

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07243

研究課題名(和文)がん細胞の浸潤・転移能獲得を決定するマスター因子の解明とその制御に基づく転移抑制

研究課題名(英文)Elucidation of master regulators that determine the acquisition of metastatic phenotype in cancer cells and suppression of metastasis based on its control

研究代表者

信末 博行(NOBUSUE, HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：90525685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨肉腫モデルにおいて、原発巣の骨肉腫では転写調節因子MKL1の発現は認められなかったが、肺転移巣では高発現することを見出した。次いで、マイクロアレイデータのエンリッチメント解析から、悪性骨肉腫細胞AXTにMKL1の発現を惹起すると、がん細胞の浸潤および転移に関わる上皮-間葉転換(EMT)やNotchシグナルの遺伝子セットがエンリッチすることが明らかとなった。また、MKL1の発現誘導によって、AXTの浸潤能、さらにはスフェア形成能が有意に増加することが分かった。以上の結果から、MKL1は骨肉腫細胞の浸潤、転移および転移巣形成の制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、アクチン細胞骨格の動態によって直接制御されるMKL1を分子標的として制御することで、これまでアプローチが困難であった転写制御シグナルを変化させ、がん細胞の転移能獲得を阻害し転移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)：We transplanted subcutaneously malignant osteosarcoma cells (AXT cells) into syngeneic C57BL/6 mice and then analyzed the expression of megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1), which is a transcriptional regulator, in primary tumors and metastatic tumors to the lung. We found that AXT cells in primary tumors did not express MKL1, whereas AXT cells in metastatic tumors to the lung highly expressed MKL1 in the nucleus. Induction of MKL1 in AXT cells resulted in a significant increase of the invasion capability and the sphere-forming activity. In addition, GSEA of the microarray data revealed that induction of MKL1 enriches gene sets associated with invasion and metastasis, such as epithelial-mesenchymal transition (EMT) and Notch signaling. These findings thus suggest that MKL1 acts as a critical factor that controls the acquisition of metastatic phenotype in osteosarcoma cells.

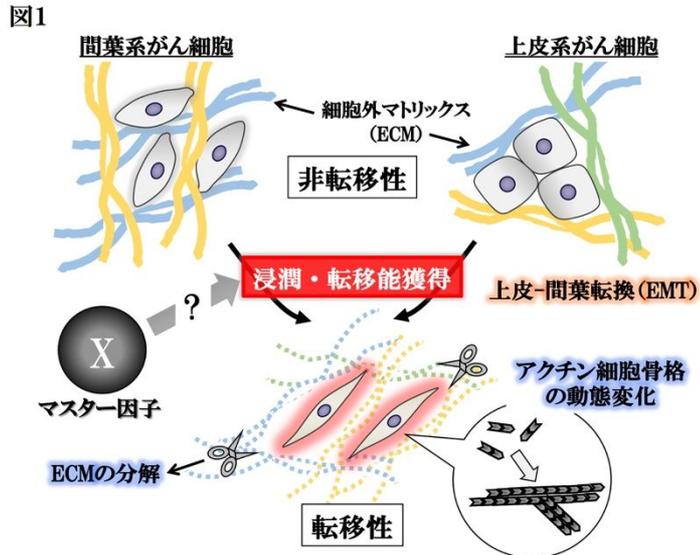
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞運動 転移 アクチン細胞骨格 骨肉腫 MKL1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

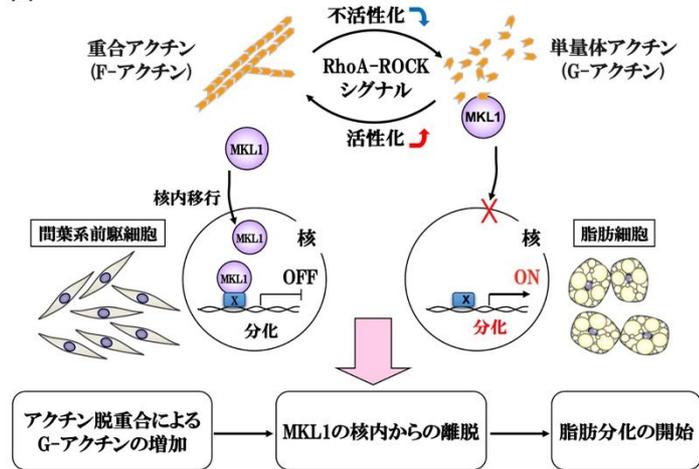
がんの悪性度を特徴づける主要な要因である転移は、がん治療の標的として最優先に上がっており、その分子メカニズムの解明と、より効果的な治療法の開発が切望されている。がん転移の成立には、がん細胞が線維芽細胞様の性質を有することが重要な条件であると考えられており、原発巣にある上皮系がん細胞は、悪性度が高まるにつれて EMT を起こし、間葉系の性質を獲得することで転移能を獲得する。転移能を得たがん細胞は、細胞周囲の ECM の分解と、細胞骨格構成要素であるアクチンの劇的な動態変化による細胞運動を協調的に行うことで、原発巣から浸潤・転移を開始する (図1: Hood and Cheresch, *Nat Rev Cancer*, 2002)。



これまでに、上皮系がん細胞の EMT を中心とした転移能獲得機構については多くの研究がなされてきたが、元々が間葉系のがん細胞の転移能獲得を決定する分子メカニズム、またその機序と EMT との関連については未だ明らかにされていない。

細胞運動性に深く関わるアクチン動態の変化は、主に Rho ファミリー G タンパク質によって制御されることが知られており、上皮及び間葉系の転移性がんにおいて RhoA の過剰発現が認められること、またそのエフェクターである ROCK の阻害が転移を抑制すること (Ito et al., *Nat Med*, 1999) が報告されており、RhoA/ROCK シグナルはがん転移のレギュレーターとして重要な役割を担っていると考えられる。研究代表者は、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)。

図2



また、研究代表者は最近、種々の間葉系細胞に MKL1 の発現を惹起すると、*in vitro* 及び *in vivo* において細胞運動性を著しく亢進させることを見出した。加えて、MKL1 の発現誘導に伴って、細胞運動の制御に関わる遺伝子群、さらには EMT の誘導に関わる TGF- β シグナル関連遺伝子群の発現が著しく増加することも分かった。これらのことは、MKL1 が間葉及び上皮系がん細胞の浸潤・転移能獲得を決定するマスター因子として働くことを強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、間葉および上皮系の非転移性がん細胞がどのような分子機構を経て、転移性表現型を獲得し転移するのか、さらには我々が見出した MKL1 がそのプロセスを制御するマスター因子として働くことを明らかにする目的で実施した。

3. 研究の方法

- (1) マウス骨肉腫モデルにおける原発巣および肺転移巣での MKL1 の発現: 研究代表者の所属する研究室でこれまでに樹立した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たのち、2~3 週後に原発巣及び肺転移巣の組織を回収し、免疫組織染色にて MKL1 の発現状況を調べた。
- (2) 骨肉腫細胞の転移能獲得に及ぼす MKL1 の機能解析: AXT 細胞にドキシサイクリン (DOX) 依存的に MKL1 を発現誘導する TetOn システム (TetOn-MKL1) を導入し、DOX 添加に伴って転移性表現型を獲得するか検討した。
- (3) 転移能獲得を制御する分子機構の解明: MKL1 の TetOn 発現誘導ベクターを導入した AXT (AXT-TetOn-MKL1) 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シグナル経路の同定を試みた。

(4) 骨肉腫細胞のスフェア形成に及ぼす MKL1 の機能解析: AXT-TetOn-MKL1 を超低接着表面マイクロプレート (Corning 社) に播種し、定常状態 (10%FCS 含有 IMDM) あるいは血清飢餓状態 (0.1%FCS 含有 IMDM) でスフェア培養を行い、Cell Titer Glo Kit (Promega 社) を用いて、細胞増殖及び生存を評価した。

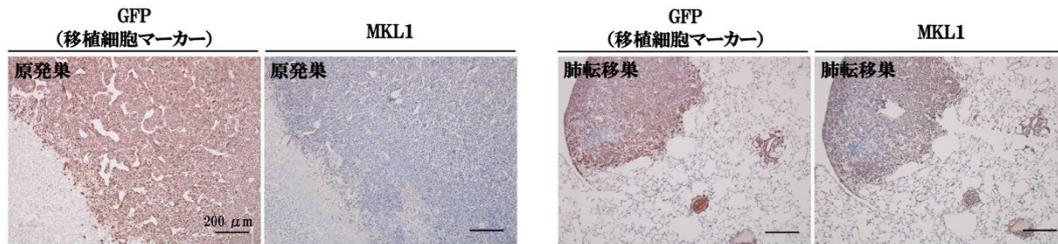
(5) 上皮系がん細胞の EMT および転移能獲得に及ぼす MKL1 の機能解析: ヒト乳がん細胞株 MCF7 に TetOn-MKL1 を導入し、DOX 添加に伴って EMT さらには転移能獲得が誘導されるか検討した。

4. 研究成果

(1) マウス骨肉腫モデルにおける原発巣及び肺転移巣での MKL1 の発現

悪性骨肉腫細胞 AXT を同系統マウスに移植したのち、原発巣及び肺転移巣での MKL1 の発現状況を解析した。その結果、移植 3 週間後で全てのマウスにて骨肉腫の形成が示され、これらのマウスのほとんどで AXT 細胞の肺転移が認められた (図 3)。また、原発巣の骨肉腫では MKL1 の発現は認められなかったが、肺転移した AXT 細胞は核内で MKL1 を高発現することを見出した (図 3)。これらの結果から、MKL1 が骨肉腫の肺転移に密接に関与することが強く示唆された。

図3



(2) 骨肉腫細胞の転移能獲得に及ぼす MKL1 の機能解析

AXT 細胞に TetOn-MKL1 発現ベクターを導入し (AXT-TetOn-MKL1) その機能解析を行った。AXT-TetOn-MKL1 は DOX 依存的に MKL1 の発現を誘導し、MKL1 と直接結合することで知られる血清応答因子の応答配列 (SRF-RE) のルシフェラーゼレポーター活性が有意に増加した (図 4)。また、MKL1 の発現誘導に伴って、標的遺伝子群 (*My19*, *Tagln*, *Mmp9*) の発現が有意に増加した (図 4)。次いで、MKL1 の発現が転移能獲得に及ぼす影響を明らかにする目的で、AXT-TetOn-MKL1 を用いてマトリゲル浸潤アッセイ (Corning 社) を実施した。その結果、AXT-TetOn-MKL1 は DOX 添加に伴って、マトリゲル浸潤能が有意に増加した (図 5)。以上の結果から、MKL1 が間葉系の骨肉腫細胞の転移能獲得の制御に関わることが明らかとなった。

図4

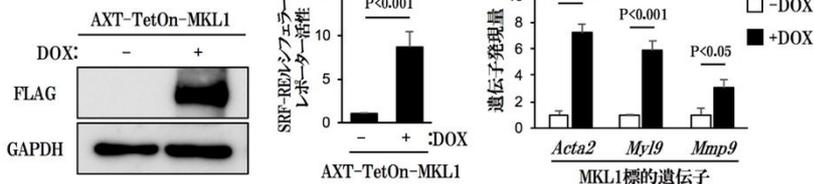
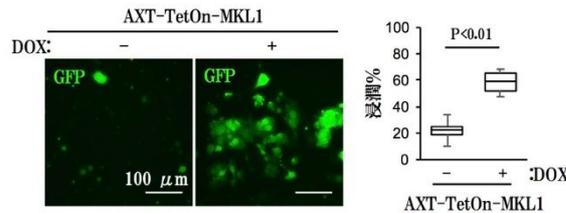


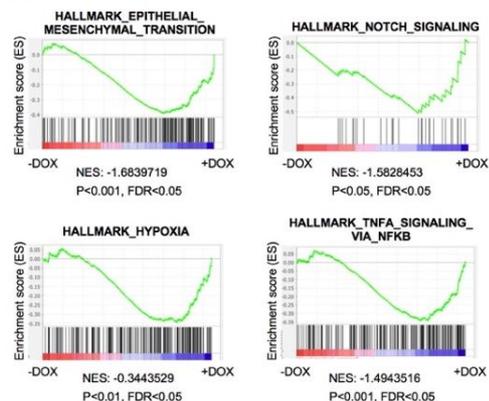
図5



(3) 転移能獲得を制御する分子機構の解明

AXT-TetOn-MKL1 を DOX 有無の条件下で培養したのち、RNA を回収し、Clariom S (Affymetrix 社) を用いてマイクロアレイ解析を実施し、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により機能解析を行った。その結果、AXT 細胞は MKL1 の発現誘導によって、EMT、Notch シグナル、TNF- シグナルおよび低酸素といったがん細胞の浸潤・転移に関連する機能がエンリッチすることが分かった (図 6)。また、MKL1 の発現誘導によって 2 倍以上発現が増加した遺伝子は 503 個であり、これら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したところ、EMT 誘導に関わる TGF- シグナルの制御因子である Smad2 および Smad3 といった転写因子に制御されることが分

図6

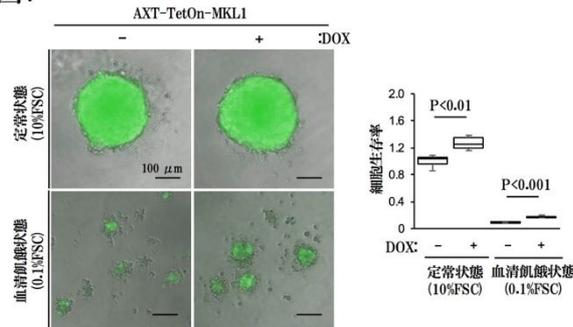


かった。これらの結果から、MKL1 は EMT 関連シグナルを動かすことで骨肉腫細胞の転移能獲得の制御に寄与することが示唆された。

(4) 骨肉腫細胞のスフェア形成に及ぼす MKL1 の機能解析

AXT-TetOn-MKL1 を DOX 有無の条件下でスフェア培養を行った。その結果、MKL1 の発現誘導に伴って、スフェア形成能は有意に増加した(図7)。また、血清飢餓(0.1%FCS)の条件下において、その効果はより顕著であった(図7)。これらの結果から、MKL1 は骨肉腫細胞の転移能獲得のみならず、転移巣形成(colonization)にも関与することが示唆された。

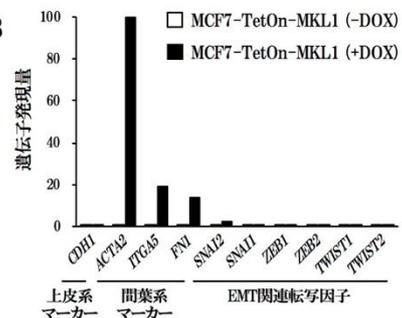
図7



(5) 上皮がん細胞の EMT および転移能獲得に及ぼす MKL1 の機能解析

最終的に、MKL1 と EMT との関連性を明確にする目的で、ヒト乳がん細胞株 MCF7 に TetOn-MKL1 発現ベクターを導入し(MCF7-TetOn-MKL1)、MKL1 の発現誘導に伴って上皮がん細胞が EMT さらには転移能獲得が引き起こされるか検討した。MCF7-TetOn-MKL1 は DOX 添加に伴って、アクチン細胞骨格を伸展させ、種々の間葉系マーカーの発現が増加した(図8)。その一方で、上皮系マーカーおよび EMT 関連転写因子の発現に変化は認められなかった(図8)。これらの結果から、MKL1 は上皮がん細胞において、間葉系細胞の表現型の獲得を促し、部分的に EMT を誘導することが示唆された。

図8



今後、TetOn-MKL1 を導入した骨肉腫細胞あるいは乳がん細胞をマウスへ移植し、浸潤および転移、さらには転移巣形成に及ぼす影響を調べることで、MKL1 が間葉および上皮系がん細胞の双方で転移能獲得を普遍的に制御するマスター因子として働くことを明確にしたい。また、上記を踏まえて、MKL1 およびアクチン動態を薬剤制御することで、がん細胞の転移能獲得を阻害し転移抑制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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kunitomi H, Oki Y, Onishi N, Kano K, Banno K, Aoki D, Saya H, 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 to 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 Takahashi N, Nobusue H, Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Onishi N, Kunitomi H, Kuroda T, 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	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 Arima Y, Nobusue H, Saya H	4. 巻 111
2. 論文標題 Targeting of cancer stem cells by differentiation therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2689-2695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14504	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 Kasuga A, Semba T, Sato R, Nobusue H, Sugihara E, Takaishi H, Kanai T, Saya H, Arima Y	4. 巻 112
2. 論文標題 Oncogenic KRAS-expressing organoids with biliary epithelial stem cell properties give rise to biliary tract cancer in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1822-1838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14703	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 T, Kimura K, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Nobusue H, Sampetean O, Otsuki Y, Fukuchi Y, Saitoh K, Kato K, Soga T, Muto A, Saya H	4. 巻 -
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 -
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 信末博行
2. 発表標題 ROCK阻害剤は化学療法抵抗性の骨肉腫細胞において脂肪細胞への終末分化を誘導し腫瘍形成性を抑制する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobusue H, Takahashi N, Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Onishi N, Kunitomi H, Kuroda T, Saya H
2. 発表標題 Therapeutic strategies for chemoresistant stemlike osteosarcoma cells by inducing terminal adipocyte differentiation based on actin dynamics
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 信末博行, 高橋信博, 清水孝恒, 杉原英志, 大西伸幸, 山口さやか, 國富晴子, 佐谷秀行
2. 発表標題 ROCK阻害剤は骨肉腫幹細胞の脂肪細胞への終末分化を誘導することで腫瘍形成性を抑制する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 信末博行, 佐谷秀行
2. 発表標題 がん幹細胞を標的としたアクチン細胞骨格動態に基づく新規治療法の開発
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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