

1. 研究の背景と目的

近年、がんを含む様々な疾患は細胞の足場となる細胞外マトリックス (ECM) の物理的性質 (メカニカルストレス) の変化に伴い発症ならびに進行が制御されることが明らかになっている [1, 2]。足場の硬化は、細胞接着分子インテグリンにより感知され、フォーカルアドヒージョンタンパク質および Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho・Rac・Cdc42 など) を介してアクチンの重合を促進する (図 1)。また、足場の硬化は細胞間接着にも影響を及ぼす。カドヘリン複合体に張力がかかると、アダプタータンパク質 α カテニンの構造が変化し、その結果ビンキュリンが α カテニンに結合し、アクチン重合を誘導する。アクチン分子は、細胞運動のみならずシグナル分子の活性や転写因子 SRF や STAT3 また TEAD による遺伝子発現に影響を及ぼすことにより、細胞の形質は変化する。足場の硬化は、これらの制御を介してがん細胞の転移を促進することが示唆されている。一方で、抗がん剤感受性に及ぼす影響については、ほとんど解析されていない。

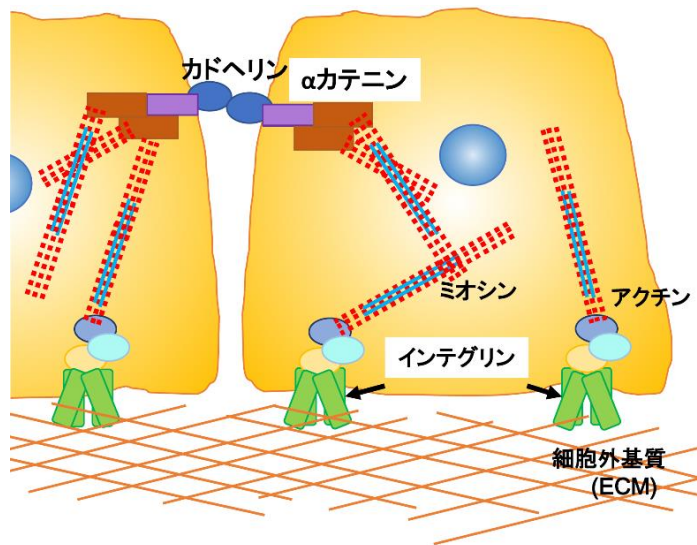


図1 細胞外の硬さを感知する細胞内分子

抗がん剤耐性機構の主な要因の一つにがん抑制遺伝子 p53 の不活性化がある。p53 は、抗がん剤などの DNA 損傷刺激で活性化され、さまざまな標的遺伝子の発現を介して細胞増殖の停止やアポトーシスを誘導する。しかし、遺伝子変異などに起因して p53 が不活性化すると、抗がん剤感受性は減弱化する [3]。足場環境を感知する細胞内シグナルは、細胞の接着や増殖に関与することから、足場環境が p53 の活性に影響を及ぼし抗がん剤感受性を変化させているのではないかと考えた。そこで、本研究ではヒト乳がん由来 MCF7 細胞を、乳がん組織の硬さと類似した弾性率 2 kPa の基板または 30 kPa の基板上で培養し、抗がん剤がん剤 Doxorubicin (DOXO) に対する感受性および p53 活性化の比較を行った。

2. 研究方法・研究内容

2-1 細胞培養および ACA ゲルの調整

MCF7 細胞は、5%CO₂ 存在下において 10%仔牛血清を含むダルベッコ・イーグル培地 (DMEM) 中で培養した。弾性率 2 kPa および 30 kPa の培養基板ゲル (ACA ゲル) の作成は、以前調整した方法で行った [4]。簡潔に述べると、6-アクリルアミドヘキサン酸とアクリルアミド、ビスアクリルアミドの混合比を調節した溶液に APS と TEMED を加えて重合させた。重合したゲルは、PBS で膨潤した後、MES で洗浄し、1 M NHS と 0.4 M WSC で反応させた。次に、60%メタノールで反応させ、0.005%ゼラチンでコートした。0.5M エタノールアミンで反応させた後、50 mM HEPES バッファーおよび PBS で洗浄した。ゲルを UV で照射した後に、培地で膨潤したものを培養基板ゲルとして用いた。

2-2. リアルタイムPCR法

細胞からRNAを抽出し、cDNAを作成した。*p21*および*ubiquitin*遺伝子の発現量は、SYBR Greenを用いたリアルタイムPCR法で解析した。それぞれのプライマーの配列は、以下に示す通りである。Human *p21* forward 5'-GGCTTCATGCCAGCTACTT-3', reverse 5'-CCCTAGGCTGTGCTCACTTC-3', human *ubiquitin* forward 5'-TGACTACAACATCCAGAA-3', reverse 5'-ATCTTGCCTTGACATTC-3'。

2-3. 核タンパク質調整とウェスタンブロット法

核タンパク質の調整は、以前と同様の方法で行った[5]。核タンパク質をSDS-PAGEにかけた後、PVDF膜に転写した。1次抗体として抗p53抗体 (D01: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) または抗HDAC1抗体 (2E10: Merck Millipore)、2次抗体にHRP標識抗体を用い、化学発光により検出した。

2-4. F-アクチン構造の解析

2 kPaの基板ゲル上で培養した細胞に、Lifeact-GFP (F-アクチン結合ペプチド融合 GFP) とコントロールプラスミドまたは p53 発現プラスミドをコトランスフェクションし、24 時間後 DOXO (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で処理した。16 時間後、4%ホルムアルデヒド/PBS (0.1 M HEPES バッファー) を用いて室温で固定した。DAPI を含むマウンティング液 (Vector Laboratories) を用いてマウントし、共焦点顕微鏡 (LSM700, Zeiss) で観察した。

3. 研究成果

細胞を 2 kPa と 30 kPa の基板上で培養し、DOXO で 24 時間処理した。生細胞数を比較すると、DOXO 処理で減少する細胞の割合は、30 kPa の基板上で培養した細胞のほうが 2kPa で培養した細胞に比べ高かった (図 2)。一方、p53 をノックダウンした細胞では差が見られなかった。低ストレス状態では、p53 は E3 リガーゼ Mdm2 と会合し、プロテアソーム系で分解されるため、低レベルで発現が維持されている。DNA 損傷などのストレス下では、p53 は ATM・ATR などによりリン酸化され、Mdm2 と解離することで安定化し、核内に蓄積する。2 kPa と 30 kPa の基板上で培養した細胞ともに、p53 のタンパク量は DOXO 刺激で上昇したが、16 時間処理後では有意に 30 kPa の基板上で培養した細胞のほうが高かった (図 3A)。また、p53 の標的遺伝子である CDK 阻害因子 p21 の遺伝子発現は、30 kPa の基板上で培養した細胞のほうが高かった (図 3B)。以上のことから、DOXO により誘導される p53 の活性化は、足場が硬いほうが高いことが示された。

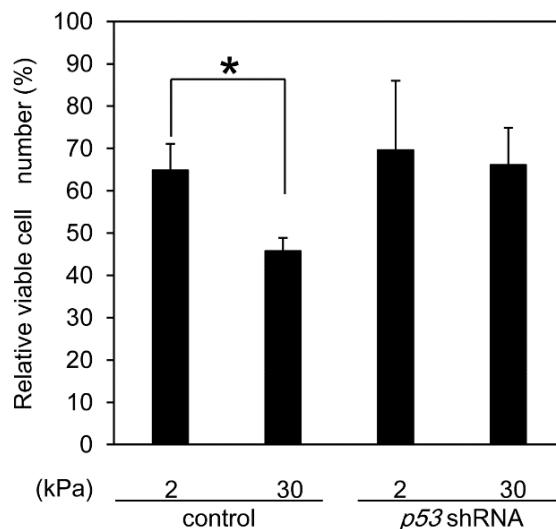


図2 DOXOによる細胞増殖抑制効果は2 kPaに比べ30 kPaの方が高い。p53をノックダウンした細胞およびコントロールの細胞をDoxorubicin (DOXO)で24時間処理した後、トリパンブルー色素排除法によって生細胞数を計測した。DOXO未処理の細胞の生細胞数に対する計測した細胞数の割合を算出した。n=4, *:p<0.005

細胞の足場の硬化は、ミオシンの活性を上昇させること[6]、ミオシン活性の阻害はp53の活性化を低下させることが報告されている[7]。これらのことから、足場の物理的環境により変化するミオシンの活性が、DOXOによるp53の活性化に影響を及ぼしていることが推察された。

p53は、転写依存的・非依存的にアクチン細胞骨格の構造を変化させるが[3]、刺激や細胞の種類によりその制御は異なる。そこで、2 kPaの基板上で培養した細胞においてDOXO刺激で変化するアクチン細胞骨格の構造を調べた。DOXOで刺激した細胞では、フィロポディアの形成が促進され(図4)、このフィロポディアの形成はp53を過剰発現させることで、抑制された。以上のことから、生体環境では、がん細胞の足場環境は柔らかいため、ミオシンの活性は低く維持されており、抗がん剤により誘導されるp53の活性が低く、フィロポディアの形成が促進される可能性が示された。フィロポディアの形成は細胞の生存を増強することが知られていることから[8]、足場環境はアクチン細胞骨格の制御を介してがん細胞の抗がん剤感受性に影響を及ぼしていることが考えられた。

4. 生活や産業への貢献および波及効果

本研究の結果から、生体内では抗がん剤存在下でもがん細胞が生育できる足場の環境になっていることが推察され、これががんの抗がん剤耐性また再発の原因になっていると考えられる。足場の硬化は、抗がん剤感受性を上昇させること(図2)、またその一方で、転移を促進することから[1]、がん細胞が物理的環境の影響を受けない方法ががんの根治に必要なと考えられる。今後、本研究をさらに発展させることで、新たながん治療方法の開発に繋げていく。

5. 参考文献

[1] Jaalouk D.E. & Lammerding J. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:63-73 (2009)

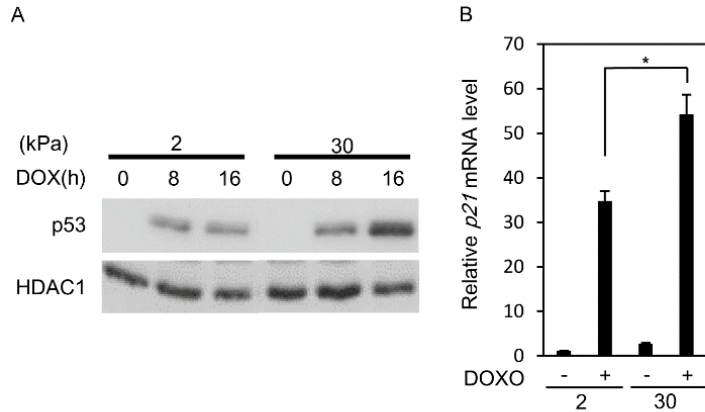


図3 DOXOによるp53の活性化は2 kPaに比べ30 kPaの方が高い。(A)DOXO処理後経時的に細胞を回収し、核タンパク質を調整した。抗p53抗体を用いてウェスタンブロット法で解析した。HDAC1をコントロールとした。(B)DOXOで24時間処理した細胞からRNAを抽出し、cDNAを作成した。p21の発現量をリアルタイムPCR法で解析した。Ubiquitinをコントロールとした。*: $p < 0.005$

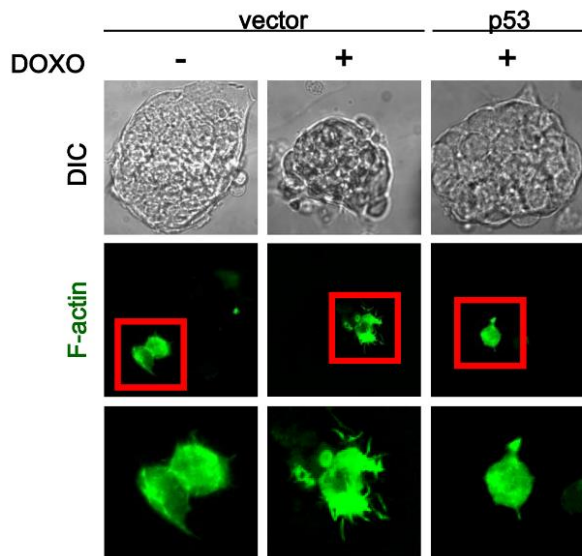


図4 p53はDOXOにより誘導されるフィロポディアの形成を阻害する。2 kPaの基板上で培養した細胞にLifeact GFP (F-アクチン結合ペプチド融合GFP)およびp53発現プラスミドをコトランスフェクションした。24時間後、DOXOで24時間処理した。

Mechanotransduction gone awry.

- [2] Mierke C.T. *Rep Prog Phys.* 77:76602 (2014) The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation.
- [3] Araki K., Ebata T., Guo A. K., Tobiume K., Wolf S. J., Kawauchi K. *Cell Mol Life Sci* 72:4077-4094 (2015) p53 regulates cytoskeleton remodeling to suppress tumor progression.
- [4] Guo A. K., Hou Y. Y., Hirata H., Yamauchi S., Yip A. K., Chiam K. H., Tanaka N., Sawada Y., Kawauchi K. *J Cell Physiol* 229:696-704 (2014) Loss of p53 enhances NF-kB-dependent lamellipodia formation.
- [5] Kawauchi K., Araki K., Tobiume K., Tanaka N. *Nat Cell Biol* 10:611-618 (2008) p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kB pathway and inhibits cell transformation.
- [6] Ng M.R., Besser A., Danuser G., Brugge J.S. *J Cell Biol* 199:545-563 (2012) Substrate stiffness regulates cadherin-dependent collective migration through myosin-II contractility.
- [7] Schramek D., Sendoel A., Segal J.P., Beronja S., Heller E., Oristian D., Reva B., Fuchs E. *Science* 343:309-13 (2014) Direct in vivo RNAi screen unveils myosin IIa as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas.
- [8] Shibue T., Brooks M.W., Weinberg R.A. *Cancer Cell* 24:481-498 (2013) An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization