

令和元年6月13日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10161

研究課題名(和文)再プログラミング因子により誘導されるがん抑制機構の解明

研究課題名(英文) Studies for tumor suppression induced by over expression of the reprogramming factors.

研究代表者

高石 樹朗 (TAKAISHI, Mikiro)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：10303223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：再プログラミング因子(OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28)を悪性黒色腫細胞に発現させると間葉-上皮移行(MET)様の形質転換が生じた。すなわち、上皮細胞様の形態変化、メラノサイト特異遺伝子の発現減少、上皮-間葉移行関連遺伝子の発現減少等である。再プログラミング因子導入細胞をマウス尾静脈から移植すると肺での腫瘍増殖が明らかに減じた。これらの細胞ではMEK、ERK、AKTのリン酸化が減少し、これら分子の脱リン酸化に関わるPP2Aが増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫細胞に再プログラミング因子を導入することによりMET様の形質転換と悪性度の減弱が生じることを示した。これにはPP2A増加によるRAF-MEK-ERKおよびPI3K-AKTシグナル伝達経路の抑制が関与することが示唆された。これらの発見が新たながん治療につながることを期待する。

研究成果の概要(英文)：Over expression of reprogramming factors (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, and LIN28) induced mesenchymal-epithelial transition (MET) like trans-differentiation in melanoma cells. The reprogramming factors introduced cells changed their morphology to epithelial, and expression of melanocyte specific genes and EMT-related genes was suppressed in the cells. Tumorigenicity in lungs after the cell inoculation via tail vein was obviously attenuated. Dephosphorylation of MEK, ERK, and AKT, and increased PP2A were observed in the cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：がん抑制 悪性黒色腫 間葉-上皮移行

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

山中伸弥博士らによる人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作成方法が発見されて以来、これまでに様々な臓器・組織由来の細胞から iPS 細胞が作成されてきた。この iPS 細胞の作成初期過程において、間葉-上皮移行 (Mesenchymal-Epithelial transition; MET) が誘導されることが示された。この報告を受けて我々は、悪性腫瘍細胞においても iPS 細胞作成過程で MET が誘導されるのか、さらにはそれに伴ってがんの悪性度が減弱するのか検討を行った。

ヒト口腔有棘細胞癌由来ではあるが上皮性の特性を失っている細胞株に、再プログラミング因子 (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc および Lin28) を導入して安定発現細胞株を樹立した (Reprogramming factors introduced cells; RICs)。その RICs は、明らかな上皮様細胞への形態変化、各種上皮系マーカーの増加および間葉系マーカーの減少などの特徴が確認された。また、RICs の細胞運動能および浸潤能の低下が *in vitro* で示された。ヒト有棘細胞癌由来である OSC-19 細胞より樹立した RICs は、ヌードマウスの舌に移植すると、舌での腫瘍形成能、所属リンパ節への転移能が、親細胞と比して有意に減弱した。すなわち、再プログラミング因子を導入された腫瘍細胞は MET が誘導され、がん悪性度が減弱した。

## 2. 研究の目的

我々は、iPS 細胞作成に用いられる再プログラミング因子を悪性腫瘍細胞に導入することにより、MET が誘導されてがん悪性度が減弱化することを見いだした。悪性黒色腫は皮膚科領域において最も悪性度が高い腫瘍である。この悪性黒色腫においても再プログラミング因子の導入により MET 誘導と悪性度の減弱化が起こるのか、マウスおよびヒト由来の悪性黒色腫細胞を用いて検討を行った。有棘細胞がんと同様に悪性黒色腫細胞においても MET 誘導と悪性度の減弱化が起これば、これらの比較検討により悪性度減弱化の分子基盤が明らかになる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### [1] 悪性黒色腫細胞由来 RICs の作成

ヒト由来 A2058 細胞とマウス由来 B16/BL6 (B16) はそれぞれ JCRB 細胞バンクとバイオリソースセンターより提供を受けた。ヒトあるいはマウスの OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、LIN28 を発現するトランスポゾンベクターをこれらの細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンにより遺伝子導入細胞を選別して RICs を得た。培養は DMEM / 10%FBS で行った。

### [2] 悪性黒色腫細胞由来 RICs の MET に関する評価

RICs およびその親細胞から total RNA を抽出し、cDNA 合成を行い RT-PCR により遺伝子発現の検討を行った。各細胞から RIPA バッファーにて細胞溶解液を調製しウェスタン解析を行った。細胞をチャンバースライドで培養して、細胞免疫染色に用いた。

### [3] 悪性黒色腫細胞由来 RICs の悪性度の評価

*In vitro* での細胞増殖は培養皿内の細胞数を経時的に数えた。移動能はスクラッチアッセイにより評価した。浸潤能はマトリジェルを塗布したポイデンチャンバーに細胞を播種して、多孔支持膜を通過した細胞を染色してその数を数えた。*In vivo* での評価ではマウス尾静脈からの細胞移植後の肺における腫瘍形成を確認した。A2058 親細胞

と A2058RICs は、 $1 \times 10^6$  個の細胞を 8 週齢 SCID マウスの尾静脈より移植された。呼吸困難や消瘦、その他の全身状態の悪化が見られた際は安楽死処分とした。何ら症状を示さないマウスは移植後 90 日で安楽死処分した。B16 親細胞と B16RICs は 8 週齢 C57BL/6 マウス尾静脈より  $1 \times 10^6$  個を移植され、移植後 14 日目にマウスは安楽死処分された。胸腔および腹腔内の臓器に異常が無いか肉眼的に観察された。摘出した臓器はホルマリンで固定した後に組織切片を作成し、H&E 染色および免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### [1] RICs における MET 様形質転換

悪性黒色腫細胞由来 RICs は、いずれも多角形で敷石状になり、上皮細胞様の形態に変化した。メラノサイトを特徴付ける遺伝子 MLANA, MITF, TYR, KIT, SOX9 などの発現が RICs において著しく減少した。また、A2058 由来の RICs では EMT 関連遺伝子である SNAI2, ZEB2, TWIST1 の発現が減少した。RICs におけるこれら分子の減少はウエスタン解析ならびに細胞免疫染色によりタンパク質レベルでも確認された。形態の変化および分子発現の変化から、悪性黒色腫細胞由来 RICs では MET 様の形質転換が起こったことが示唆された。しかしながら、どのような細胞系譜へ形質転換したのかは不明である。

##### [2] RICs の悪性度評価

*In vitro* での細胞増殖は A2058 細胞および B16 細胞の親細胞と RICs の間で変化はなかった。*In vitro* 浸潤活性は両細胞ともに RICs で減弱した。*In vitro* 細胞移動能は A2058 細胞では RICs で減少したが、B16 RICs で増加した。*In vitro* での細胞増殖能に変化がなく、移動能および浸潤能が減少した結果は、以前の SCC 細胞を用いた研究で得られた結果に一致する。

マウスへの細胞移植実験では、A2058 親細胞を移植されたマウスは移植後 53 日目までに呼吸困難と著しい衰弱を呈し安楽死処分となった。これらのマウスの肺には多数の腫瘍が認められた。A2058RICs を移植されたほとんどのマウスは移植後 90 日まで生存した。B16 親細胞を移植されたマウスの肺には多数の腫瘍を認めたが、RICs を移植されたマウスの肺には肉眼的に観察される腫瘍は存在しなかった。これらの結果は悪性黒色腫細胞由来 RICs はその親細胞と比較して悪性度が著しく減弱した事を示す。

##### [3] RICs におけるシグナル伝達経路の変化

RAF-MEK-ERK シグナル伝達経路および PI3K-AKT シグナル伝達経路の異常が悪性黒色腫細胞の増殖に関わると考えられている。悪性度が減弱した RICs において、これらシグナル伝達経路に変化が生じているのかウエスタン解析により検討を行った。A2058RICs においてリン酸化 MEK (S217)、リン酸化 ERK (T202) リン酸化 AKT (S473 および T308) が明らかに減少していた。RICs において MEK, ERK, AKT の脱リン酸化を亢進させる分子機構を探索したところ、これら分子の脱リン酸化に関わるフォスファターゼである PP2A の A および B サブユニット発現が増加していた。MEK, ERK, AKT の脱リン酸化亢進と PP2A の増加は、B16RICs および SCC 由来である HOC313 の RICs でも確認された。これらの変化は再プログラミング因子導入により生じた変化であり、悪性度の減弱化に関わっている可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Transdifferentiation of Melanoma Cells by the Reprogramming Factors Attenuates Malignant Nature In Vitro and In Vivo.  
Mikiro Takaishi, and Shigetoshi Sano  
J Invest Dermatol. 2019 Jan;139(1):254-257. doi: 10.1016/j.jid.2018.06.179.  
査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 再プログラミング因子による分化転換は悪性黒色腫細胞の悪性度を減少させる  
高石樹朗、佐野栄紀  
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018
- ② Forced expression of the reprogramming factors leads to benignancy in melanoma through MET-like transdifferentiation and normalization of MARK and AKT pathways.  
Mikiro Takaishi, and Shigetoshi Sano  
International Investigative Dermatology, Orland, Florida, USA, 2018
- ③ The reprogramming factors introduced melanoma cells lose malignant nature in vitro and in vivo.  
Mikiro Takaishi, and Shigetoshi Sano  
The 42nd Annual Meeting of JSID, Kochi, JAPAN, 2017
- ④ Transdifferentiation of melanoma cells by the reprogramming factors lose malignant nature in vitro and in vivo.  
Mikiro Takaishi, and Shigetoshi Sano  
The 47th Annual ESDR Meeting, Salzburg, AUSTRIA, 2017

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：佐野 栄紀

ローマ字氏名：SANO, Shigetoshi

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：教授

研究者番号（8 桁）：80273621

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。