

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770157

研究課題名 (和文) がん悪性化過程における転写調節因子 MRTF の関与

研究課題名 (英文) Involvement of transcription factor MRTF in the oncogenic process.

研究代表者

森田 強 (MORITA TSUYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80403195

研究成果の概要 (和文)：本研究では、v-ras や v-src による形質転換細胞において転写調節因子である MRTF (myocardin-related transcription factor) の活性が低下していること、また MRTF が様々なアクチン細胞骨格遺伝子の発現を誘導することでこれら形質転換細胞の転移、浸潤、腫瘍形成能を抑制していることが明らかとなった。また、MRTF と同じファミリータンパク質である myocardin が細胞周期抑制因子である p21 の発現を制御しており、平滑筋肉腫において myocardin の発現量減少が肉腫細胞の増殖を亢進させていることも見出した。さらに、活性型の MRTF や myocardin を形質転換細胞や肉腫細胞に導入することで、これらの細胞の転移・浸潤能や細胞増殖能を顕著に抑制することが可能であった。

研究成果の概要 (英文)：In this study, I demonstrated that transcription factor MRTF (myocardin-related transcription factor) regulates the activity of cell invasion and metastasis in the v-ras and v-src transformants via transcriptional regulation of the actin cytoskeletal genes. Further, myocardin regulates the expression of p21 gene, which is inhibitor of cell cycle progression, and in leiomyosarcoma cells myocardin expression level is decreased, leading to enhancement of cell cycle progression. Exogenous expression of constitutively active MRTF or myocardin inhibits the oncogenic properties of the transformants and leiomyosarcoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物学科・細胞生物学

キーワード：細胞骨格、細胞運動、癌、転移、浸潤

1. 研究開始当初の背景

myocardin や MRTF (myocardin-related transcription factor) は、平滑筋および心筋の分化に関する転写調節因子として注目されていたが、myocardin が筋特異的な発現様式を示すのに対し、MRTF は非筋肉細胞においても強く発現していることから、筋分化誘導とは異なる機能を備えているのではないかと考えられていた。私はこれまで、非筋肉細胞において MRTF が様々なアクチン細胞骨格遺伝子の発現を誘導することでストレスファイバー等のアクチン細胞骨格の編成に強く関与することを報告している。アクチン細胞骨格は、がん細胞を含む様々な細胞の運動において重要な役割を果たすことが知られているが、私は MRTF によって発現が誘導される caldesmon と呼ばれるアクチン結合タンパク質が、がん細胞の浸潤過程において阻害的な役割を担っていることを明らかにしてきた。さらに、上皮細胞が細胞骨格の再編成を介して間葉細胞へと変化し遊走能を獲得する上皮間葉転換と呼ばれる過程においても、MRTF が重要な因子であることを見出している。上皮間葉転換もまた、がん細胞の転移、浸潤過程において非常に重要な事象であることから、MRTF ががん細胞の転移、浸潤過程において重要な役割を果たしている可能性が非常に高いと考えられたが、これまでがん悪性化過程における MRTF や myocardin の関与はほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

上記のように myocardin や MRTF がアクチン細胞骨格の再編成を誘導することでがん悪性化過程に関与する可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、myocardin および MRTF が、がん悪性化過程、特に転移・浸潤過程においてどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット上皮細胞である RIE 細胞にがん遺伝子 v-ras および v-src を導入した形質転換細胞を用いて、がん化過程における MRTF の活性/発現量の変化を解析した。これまで、v-ras や v-src による形質転換過程においてアクチン細胞骨格の再編成が観察されることが知られていた。そこで、MRTF により発現制御されている様々なアクチン細胞骨格タンパク質の発現量を比較し、アクチン細胞骨格再編成過程における MRTF の関与を検討した。また、これら形質転換細胞に活性型 MRTF を導入することで、転移、浸潤、腫瘍形成能などのがん形質が改善されるのかを検討した。具体的には、活性型 MRTF 発現株を樹立し、ヌードマウスに移植することで

その細胞の転移や腫瘍形成能を観察した。

(2) 子宮平滑筋肉腫細胞と正常平滑筋細胞を用いて、myocardin や平滑筋分化マーカータンパク質の発現量変化を観察した。また、子宮平滑筋肉腫細胞において myocardin を過剰発現させることにより、肉腫細胞の分化形質や悪性度が改善されるのかを検討した。さらに、研究の過程で myocardin の過剰発現により子宮平滑筋肉腫の増殖が著しく抑制されることが明らかとなったため、myocardin がどのようなメカニズムで細胞増殖を制御しているのかを詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) v-ras および v-src による形質転換細胞のがん形質における MRTF の関与

① v-ras および v-src によるラット上皮細胞 RIE 形質転換株 (RIE-ras, RIE-src) において、これまでの報告どおりアクチン細胞骨格の減弱が観察されたが、これに伴って MRTF により発現制御を受けるアクチン細胞骨格タンパク質である tropomyosin や caldesmon の発現減少が認められた。一方、これら形質転換株に活性型 MRTF を発現させると、tropomyosin や caldesmon の発現上昇とそれに伴うアクチン細胞骨格の回復が観察された。

② 以上の結果から、RIE-ras および RIE-src 細胞では MRTF の不活化が引き起こされていると推測されたが、実際にこれら形質転換細胞では MRTF の核内移行が著しく抑制されており、転写調節因子である MRTF の機能が低下している可能性が示された。

③ RIE-ras および RIE-src 細胞を親株として活性型 MRTF の安定発現株を樹立し、その細胞におけるがん形質の変化を観察した。すると、細胞の運動能には差が無いものの、in vitro における浸潤能に著しい抑制効果がみられた。また、寒天培地中における足場非依存的な増殖能についても、活性型 MRTF の安定発現株では親株である RIE-ras および RIE-src 細胞と比較して著しい抑制効果が確認された。

④ さらに、これら活性型 MRTF 安定発現株をヌードマウスに移植することで、その腫瘍形成能や転移能を検討したが、どちらも親株である RIE-ras および RIE-src 細胞と比較して著しい抑制効果が確認された (図 1)。

以上の結果から、v-ras や v-src による形質転換過程において、MRTF の活性は著しく低下し、それに伴ってアクチン細胞骨格の再編成が引き起こされることが明らかとなった。また、MRTF の活性を回復させることでアクチン細胞骨格の回復だけでなく、形質転換細胞

における腫瘍形成能や転移、浸潤能などのがん形質も抑制する事が可能であった。私の研究と同時期に他の研究グループからも MRTF ががん細胞の転移過程に関与するという報告がなされており、今後、MRTF の核内移行を促進させる方法を確立することで、がん細胞の転移抑制などの臨床応用に繋がるものと期待している。

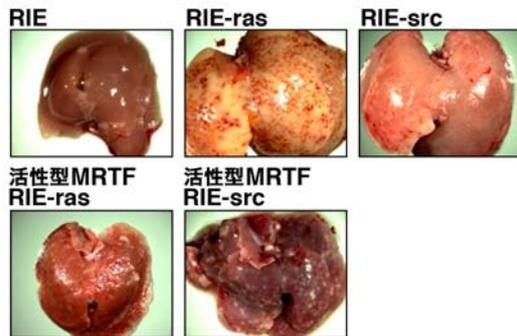


図 1、ヌードマウスの尾静脈から各種細胞株を注入移植し、それらの肝転移を観察した。

(2) 子宮平滑筋肉腫における myocardin の機能とがん形質抑制に対する効果

①正常平滑筋細胞 Hu.USMC と比較して、子宮平滑筋肉腫細胞株 SK-UT-1, SKN, SK-LMS-1 ではアクチン細胞骨格が貧弱であり、また α SMA, calponin, SM22 SM2-MHC などの平滑筋分化マーカータンパク質の発現も著減していた。これらマーカータンパク質は myocardin による発現制御を受けていることから myocardin 自身の発現量をこれら細胞間で比較したところ、平滑筋肉腫細胞株において myocardin の発現が著しく減少していた。

②アデノウイルスベクターを用いてこれら平滑筋肉腫細胞に myocardin を過剰発現させると、アクチン細胞骨格の回復と共に上記平滑筋分化マーカーの発現が再び見られるようになった。

③これらの細胞では、分化形質を再び獲得しただけでなく、細胞増殖能が著しく抑制されていた。そこで、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析したところ、多くの細胞が G0/G1 期で停止していることが明らかとなった。さらに、G1-S 期の進行を制御する一連の細胞周期調節タンパク質の発現を確認したところ、全ての肉腫細胞株において myocardin の過剰発現により細胞周期の進行を抑制する因子である p21 遺伝子の発現が著しく亢進していた。

④ヒト p21 遺伝子のプロモーター領域には myocardin/SRF が結合するシスエレメント CArG-box が存在した。プロモーター/リポ

ーター解析および ChIP 解析により、実際に myocardin が CArG-box を介して p21 の発現を誘導していることが明らかとなった。

⑤さらに、実際の子宮平滑筋肉腫の病理組織片においても myocardin の発現が著減しており、それに伴って p21 の発現も減少していることが示された(図 2)。

以上の結果から、平滑筋肉腫細胞においては myocardin が平滑筋分化マーカーの発現を制御しているだけでなく、p21 の発現を介して細胞増殖をも制御していることが明らかとなった。正常平滑筋細胞と比較して平滑筋肉腫では myocardin の発現が著減していたことから、今後そのメカニズムを明らかにすることで、平滑筋肉腫の分化度の低下や増殖能亢進のメカニズムを明らかにできるものと期待している。

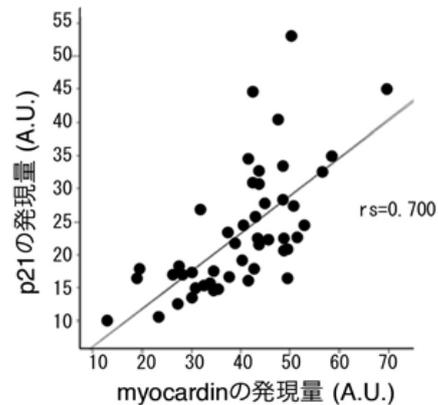


図 2、子宮平滑筋肉腫の病理組織片における myocardin と p21 の発現量相関

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、由雄敏之、森田強、他 (計 5 名、掲載順 2 番)

MRTF-A/B suppress the oncogenic properties of v-ras⁻ and v-src-mediated transformants.

Carcinogenesis (2010) in press, 査読あり

2、木村泰典、森田強、他 (計 5 名、掲載順 2 番)

Myocardin functions as an effective inducer of growth arrest and differentiation in human uterine leiomyosarcoma cells.

Cancer Research (2010) 70, 501-511, 査読あり

3、森田強、祖父江憲治

Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. Journal of Biological Chemistry (2009) 284, 27734-27745, 査読あり

4、福本健太郎、森田強、他（計7名、掲載順2番）

Detrimental effects of glucocorticoids on neuronal migration during brain development. Molecular Psychiatry (2009) 14, 1119-1131, 査読あり

5、真柳平、森田強、他（計5名、掲載順2番）

Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton. Journal of Biological Chemistry (2008) 283, 31183-31196, 査読あり

[学会発表]（計4件）

1、森田強、祖父江憲治

Specification of neuronal polarity mediated by mTOR-regulated local translation of CRMP2 and tau

第32回 日本神経科学大会（2009年9月16日-9月18日、名古屋国際会議場）

2、森田強、祖父江憲治

Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and tau via the mTOR-p70S6K pathway

第61回 日本細胞生物学会大会（2009年6月2日-6月4日、名古屋国際会議場）

3、森田強、由雄敏之、祖父江憲治

Caldesmon suppresses the invasiveness of RSV-transformant and cancer cells by regulating podosome/invadopodium formation and dynamics

第60回 日本細胞生物学会大会（2008年6月29日-7月1日、パシフィコ横浜）

4、森田強、由雄敏之、祖父江憲治
Dual roles of MRTFs in epithelial-mesenchymal transition: Induction of slug expression and remodeling of the actin cytoskeleton

第60回 日本細胞生物学会大会（2008年6月29日-7月1日、パシフィコ横浜）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 強 (Morita Tsuyoshi)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80403195

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：