

科学研究費助成事業 研究成果報告書

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 古くから悪性腫瘍組織においては微小酸性環境が形成されていることが知られている (Warburg effect)。近年、この酸性環境が細胞の増殖、浸潤、転移などの腫瘍進展に影響することが報告されている。

(2) 非上皮性悪性腫瘍である肉腫の治療は、近年の治療法の発達に伴い革新的な進歩を遂げ、生存率や四肢 (患肢) 温存率が上昇した。一方で肉腫に対する薬物治療は数種類の薬剤に限られ、薬物療法効果不良例、切除困難例、遠隔転移例に対する臨床成績はいまだ不良で、新規治療の開発は最重要課題である。過去に肉腫と酸性環境について述べた報告はなく、肉腫の新たな治療標的として酸性環境は着目に値すると考えられる。

(3) 本研究の先行実験において、悪性軟部腫瘍 (肉腫)、良性軟部腫瘍、及びコントロールとして骨格筋や脂肪の正常組織の臨床検体を pH メーターで測定したところ、肉腫組織内では微小酸性環境を呈していることが明らかとなった。次に酸性環境が肉腫に与える影響を検討するため、pH6.4 と pH7.4 で調整した培地で脂肪肉腫細胞株 SW872 を培養したところ、pH6.4 の酸性培地で細胞増殖能、浸潤能が促進された。また、ゼラチンザイモグラフィを行うと、酸性環境下では中性環境下と比較して細胞浸潤能に関与する MMP9 の発現が高いという結果が得られた。いくつかの組織亜型の肉腫臨床検体から mRNA を採取し、RT-qPCR を用いて良性軟部腫瘍と比較したところ、肉腫において有意に *FOXM1* の発現が高かった。そこで、SW872 を用いて、pH6.4 および pH7.4 に振り分けて培養し解析したところ、mRNA ならびにタンパクレベルともに、pH6.4 で有意に *FOXM1* の発現が高かった。以上のことから肉腫では酸性環境を呈する。酸性環境は脂肪肉腫細胞株 (SW872) において増殖能、浸潤能を増強させ腫瘍の進展を促進する。肉腫では良性軟部腫瘍と比較して *FOXM1* の発現が有意に高く、特に酸性環境下では *FOXM1* 発現が亢進するという結果を得ていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、酸性環境において腫瘍進展を促進させる因子を網羅的に探索して同定し、酸性環境が肉腫に与える影響を明らかにする。

(2) 先行研究により、低酸素ストレス下における固形癌で HIF-1 alpha を介した高発現が明らかとなっていた *FOXM1* は、一般的に転写因子として細胞増殖に関わる遺伝子を賦活化する他、癌細胞の複数の特性に寄与することが知られている。したがって *FOXM1* 阻害は、新たな治療戦略の可能性として近年注目されてきている。この *FOXM1* の肉腫細胞増殖・腫瘍進展への影響を解析し、新規治療薬・治療法開発の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 軟部腫瘍の臨床検体を用いて、微小酸性環境に関与する遺伝子の網羅的発現解析、パスウェイ解析を行った。

(2) *FOXM1* は 12 番染色体に存在することから、軟部肉腫のうち、*FOXM1* との関連が示唆されている脂肪肉腫細胞株 SW872 を用いて、酸性環境暴露による遺伝子発現解析を行った。

(3) 肉腫細胞株において、*FOXM1* ノックダウン処理を行い発現量の変動を来す分子の解析を行った。

(4) 肉腫細胞株において、*FOXM1* 特異的阻害剤処理による抗腫瘍効果を解析した。

	Fold Change	P-Value	Malignant					Benign							
			DDL1	DDL2	DDL3	DDL4	DDL5	MLS1	MLS2	PLS1	PLS2	LP1	LP2	LP3	LP4
<i>FOXM1</i>	37.6	0.0000													
<i>PLK1</i>	9.7	0.0001													
<i>CCNB2</i>	38.2	0.0000													
<i>NEK2</i>	30.9	0.0000													
<i>CENPF</i>	28.6	0.0000													
<i>CDC25B</i>	3.0	0.0036													
<i>CDC25C</i>	28.0	0.0000													
<i>AURKB</i>	20.0	0.0000													
<i>BIRC5</i>	43.9	0.0000													

DDL1: Dedifferentiated liposarcoma, MLS: Myxoid liposarcoma, PLS: Pleomorphic liposarcoma, LP: Lipoma

図1. 悪性腫瘍 (肉腫) 群で G2M checkpoint に関わる oncogene の発現亢進を認める。

4. 研究成果

(1) 脂肪系腫瘍の臨床検体、即ち良性腫瘍の脂肪腫と脱分化型、粘液型、多形型脂肪肉腫を含む悪性腫瘍とでマイクロアレイを行ったところ、*FOXM1* の発現が悪性群で 37.6 倍と有意に亢進していた (図 1)。また、*FOXM1* 標的遺伝子 *PLK1* (細胞周期 G2/M transition 及び M 期関連遺伝子)、*CCNB2*、*CDC25B* (以上、G2/M transition)、*CENPF*、*AURKB* (以上、M 期) の発現が著明に亢進していることが明らかとなった (図 1)。特に *PLK1* は *FOXM1* に対して活性化因子としても知られており、positive feedback が示唆された。パスウェイ解析 GSEA にて比較したところ、細胞周期に関わる G2M check point gene set が有意に最上位に挙がった。

(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
FOXM1	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。

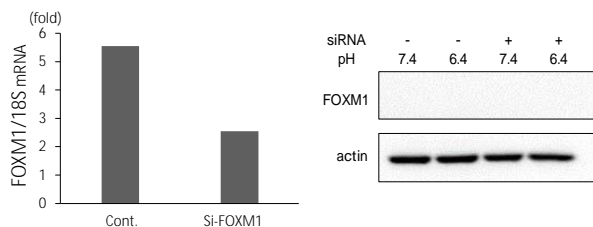


図3. RNA干渉によるFOXM1発現の確認

(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)。

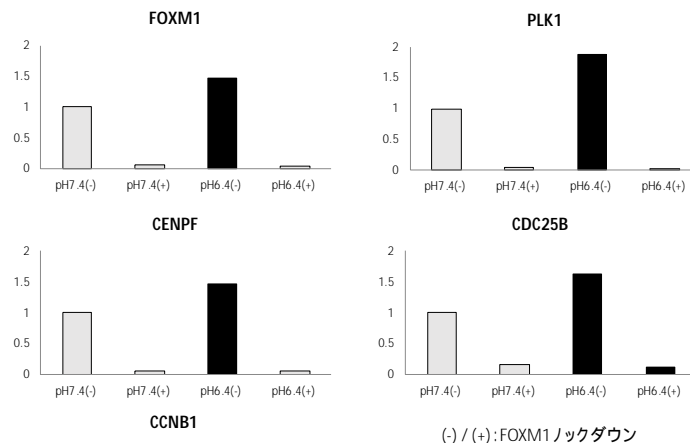


図4. 中性・酸性環境下FOXM1ノックダウン有無における遺伝子発現の変化

(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 μ 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.

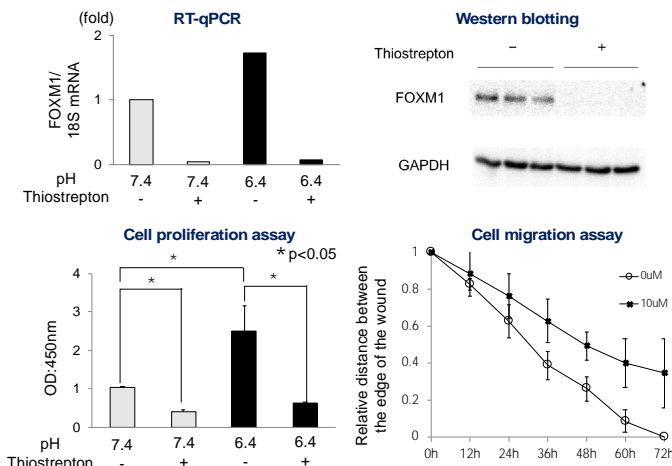


図5. 酸性環境下でのチオストレプトン処理は、強いFOXM1阻害作用を示し、脂肪肉腫細胞の増殖・遊走能を抑える。

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