に制御することで、腫瘍間質細胞の CAF 分化を抑制し、腫瘍形成性を下げることが示唆された (図6)。

図6



次いで、臨床応用を想定して、抗癌剤 Doxorubicin (Dox) と Fasudil (Fas) の併用投与が、骨肉腫の腫瘍形成性に及ぼす影響について検討した。その結果、それぞれの単剤投与群と比較して、Dox+Fas 併用投与群では腫瘍形成効果を劇的に増強することが明らかとなった (図7)。

図7



今後、抗癌剤 Doxorubicin と ROCK 阻害剤 Fasudil の併用投与が、ヒト骨肉腫モデルにおいても CAF 分化および腫瘍形成性を抑制できるか明確にすることで、臨床研究への基盤を固めたい。また、これらの併用治療が、胃がんなど他の組織型がんにおいても有効であるか否か検討し、『アクチン動態に基づく微小環境制御による腫瘍抑制』という新たな治療概念の普遍性についても追求していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件／うち国際共著 12件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Takahashi N, Nobusue H, Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Onishi N, Kunitomi H, Kuroda T and Saya H	4. 巻 79
2. 論文標題 ROCK inhibition induces terminal adipocyte differentiation and suppresses tumorigenesis in chemoresistant osteosarcoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3088-3099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-2693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kunitomi H, Oki Y, Onishi N, Kano K, Banno K, Aoki D, Saya H and Nobusue H	4. 巻 25
2. 論文標題 The insulin-PI3K-Rac1 axis contributes to terminal adipocyte differentiation through regulation of actin cytoskeleton dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 165-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tabata Y, Imaizumi Y, Sugawara M, Andoh-Noda T, Banno S, Chai M, Sone T, Yamazaki K, Ito M, Tsukahara K, Saya H, Hattori N, Kohyama J, Okano H.	4. 巻 11
2. 論文標題 T-type Calcium Channels Determine the Vulnerability of Dopaminergic Neurons to Mitochondrial Stress in Familial Parkinson Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1171-1184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2018.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P.	4. 巻 153
2. 論文標題 Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rho GTPase 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 191-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2017.03.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu T, Kamel WA, Yamaguchi-Iwai S, Fukuchi Y, Muto A, Saya H.	4. 巻 108
2. 論文標題 : Calcitriol exerts an anti-tumor effect in osteosarcoma by inducing the endoplasmic reticulum stress response.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1793-1802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hideyuki Saya
2. 発表標題 Role of actin dynamics in cell fate plasticity of microenvironmental cells
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門ホームページ http://www.genereg.jp

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	信末 博行 (Nobusue Hiroyuki) (90525685)	慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任助教 (32612)	