

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16801

研究課題名（和文）肉腫における酸性環境下でのFOXM1発現と治療開発

研究課題名（英文）The expression of FOXM1 under acidic microenvironment in sarcoma and development of the treatment

研究代表者

土岐 俊一（TOKI, Shunichi）

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60837194

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）：本研究では、酸性微小環境にある軟部肉腫において、転写因子として細胞周期・増殖に関わる遺伝子を賦活化し、上皮間葉転換、細胞浸潤、血管新生やDNA損傷・修復など多面的に腫瘍進展へ関与するとされるFOXM1の高発現が明らかとなった。また酸性環境暴露の有無での網羅的解析では、FOXM1をはじめとして、細胞周期に関わる標的遺伝子PLK1、CCNB2、CDC25B、CENPF、AURKBの発現が酸性環境で著明に亢進することが示された。さらに、脂肪肉腫細胞株でFOXM1ノックダウンや阻害剤チオストレプトン処理により、酸性環境細胞ではより顕著に、細胞増殖、遊走能、浸潤能の抑制を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少がんである肉腫に対する治療薬開発は、少ない症例数やリソース、多様な組織型、企業の採算性などの理由から、今日のがん医療の重要な課題である。FOXM1は一般に悪性腫瘍において高発現で、正常の組織では一部の組織を除いてほとんど発現がなく、またその発現が予後に関与するとされている。本研究結果により、FOXM1は特に脂肪肉腫における選択的治療の標的となり得ることが示された。また、本研究のデータでも粘液線維肉腫や血管肉腫などでFOXM1高発現が認められたように、FOXM1抑制因子（がん抑制遺伝子）TP53遺伝子異常を有する症例が多い軟部肉腫においては、FOXM1標的治療法の臨床応用が強く期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found high expression of FOXM1, a transcription factor that activates genes related to cell cycle and proliferation and is involved in multiple oncogenic signaling pathway, including epithelial-mesenchymal transition, cell invasion, angiogenesis, and DNA damage repair response, in soft tissue sarcomas exposed to acidic microenvironments. In addition, comprehensive analysis comparing between acidic and neutral microenvironment showed that the expression of FOXM1, PLK1, CCNB2, CDC25B, CENPF, and AURKB was markedly upregulated in acidic microenvironment. Furthermore, FOXM1 knockdown or thiostrepton treatment of liposarcoma cell lines showed pronounced suppression of cell proliferation, migration, and invasion in especially acidic microenvironment cells.

研究分野：骨・軟部腫瘍

キーワード：FOXM1 肉腫 酸性環境 チオストレプトン 細胞周期 細胞増殖 遊走



(2) SW872 を用いた pH7.4 と pH6.4 の培養条件でマイクロアレイによる比較検討を行った結果、後者の酸性環境下で FOXM1 を含む G2M check point 関連のがん遺伝子の著明な発現亢進が認められた (図2)。

	Fold Change	pH6.4	pH7.4
<b>FOXM1</b>	41.8		
<i>PLK1</i>	139.1		
<i>CCNB2</i>	91.0		
<i>NEK2</i>	26.5		
<i>CENPF</i>	19.3		
<i>CDC25B</i>	2.1		
<i>CDC25C</i>	116.1		
<i>AURKB</i>	255.8		
<i>BIRC5</i>	116.6		

図2. SW872にけるG2M checkpoint関連のoncogeneは酸性環境で発現が亢進している。

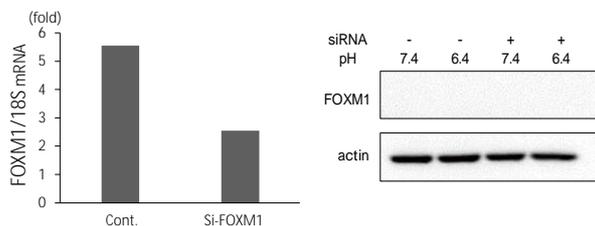


図3. RNA干渉によるFOXM1発現の確認

(3) siRNA を用いて肉腫細胞株の FOXM1 ノックダウンを行い、RT-qPCR 及びウエスタンブロッティング法にて確認した (図3)。WST-8 assay 解析を行うと、ノックダウン群で増殖抑制を認め、また興味深いことに pH6.4 の酸性環境細胞群ではより強く抑制された。さらにノックダウン群では、酸性環境で発現が更新し細胞分裂・細胞周期などの悪性化に寄与する *PLK1*、*CENPF*、*CDC25B*、*CCNB1* 遺伝子の著明な発現減少を認めた (図4)。

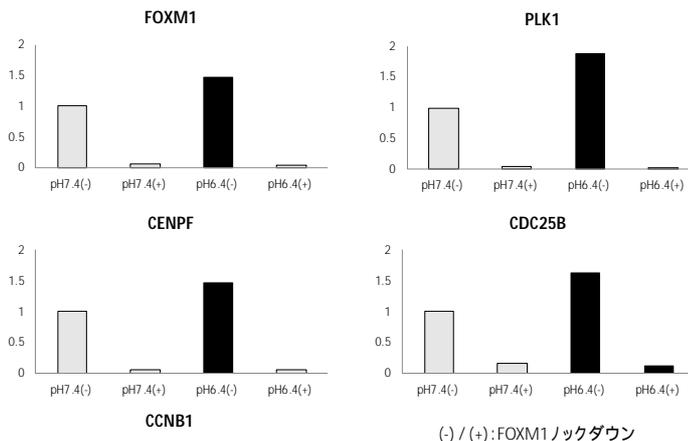


図4. 中性・酸性環境下FOXM1ノックダウン有無における遺伝子発現の変化

(4) シオマイシン A と並んで FOXM1 阻害作用を有するチアゾール抗菌薬である

Thiostrepton を用いて、SW872 に対する *in vitro* における抗腫瘍効果を解析した。RT-qPCR、Western blotting にて FOXM1 の mRNA 及びタンパクレベルでの発現抑制を確認した (図5)。酸性環境であるとより顕著に FOXM1 mRNA 発現量が低下していた。抗腫瘍効果を解析するために WST-8 assay、cell migration assay を行い、Thiostrepton 10 $\mu$ M 処理で細胞増殖、遊走能とともに有意に抑制され、抗腫瘍効果を有することが明らかとなった (図5)。

<引用文献>

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Kelleher FC and O'Sullivan H. FOXM1 in sarcoma: role in cell cycle, pluripotency genes and stem cell pathways. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42792-42804.

Bella L, Zona S, Nestal de Moraes G. FOXM1: A key oncofetal transcription factor in health and disease. *Semin Cancer Biol*. 2014 Dec;29:32-9.

Raychaudhuri P, Park HJ. FoxM1: a master regulator of tumor metastasis. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4329-33.

Kwok JM, Myatt SS, Marson CM, et al. Thiostrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jul;7(7):2022-32.

Kongsema M, Wongkhieo S, Khongkow M, et al. Molecular mechanism of Forkhead box M1 inhibition by thiostrepton in breast cancer cells. *Oncol rep*. 2019 Sep;42(3):953-962.

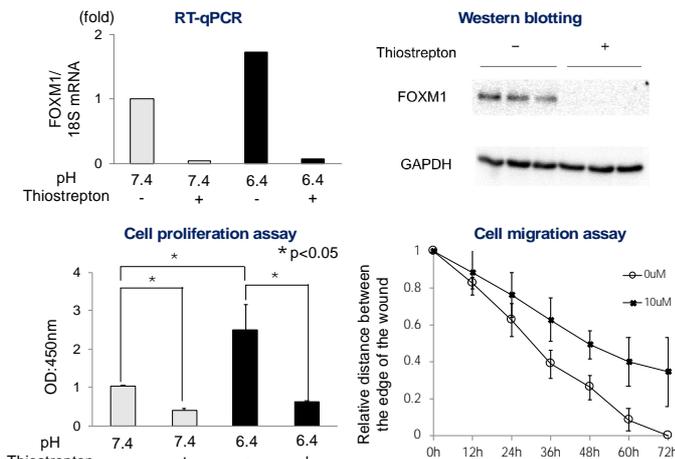


図5. 酸性環境下でのチオストレプトン処理は、強いFOXM1阻害作用を示し、脂肪肉腫細胞の増殖・遊走能を抑える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuta Furusawa, Shunichi Toki, Ryo Miyagi, Toshihiko Nishisho
2. 発表標題 Is FOXM1 an important factor for soft tissue sarcoma progression by acidic microenvironments?
3. 学会等名 徳島大学医学研究実習発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土岐俊一、宮城亮、西庄俊彦、西良浩一
2. 発表標題 FOXM1は脂肪肉腫細胞の酸性環境下での進展に重要な役割を果たす
3. 学会等名 中国・四国整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshihiko Nishisho, Shunichi Toki, Ryo Miyagi, Koichi Sairyo
2. 発表標題 Acidic microenvironment in soft tissue sarcoma promotes FOXM1 expression and tumorigenesis
3. 学会等名 The Connective Tissue Oncology Society 2020 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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