

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00518

研究課題名(和文) がん関連線維芽細胞誘導分子機構の解明とその阻害に基づく腫瘍微小環境制御

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of cancer-related fibroblast induction and regulation of the tumor microenvironment based on its inhibition

研究代表者

佐谷 秀行 (Saya, Hideyuki)

藤田医科大学・がん医療研究センター・センター長

研究者番号：80264282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞など、がん組織中に存在する種々の間質細胞は、サイトカイン等の刺激によって活性化し、腫瘍微小環境の主要な構成要素であるがん関連線維芽細胞(CAF)へと分化する。CAFの起源や特性については明らかにされつつあるが、間質細胞からCAFへの分化を決定する分子機構は未解のままである。本研究では、悪性骨肉腫細胞により分泌される液性因子が、脂肪細胞に作用してアクチン重合化を促進し、それによって転写調節因子MKL1を活性化することで、脱分化さらにはCAFへの分化転換を誘導することを明らかにした。したがって、MKL1が間質細胞からCAFへの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示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、アクチン動態により制御されるMKL1が間質細胞からCAFへの分化を誘導するマスターレギュレーターとして働くことを明らかにするとともに、標的としてアクチン細胞骨格という物理的要素の動態を変化させることで、間質細胞から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、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。

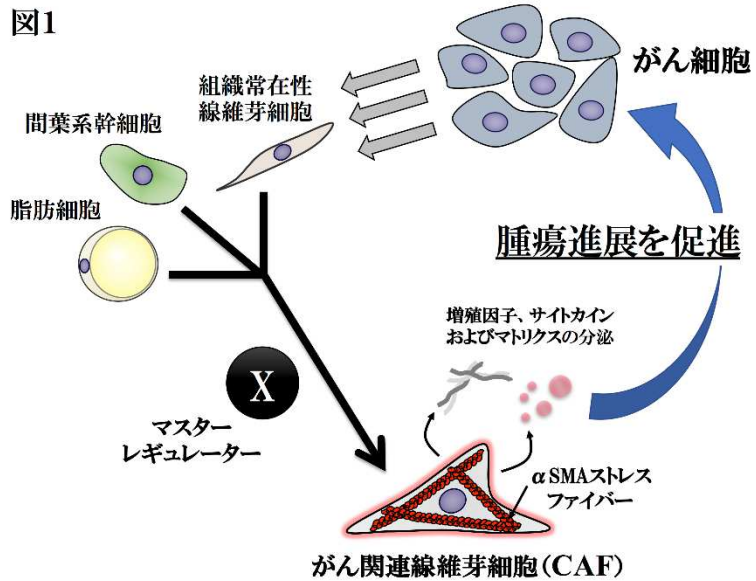
研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment is composed of various cell types, of which cancer-associated fibroblasts (CAFs) are the major component. CAFs originate from resident fibroblasts, mesenchymal stem cells, epithelial cells and adipocytes, influence tumor growth by secreting inflammatory cytokines and growth factors. However, the molecular mechanism of which regulate the conversion from stromal cells into CAFs remains unclear. In this study, we found that soluble factors secreted from malignant osteosarcoma cells enhanced F-actin polymerization and the transcriptional activity by MKL1 in adipocytes, induced the dedifferentiation and further the conversion of these cells into CAF-like cells. These findings suggest that MKL1 acts as a master regulator of the conversion of stromal cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍関連線維芽細胞 アクチン

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、また抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性にも関与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。これまでの研究から、組織常在性の線維芽細胞や間葉系幹細胞が、がん細胞からの刺激を受けると、 α SMA を高発現した活性化線維芽細胞を経て、CAF へと分化することが知られている (図1; Kalluri, *Nat Rev Cancer*, 2016)。さらに、がん細胞によって脂肪細胞の脱分化が促され、線維芽細胞様へと形態変化したのち、CAF として働くことも報告されている (図1; Park et al., *Nat Rev Endocrinol*, 2014)。このように、CAF の起源や機能については多数の報告があるが、CAF への転換を決定する分子機構、さらにはそれを制御するマスターレギュレーターは明らかにされていない。

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を脱重合させると、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細胞への分化が誘導されることを明らかにしてきた (Nobusue et al., *Nat Commun*, 2014)。また研究代表者らはごく最近、終末分化した脂肪細胞において MKL1 の発現を惹起すると、脂肪細胞マーカーを消失するとともに、活性化線維芽細胞並びに CAF の特徴である α SMA ストレスファイバーを形成し、種々の CAF 分化マーカーの発現量が増加することを見出しており、MKL1 の発現誘導によって、図1で示した脂肪細胞から CAF への転換を模倣する現象が引き起こされることが推測される。これらのことから、MKL1 が間質細胞から CAF への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。

2. 研究の目的

本研究は、がん細胞がどのような分子機構を経て、線維芽細胞や脂肪細胞などの間質細胞を CAF へと転換させるのか、さらにはそのプロセスの引き金となるトリガー因子を解明することを本研究の第一の目的とした。また、この所見に基づいて、CAF 分化トリガー因子あるいはその標的となる MKL1 を薬剤制御することで、間質細胞から 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た。

3. 研究の方法

(1) 骨肉腫細胞の皮下脂肪組織への移植：研究代表者らがこれまでに樹立したマウス骨肉腫細胞 (Shimizu et al., *Oncogene*, 2010) の中で悪性度の高い AXT 細胞と悪性度の低い A0 細胞を同系統の C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織内に移植し、腫瘍形成さらには CAF 分化について検討した。

(2) 骨肉腫細胞による間質細胞の CAF 分化誘導：上記 AXT 細胞及び AO 細胞から培養上清を回収し、それらを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、種々の脂肪細胞マーカー及び CAF 分化マーカーの発現状況、さらには MKL1 の活性について解析した。

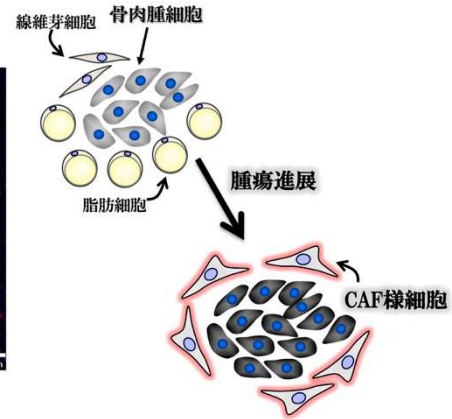
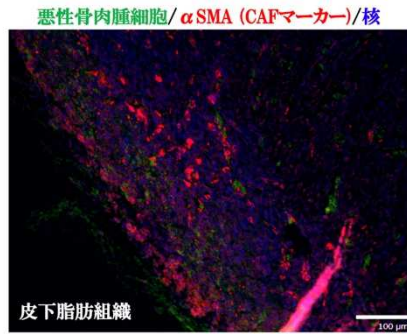
(3) 骨肉腫細胞の代謝産物解析：間質細胞から CAF への分化を誘導する腫瘍微小環境因子の探索として、AXT 細胞及び AO 細胞から培養上清を回収し、細胞外代謝フラックス解析を行った。

4. 研究成果

(1) 骨肉腫細胞の皮下脂肪組織への移植

悪性度の高い AXT **図2**

細胞と悪性度の低い AO 細胞を皮下脂肪組織内へ移植し、14 日後に解剖し、組織学的解析を実施した。その結果、AXT 細胞の移植では、AO 細胞と比べて、形成される骨肉腫の重量及び体積が有意に大きかった。さらに、

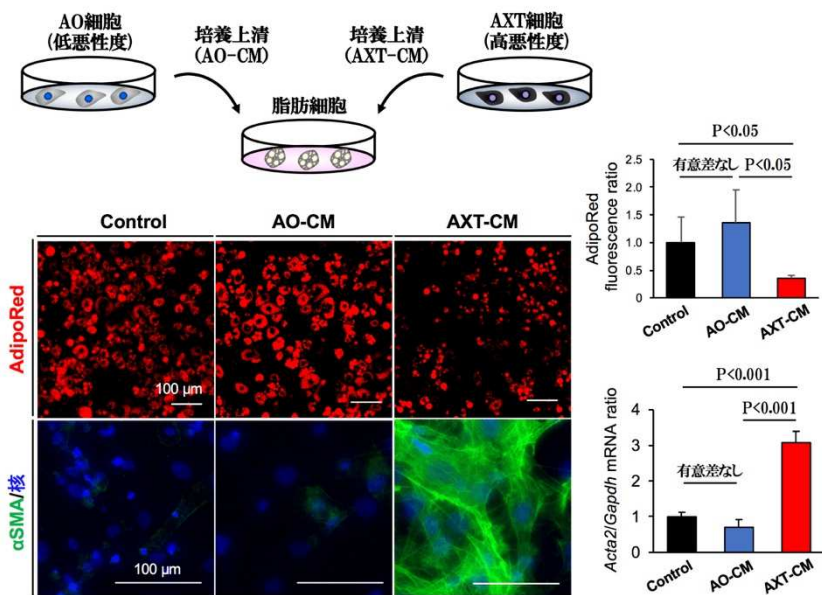


形成された骨肉腫の組織学的解析を行った結果、脂肪組織内で生着した AXT 細胞周囲の脂肪細胞が劇的に消失し、αSMA 陽性の CAF 様細胞へと置き換わった (図 2)。以上の結果から、悪性骨肉腫細胞は脂肪細胞へ作用し、脱分化さらには CAF への分化転換を誘導することが示唆された。

(2) 骨肉腫細胞による間質細胞の CAF 分化誘導

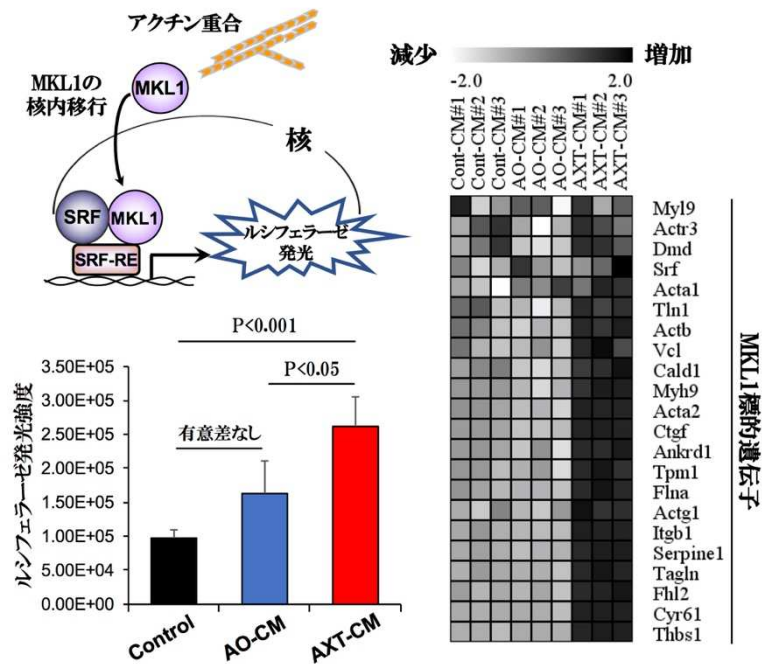
AXT 細胞及び AO 細胞から培養上清を回収し (AXT-CM 及び AO-CM)、終末分化した脂肪細胞に添加し、その影響を調べた。その結果、AXT-CM で脂肪細胞を処理すると、種々の脂肪分化関連遺伝子の発現及び脂肪滴を有する細胞が有意に減少し、αSMA 陽性の CAF 様細胞が著しく増加した (図 3)。一方、AO-CM の処理ではこれら脂肪細胞-CAF 転換の誘導効果は認められなかった (図 3)。また、AXT-CM を処理した細胞では、MKL1-SRF 転写経路の活性化が誘導されることを見出した (図 4)。さらに、AXT-CM 及び AO-CM を

図3



た (図 3)。一方、AO-CM の処理ではこれら脂肪細胞-CAF 転換の誘導効果は認められなかった (図 3)。また、AXT-CM を処理した細胞では、MKL1-SRF 転写経路の活性化が誘導されることを見出した (図 4)。さらに、AXT-CM 及び AO-CM を処理した脂肪細胞に

図4
 てマイクロアレイ解析を行ったところ、AXT-CM を処理した脂肪細胞では MKL1 標的遺伝子セットが高発現することが分かった (図4)。以上の結果から、高悪性度のがん細胞から分泌される液性因子が、脂肪細胞で MKL1 の活性化を促し、それによって脱分化さらには CAF への分化転換を誘導することが強く示唆された。



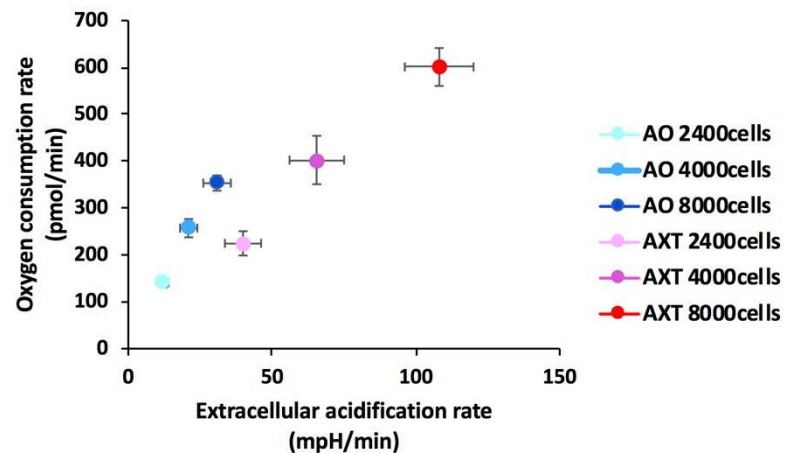
(3) 骨肉腫細胞の代謝産物解析

AXT 細胞及び AO 細胞の培養上清 (AXT-CM 及び AO-CM) を用いて細胞外フラックス解析を行った。その結果、AXT 細胞では AO 細胞と比較して代謝が全般的に亢進しており、それらが特に解糖系に依存することが分かった (図5)。

今後、悪性骨肉腫細胞由来の解糖系代謝産物が、脂肪細胞においてアクチン重合及び MKL1 の活性化

を促し、脱分化さらには CAF への分化転換を誘導するか否か明らかにし、解糖系代謝経路を制御することで CAF 分化及び腫瘍微小環境の形成を阻害し、腫瘍抑制するという新たな治療戦略を構築していきたい。

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 15件）

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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)	藤田医科大学・がん医療研究センター・講師 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関