

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18426

研究課題名(和文)アクチン動態の制御に基づくがん幹細胞の分化転換誘導治療法の開発

研究課題名(英文)Therapeutic strategies for cancer stem cells by regulating cellular differentiation based on actin dynamics

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫幹(OSi)細胞において、間葉系幹細胞の性質を有するA0細胞は抗癌剤(アドリアマイシン及びシスプラチン)に対して高い抵抗性を示した。抗癌剤耐性のA0細胞にROCK阻害薬のFasudilを単剤投与すると、アクチン細胞骨格の動態変化を介して転写調節因子のMKL1の核移行及び転写が抑制され、脂肪細胞への終末分化が誘導された。またFasudilはin vitro及びin vivoでのA0細胞の腫瘍形成性を抑制した。以上の結果から、抗癌剤耐性のA0細胞のアクチン細胞骨格の動態を制御することで、脂肪分化転換を誘導し腫瘍抑制できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma-initiating (OSi) cells are composed of two distinct types: A0 cells, which have characteristics similar to mesenchymal stem cells, and AX cells, which have those similar to osteo-chondro progenitor cell and highly tumorigenic. We found that A0 cells are highly resistant to chemotherapeutic agents, such as adriamycin and cisplatin. Treatment with the ROCK inhibitor fasudil alone induced remodeling of the actin cytoskeleton and inactivation of the transcriptional coactivator MKL1, resulting in the terminal adipocyte differentiation of chemoresistant stem-like A0 cells. Furthermore, fasudil significantly suppressed in vitro growth and in vivo tumorigenesis of A0 cells. Our findings suggest that induction of trans-differentiation by regulating actin cytoskeleton dynamics is a potential approach for chemoresistant stem-like OS cells.

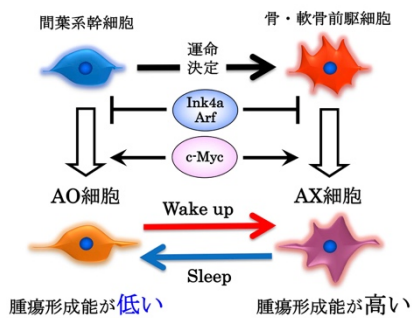
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：分化制御 アクチン細胞骨格 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

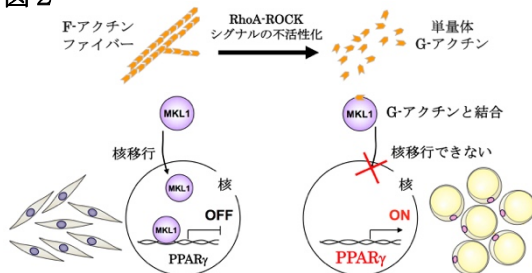
特定の遺伝子に配偶子変異がある個体は、全身の細胞でその変異が存在するにも関わらず、特定の細胞においてのみ病的な性質が発現する。即ち、疾患を誘発するゲノムやエピゲノムの変化は、その細胞のコンテキストに依存して病的形質を誘導するものであり、逆にそのコンテキストを完全に転換することで、病的な状況を回避できる可能性が考えられる。我々の研究室では、これまでに *Ink4a/Arf* ノックアウトマウスに由来する骨髄間質細胞に *c-MYC* を過剰発現させることで、人工骨肉腫幹 (iOS) 細胞を樹立したことを報告してきた (Shimizu et al., *Oncogene*, 2010)。また、iOS 細胞の性状解析によって、腫瘍形成能が高く骨・軟骨前駆細胞の性質を有する AX 細胞と、腫瘍形成能が低く間葉系幹細胞の性質を有する AO 細胞の2種類から構成されることが分かった。さらに、AO 細胞は脂肪分化能を喪失し AX 細胞化することで骨肉腫形成することを見出し、癌幹細胞の分化系譜を転換させることで、腫瘍抑制を導ける可能性が示唆された (図1)。

図1



細胞は、特定の転写因子を活性化し、その他の転写因子を抑制することによって特定の細胞系譜へ運命決定されると考えられており、前駆細胞から脂肪細胞へと分化する時には、*PPAR $\gamma$*  の発現が重要である。他方、細胞は分化に伴ってアクチン細胞骨格を再構成し、機能細胞に特徴的な形態へと変化することが知られている。そのため、分化シグナルがアクチン細胞骨格を動かして細胞の形を決定しているであろうと漠然と信じられてきた。研究代表者らは、*RhoA-ROCK* シグナルの不活化によるアクチン細胞骨格の動態変化が、*MKL1* という転写調節因子を直接制御することで、*PPAR $\gamma$*  の発現を ON にし、脂肪細胞への分化を誘導することを見出し、報告した (図2; Nobusue et al., *Nat Commun*, 2014)。

図2



2. 研究の目的

本研究は、転写制御異常が癌の主たる原因であるにも関わらず、転写因子あるいは転写制御シグナルを標的とした薬剤が見出されていない現状において、独自の知見に基づき、アクチン細胞骨格の動態を薬剤制御することで転写を調節し、それによって癌幹細胞の分化系譜を転換することで腫瘍抑制するという新たな治療法 (分化転換治療法) を開発するとともに、その分子メカニズムの解明を目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) アクチン動態作動性薬剤による AO 細胞の脂肪分化転換誘導効果の検討: 間葉系幹細胞様の AO 細胞において、種々のアクチン動態作動性薬剤 (*Rho* 阻害剤 CT-04、*ROCK* 阻害剤 Y-27632 及び *Fasudil*、アクチン重合阻害剤 *Latrunculin A*) の単剤投与を行い、アクチン細胞骨格の動態変化、脂肪分化マーカーの mRNA 及びタンパクレベルでの発現状況について検討した。同時に、AO 細胞の *in vitro* での増殖抑制効果についても解析した。

(2) リード化合物による *in vivo* での腫瘍抑制効果の検討: GFP 標識した AO 細胞を同系統の C57BL/6 マウスに皮下移植したのち、上記の *in vitro* 実験において、AO 細胞の脂肪分化転換を効果的に誘導した化合物 (リード化合物) 及び生理食塩水 (コントロール群) をそれぞれ腹腔内投与し、腫瘍形成能への影響を検討した。また、リード化合物が *in vivo* においても脂肪分化転換を誘導するか調べた。

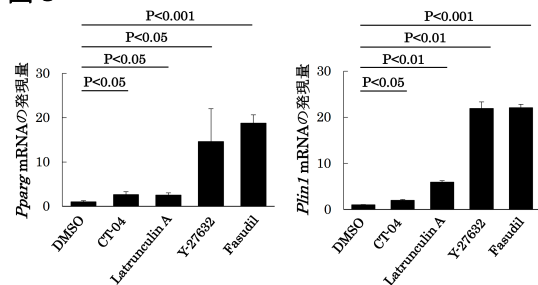
(3) 脂肪分化転換を制御する主転写因子の同定: リード化合物の単剤投与により脂肪分化転換が誘導された AO 細胞において、発現変動した遺伝子セットを DNA マイクロアレイ及び *Bioinformatics* を駆使して明らかにし、その発現を制御する主転写因子の同定を試みた。また、我々が見出した *MKL1* の脂肪分化転換への関与についても併せて検討した。

(4) リード化合物と抗癌剤との併用による腫瘍抑制効果の検討: リード化合物と骨肉腫の化学療法に用いられる抗癌剤 (アドリアマイシン、シスプラチン) を併用することで、親株である iOS 細胞においても脂肪分化転換を誘導し腫瘍抑制できるか検討した。

4. 研究成果

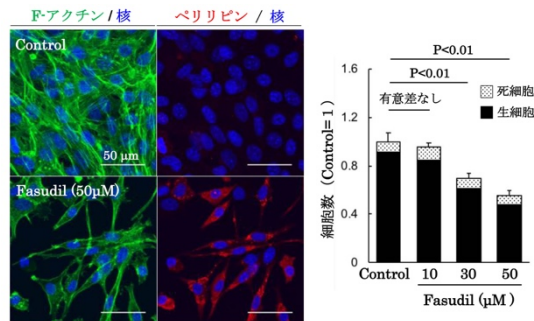
(1) アクチン動態作動性薬剤による AO 細胞の脂肪分化転換誘導

図3



間葉系幹細胞様の AO 細胞において、種々のアクチン動態作動性薬剤を単剤で投与した。その結果、Rho 阻害剤 CT-04、ROCK 阻害剤 Y-27632 及び Fasudil さらにはアクチン重合阻害剤 Latrunculin A を添加すると、単剤投与で脂肪分化特異的遺伝子の発現が有意に増加した (図 3)。検討した化合物の中で、Fasudil が脂肪分化転換の効果が最も高いことを見出し、Fasudil をリード化合物として取得できた。また、Fasudil の単剤投与によって、アクチン細胞骨格の再構築を促し、脂肪細胞マーカーであるペリリピンを発現させ終末分化を誘導することに成功した (図 4)。さらに、Fasudil の単剤投与は、AO 細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、細胞周期を G0 期で停止させた (図 4)。これらの結果から、Fasudil は AO 細胞の脂肪分化転換を誘導することで増殖を抑制することが示唆された。

図 4



(2) リード化合物 Fasudil による in vivo での腫瘍抑制効果

上記の実験において、リード化合物として見出した Fasudil が in vivo において AO 細胞の腫瘍形成性を抑制できるか検討した。その結果、Fasudil 投与群では Control 群と比較して、腫瘍体積の増加を有意に抑制した (図 5)。さらに、移植 35 日後に形成した腫瘍を回収し、組織学的に解析を行ったところ、Fasudil 投与群では、in vitro と同様に AO 細胞を脂肪細胞へと分化転換誘導することが明らかとなった (図 6)。

図 5

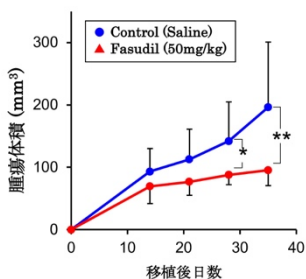
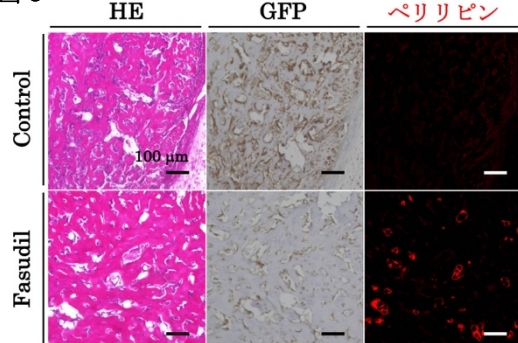


図 6

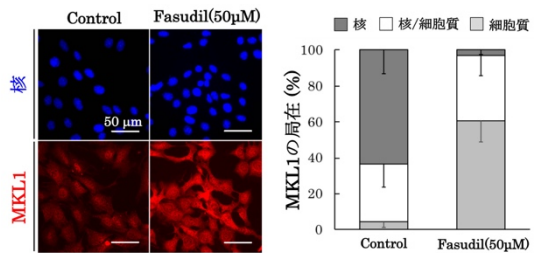


なお、Control 群と Fasudil 投与群では、体重の増減に差はなく、肝臓の組織変化も認められなかった。以上の結果から、Fasudil は間葉系幹細胞様の AO 細胞を脂肪分化転換させることで腫瘍抑制することが示唆された。

(3) 脂肪分化転換を制御する主転写因子の同定

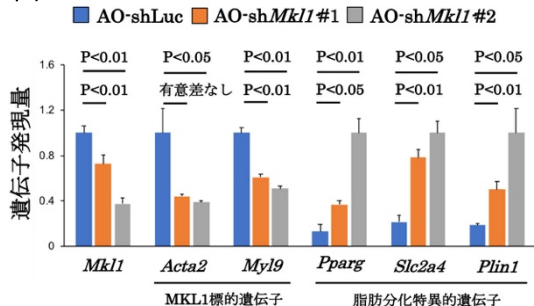
ROCK 阻害剤 Y-27632 を単剤投与した間葉系幹細胞のマイクロアレイデータを用いて、発現変動した遺伝子セットを同定し、その発現を制御する転写因子を探索した。その結果、Y-27632 投与によって発現変動した遺伝子セットは、SRF、JUN 及び NFκβ といった転写因子によって制御されることが分かった。また、これらの転写因子はいずれも MKL1 と相互作用することが知られており、ROCK 阻害剤による AO 細胞の脂肪分化転換に MKL1 が関与する可能性が強く示唆された。次いで、リード化合物の Fasudil が MKL1 の局在及び転写制御に関わるか調べた。その結果、AO 細胞に Fasudil を単剤投与すると、MKL1 の核移行が顕著に阻害された (図 7)。さらに、Fasudil 投与によって、MKL1 標的遺伝子である *Myl9* 及び *Acta2* の発現量が有意に減少することも分かった。即ち、Fasudil は AO 細胞において MKL1 の核移行及び転写を抑制することが示唆された。

図 7



次いで、AO 細胞における MKL1 発現を shRNA によってノックダウン (KD) した。その結果、MKL1 の KD によって、*Mkl1* 及びその標的遺伝子の発現量は有意に減少し、一方で種々の脂肪分化特異的遺伝子群 (*Pparg*, *Slc2a4* 及び *Plin1*) は有意に発現増加することが分かった (図 8)。

図 8



以上の結果から、リード化合物の Fasudil は、アクチン細胞骨格の動態変化を介して MKL1 の核移行及び転写を抑制することで、AO 細胞の脂肪分化転換を誘導するという分子メカ

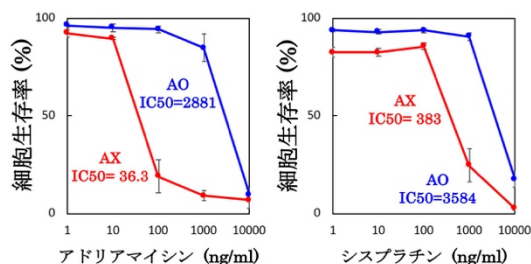


ニズムが明らかとなった。

(4) リード化合物と抗癌剤との併用による腫瘍抑制効果

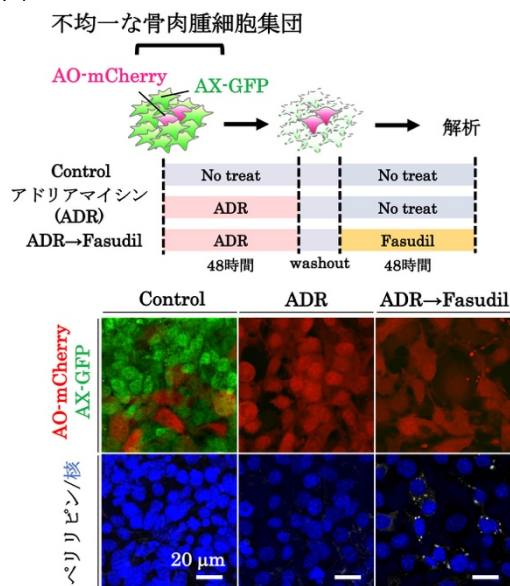
iOS 細胞を構成する AO 細胞と AX 細胞において、骨肉腫の化学療法に用いられる抗癌剤（アドリアマイシン、シスプラチン）を単剤投与した。その結果、AX 細胞はこれらの抗癌剤に対して高い感受性を示し、一方で AO 細胞は抵抗性を示した（図 9）。

図 9



次いで、臨床応用を想定して、アドリアマイシン（ADR）と Fasudil の併用効果について検討した。mCherry 標識した AO 細胞と GFP 標識した AX 細胞を混合し、不均一な骨肉腫細胞集団を構築した。これらの細胞集団に対して、まず ADR を投与すると、ほぼ全ての AX 細胞が駆逐されて、AO 細胞のみが生存した（図 10）。次いで、Fasudil を投与すると、残存した AO 細胞において効果的に脂肪分化転換を誘導することを見出した（図 10）。以上の知見に基づいて、ADR と Fasudil の逐次投与は、不均一な骨肉腫の根治を目指す上で有効な治療になりうると考える。

図 10



今後、ADR と Fasudil の逐次投与が、不均一な骨肉腫細胞群に対して *in vivo* で脂肪分化転換を誘導し腫瘍形成性を抑制することができるか検討するとともに、ヒト骨肉腫細胞においても抗腫瘍効果を有するか明確にすることで臨床応用に繋げていきたい。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. Harigai R, Sakai S, Nobusue H, Hirose C, Sampetean O, Minami N, Hata Y, Kasama T, Hirose T, Takenouchi T, Kosaki K, Kishi K, Saya H, Arima Y, Scientific Reports, 査読有、8、2018、6069、doi: 10.1038/s41598-018-24484-y.
2. Kamel WA, Sugihara E, Nobusue H, Yamaguchi-Iwai S, Onishi N, Maki K, Fukuchi Y, Matsuo K, Muto A, Saya H, Shimizu T、Simvastatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells: A Key Role of RhoA-AMPK/p38 MAPK Signaling in Antitumor Activity、Molecular Cancer Therapeutics、査読有、16、2017、182-192、doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0499

〔学会発表〕（計 4 件）

1. Nobusue H, Takahashi N, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Chiyoda T, Akashi K, Kano K, Saya H、Therapeutic strategies for osteosarcoma stem cells by regulating adipocyte differentiation based on actin dynamics、American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017
2. 信末博行、アクチン細胞骨格の動態変化が脂肪細胞分化を制御する分子機構の解明、日本遺伝学会第 88 回大会、2016 年
3. Nobusue H, Takahashi N, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Chiyoda T, Akashi K, Kano K, Saya H、Therapeutic strategies for osteosarcoma stem cells by regulating adipocyte differentiation based on actin dynamics、The 14<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium、2016 年
4. Kamel AW, Sugihara E, Yamaguchi S, Nobusue H, Maki K, Muto A, Saya H, Shimizu T、Statins induce apoptosis in osteosarcoma cells by activation of Ampk and p38 via suppression of mevalonate pathway、American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

[その他]  
ホームページ等  
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  
(<http://genereg.jp/index.html>)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし