

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07131

研究課題名(和文) アクチン動態が制御するがん幹細胞の薬剤耐性機構の解明と治療戦略の構築

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of drug resistance in cancer stem cells regulated by actin cytoskeleton dynamics and therapeutic strategies based on this mechanism

研究代表者

信末 博行 (Nobusue, Hiroyuki)

藤田医科大学・腫瘍医学研究センター・講師

研究者番号：90525685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性を示すマウス骨肉腫細胞AOに抗がん剤Doxorubicinを処理すると、生き残った細胞にてアクチンの重合化、さらには転写調節因子MKL1が活性化することを見出した。次いで、AO細胞でMKL1を阻害すると抗がん剤に対する感受性が増加し、反対に、薬剤感受性を示すAX細胞でMKL1を発現誘導すると抗がん剤に抵抗性を示すようになった。さらに、ヒト骨肉腫細胞株においてDoxorubicinを処理するとともにアクチン重合を阻害すると、MKL1活性が阻害され、抗がん剤の抗腫瘍効果が増強されることが分かった。以上の結果から、MKL1は骨肉腫細胞において薬剤耐性制御因子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、細胞骨格構成要素であるアクチンの動態を分子標的として制御することで、転写制御シグナルを変化させ、がん幹細胞の薬剤耐性を阻害し腫瘍抑制するという新規治療法の開発に繋がるものであり、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と考える。

研究成果の概要(英文)：We previously established osteosarcoma-initiating (OSi) cells by overexpression of c-Myc in bone marrow stromal cells derived from Ink4a/Arf (-/-) mice. Osi cells are composed of two distinct clones: chemosensitive AX cells and chemoresistant AO cells. We found that AO cells survived after the doxorubicin treatment exhibited excessive actin polymerization and nuclear translocation of and transcriptional activation by MKL1 (megakaryoblastic leukemia 1) which is associated with actin cytoskeleton dynamics. In addition, depletion of MKL1 enhanced the sensitivity of AO cells to doxorubicin whereas, conversely, overexpression of MKL1 attenuated that of AX cells to doxorubicin. Furthermore, we found that inhibition of actin polymerization potentiated the antitumor activity of doxorubicin in human OS cell lines through inactivation of MKL1. These findings suggest thus that MKL1 acts as a key molecule in regulating the chemoresistance of OS cells.

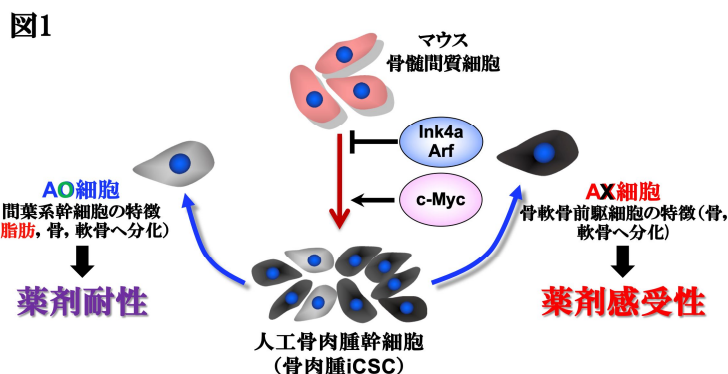
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：アクチン細胞骨格 がん幹細胞 薬剤耐性 骨肉腫 MKL1

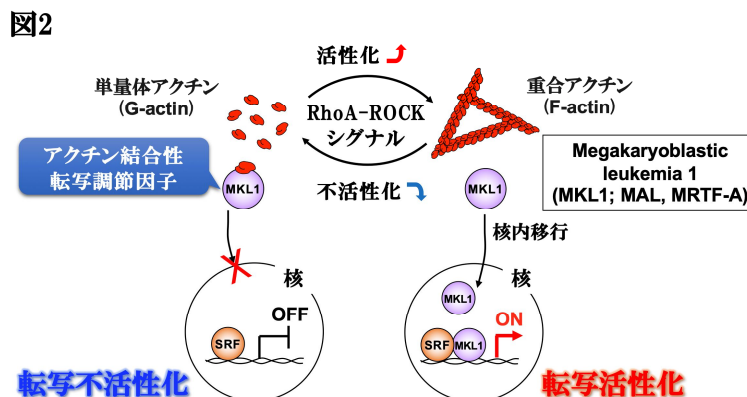
### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、がん幹細胞や前駆細胞、そして分化細胞といった不均一な細胞集団により構成されている。腫瘍に対して抗癌剤が効かない、あるいは効かなくなる現象を薬剤耐性というが、その特性はがん幹細胞に特有であると考えられており、これらの細胞の存在が根治を困難にするとともに、がん再発の主たる要因となっている。したがって、がん幹細胞はがん治療の標的として近年注目されており、種々の組織型腫瘍において薬剤耐性を有するがん幹細胞を同定するとともに、がん幹細胞の薬剤耐性を制御する分子機構の解明と、その制御に基づく効果的な治療法の開発が切望されている。

これまでに研究代表者らの研究室では、マウス骨髄間質細胞に癌遺伝子c-MYCの過剰発現および癌抑制遺伝子Ink4a/Arfを欠損することによって、致死性の悪性腫瘍を形成する人工骨肉腫幹細胞(骨肉腫iCSC)を樹立し、その性状解析を行ってきた(Shimizu et al., *Oncogene*, 2010)。その結果、骨肉腫iCSCは、間葉系幹細胞の特徴を有するAO細胞と骨・軟骨前駆細胞の特徴を有するAX細胞の2つのサブクローンから構成されることが分かった。また研究代表者らは、AO細胞はAX細胞と異なり、骨肉腫の化学療法に用いられる抗癌剤に耐性を示すことを見出した(図1:Takahashi et al., *Cancer Res*, 2019)。即ち、骨肉腫iCSCモデルにおいて、AO細胞が薬剤耐性を有する潜在的ながん幹細胞であると示唆された(Arima et al., *Cancer Sci*, 2020)。



他方、申請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分化が誘導されることを明らかにしてきた(図2:Nobusue et al., *Nat Commun*, 2014)。また、研究代表者らはごく最近、AO細胞に抗がん剤Doxorubicinを添加すると、生き残った細胞においてアクチン重合化が亢進することを見出して



おり、がん幹細胞の薬剤耐性の制御にアクチン細胞骨格の動態が関与する可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究は、がん幹細胞を標的とした先駆的治療法の開発を最終目標として、アクチン動態さらにはその下流で働くMKL1が骨肉腫をはじめとする種々の組織型がん幹細胞の薬剤耐性を普遍的に制御することを明らかにする目的で実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 抗がん剤耐性マウス骨肉腫細胞のアクチン細胞骨格及びMKL1の動態変化: 薬剤耐性を示すAO細胞を抗がん剤Doxorubicin有無の条件下で培養し、72時間後に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、MKL1抗体及び蛍光標識したファロイジンをを用いて、アクチン細胞骨格及びMKL1の動態を調べた。また、MKL1と直接結合する転写因子SRFの応答配列の下流でルシフェラーゼを発現するベクター(SRF-RE luciferase)をAO細胞に導入し、これらを用いてMKL1の転写活性を評価した。同時に、細胞からRNAを抽出し、MKL1下流遺伝子の発現解析を行った。さらに、MKL1のin vivoでの薬剤耐性に関するエビデンスを取得する目的で、マウス悪性骨肉腫細胞AXT(Shimizu et al., *Oncogene*, 2010)を同系統のC57BL/6マウスに皮下移植し生着したのち、Doxorubicinを尾静脈内に2回投与し、移植から2週間後に腫瘍組織を回収し、免疫組織染色にてMKL1の発現状況を調べた。

(2) マウス骨肉腫細胞の薬剤耐性におけるMKL1の機能解析: AO細胞にMKL1を標的としたsiRNA

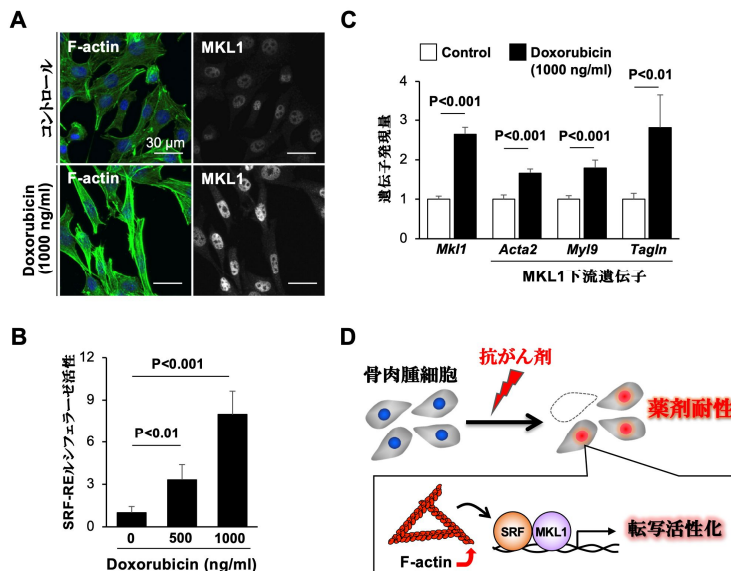
を導入し MKL1 を阻害したのち、Doxorubicin で処理し、Cell Titer Glo Kit (Promega 社) を用いて細胞生存を評価した。一方で、薬剤感受性を示す AX 細胞に MKL1 の TetOn 発現誘導ベクターを導入し、MKL1 を発現誘導したのち、Doxorubicin で処理し、細胞生存を評価した。  
 (3) ヒト骨肉腫細胞株の薬剤耐性における MKL1 の関与の検討：ヒト骨肉腫細胞株 (U2OS 及び 143B) を Doxorubicin 有無の条件下で培養し、マウス骨肉腫細胞と同様に、生存細胞において MKL1 の活性化が起こるか否か検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗がん剤耐性マウス骨肉腫細胞のアクチン細胞骨格及び MKL1 の動態変化

薬剤耐性を示す AO 細胞に Doxorubicin を処理したのち、アクチン細胞骨格の動態変化及び MKL1 の局在変化について解析した。その結果、Doxorubicin 処理後に生き残った細胞にてアクチン重合化が亢進し、それと同時に細胞内での MKL1 の発現及び核内局在レベルが著しく増加した (図 3A)。また、SRF-RE luciferase を導入した AO 細胞に Doxorubicin を処理したのち、マルチモードプレートリーダーにてルシフェラーゼレポーター活性を測定した。その結果、Doxorubicin の濃度依存的に MKL1 の転写活性が増加することが分かった (図 3B)。

図3

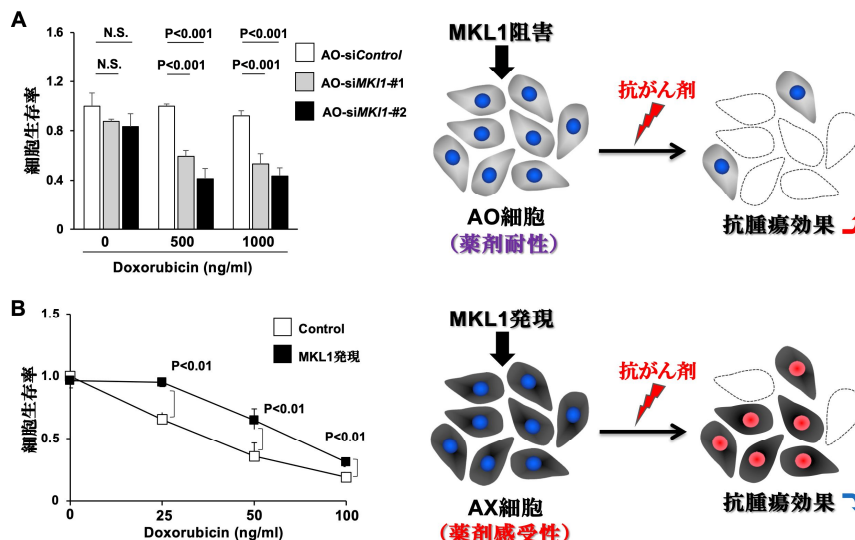


さらに、Doxorubicin の処理に伴って、MKL1 下流遺伝子 (*Acta2*, *Myl9* 及び *Tagln*) の発現量も有意に増加した (図 3C)。さらに、マウス悪性骨肉腫細胞 AXT を同系統の C57BL/6 マウスへ皮下移植し生着したのち、Doxorubicin を尾静脈投与し、腫瘍組織における MKL1 の動態を調べた。その結果、コントロール群と比較して、Doxorubicin 投与群では骨肉腫内で生存する腫瘍細胞において MKL1 の核内発現レベルが著しく増加することを見出しており、MKL1 が活性化状態にあることが示唆された。以上の結果から、抗がん剤処理後に生存する骨肉腫幹細胞ではアクチン重合化の亢進及び MKL1 の活性化が起こることが明らかとなった (図 3D)。

##### (2) マウス骨肉腫細胞の薬剤耐性における MKL1 の機能解析

薬剤耐性を示す AO 細胞に MKL1 を標的とした siRNA (siMkl1) 及び siControl を導入し、その後 Doxorubicin 有無の条件下で 2 日間培養した。まず、siMkl1 を導入した AO (AO-siMkl1) 細胞では、コントロール群 (AO-siControl) と比較して、MKL1 及び MKL1 下流遺伝子の発現量が有意に減少しており、MKL1 が阻害できていることを確認した。

図4

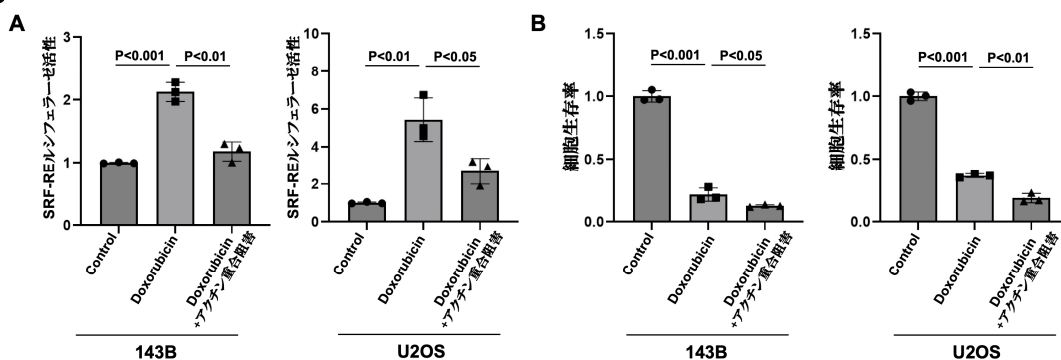


次いで、これらの細胞に Doxorubicin を添加したところ、抗腫瘍効果が有意に増加し、MKL1 阻害によって抗がん剤が効きやすくなった (図 4A) 一方で、薬剤感受性を示す AX 細胞に TetOn システムによって MKL1 を発現誘導できるベクター (TetOn-MKL1) を導入し、その後 Doxorubicin 有無の条件下で 2 日間培養した。これらの細胞はドキシサイクリン依存的に外因性 MKL1 の発現が惹起され、それによって Doxorubicin による抗腫瘍効果が有意に減少し、抗がん剤が効きにくくなった (図 4B)。以上の結果から、アクチン動態によって直接制御される MKL1 は、マウス骨肉腫細胞において薬剤耐性制御因子として働くことが強く示唆された。

### (3) ヒト骨肉腫細胞株の薬剤耐性における MKL1 の関与の検討

最終的に、マウスのみならず、ヒト骨肉腫の薬剤耐性の制御に MKL1 が関与することを明らかにする目的で、ヒト骨肉腫細胞株 (U2OS 及び 143B) に Doxorubicin を添加し、MKL1 の活性化状態を調べた。U2OS 及び 143B 細胞株に SRF-RE luciferase を導入し Doxorubicin 有無の条件下で 2 日間培養したところ、Doxorubicin 処理によって MKL1 の転写活性が有意に増加した (図 5A)。また、これらの細胞株において Doxorubicin を処理するとともにアクチン重合を阻害すると、MKL1 活性が阻害され、Doxorubicin による抗腫瘍効果が増強されることが分かった (図 5B)。以上の結果から、アクチン細胞骨格-MKL1 の経路が、ヒト骨肉腫細胞の薬剤耐性の制御にも関与することが示唆された。

図5



本課題において、転写調節因子 MKL1 がマウス及びヒト骨肉腫細胞の薬剤耐性の制御因子として働くことを見出した。また、アクチン脱重合及び MKL1 阻害によって、骨肉腫細胞の抗がん剤に対する感受性を上げ、治療効果を増強することが分かった。今後は、抗がん剤処理後に生存するがん幹細胞でアクチン重合、さらには MKL1 の活性化が誘導される分子機構を明らかにしたい。また上記を踏まえて、アクチン動態及び MKL1 を薬剤制御することで、治療抵抗性のがん幹細胞の抗がん剤効果を増強するという新たな治療戦略を構築したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugimoto Atsuko, Watanabe Takahiro, Matsuoka Kazuhiro, Okuno Yusuke, Yanagi Yusuke, Narita Yohei, Mabuchi Seiyo, Nobusue Hiroyuki, Sugihara Eiji, Hirayama Masaya, Ide Tomihiko, Onouchi Takanori, Sato Yoshitaka, Kanda Teru, Saya Hideyuki, Iwatani Yasumasa, Kimura Hiroshi, Murata Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Growth Transformation of B Cells by Epstein-Barr Virus Requires IMPDH2 Induction and Nucleolar Hypertrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0044023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00440-23	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 Shimizu Takatsune, Sugihara Eiji, Takeshima Hideyuki, Nobusue Hiroyuki, Yamaguchi Rui, Yamaguchi-Iwai Sayaka, Fukuchi Yumi, Ushijima Toshikazu, Muto Akihiro, Saya Hideyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Depletion of R270C Mutant p53 in Osteosarcoma Attenuates Cell Growth but Does Not Prevent Invasion and Metastasis In Vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3614 ~ 3614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11223614	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 Uetaki Megumi, Onishi Nobuyuki, Oki Yoshinao, Shimizu Takatsune, Sugihara Eiji, Sampetean Oltea, Watanabe Takashi, Yanagi Hisano, Suda Kiyoshi, Fujii Hiroya, Kano Koichiro, Saya Hideyuki, Nobusue Hiroyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Regulatory roles of fibronectin and integrin 5 in reorganization of the actin cytoskeleton and completion of adipogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 ar78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E21-12-0609	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 Shimizu Takatsune, Kimura Kiyomi, Sugihara Eiji, Yamaguchi Iwai Sayaka, Nobusue Hiroyuki, Sampetean Oltea, Otsuki Yuji, Fukuchi Yumi, Saitoh Kaori, Kato Keiko, Soga Tomoyoshi, Muto Akihiro, Saya Hideyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 MEK inhibition preferentially suppresses anchorage independent growth in osteosarcoma cells and decreases tumors in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 2732 ~ 2743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.25023	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 -



〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 信末博行, 清水孝恒, 上瀧萌, 住吉清香, 近藤由佳, 山田勢至, 塚本徹哉, 佐谷秀行
2. 発表標題 A ROCK inhibitor fasudil enhances the antitumor effects of anticancer agents against chemoresistant osteosarcoma cells
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上瀧萌, 國富晴子, 清水孝恒, サンペトラオルテア, 植野さやか, 佐谷秀行, 信末博行
2. 発表標題 Megakaryoblastic leukemia 1 acts as a regulator of the conversion of stromal cells to cancer-associated fibroblasts
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今枝慶蓉, 増田健太, 永井晋平, 田村友宏, 杉原英志, 山崎淳太郎, 大槻雄士, 信末博行, 千代田達幸, 小林佑介, 阪埜浩司, 青木大輔, 山上亘, 佐谷秀行, 永野修
2. 発表標題 Identification of biomarkers associated to poor prognosis in high-grade serous carcinoma using novel mouse models
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 信末博行, 清水孝恒, 高橋信博, 山口さやか, 杉原英志, 大西伸幸, 佐谷秀行
2. 発表標題 Therapeutic strategies based on actin cytoskeleton dynamics for targeting chemoresistant osteosarcoma stem cells
3. 学会等名 第12回 日米癌合同会議（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 信末博行, 清水孝恒, 高橋信博, 山口さやか, 杉原英志, 大西伸幸, 佐谷秀行
2. 発表標題 Inhibition of MKL1 enhances the effects of anticancer drugs in chemoresistant osteosarcoma cells
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 信末博行, 清水孝恒, 高橋信博, 山口さやか, 杉原英志, 大西伸幸, 佐谷秀行
2. 発表標題 Therapeutic strategies based on actin cytoskeleton dynamics for targeting chemoresistant osteosarcoma stem cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 治療抵抗性がん細胞制御剤及び抗がん剤の抗腫瘍作用増強剤	発明者 佐谷秀行, 信末博行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-214001	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

藤田医科大学 がん医療研究センター ホームページ <a href="https://fcc.fujita-hu.ac.jp/">https://fcc.fujita-hu.ac.jp/</a>
---

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------