

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「転写機能をターゲットとした創薬」（アクチン動態に基づく転写制御機構を用いた分化転換創薬）
2. 研究開発代表者： 学校法人慶應義塾 慶應義塾大学医学部 教授 佐谷 秀行
3. 研究開発の成果

① アクチン重合制御薬による骨肉腫幹細胞の脂肪分化転換誘導及び非臨床 POC の検討

研究代表者らはこれまで、骨肉腫の起源細胞の単離を試み、未分化な間葉系幹細胞の性質を有する AO 細胞と分化した骨・軟骨前駆細胞の性質を有する AX 細胞の 2 種類の細胞を同定した。これらの細胞に既存の抗癌剤（アドリアマイシン、シスプラチン）を処理すると、AO 細胞は AX 細胞と異なり、薬剤抵抗性を示した。さらに、mCherry 標識した AO 細胞と GFP 標識した AX 細胞を混合し、アドリアマイシンを処理すると、ほとんどの AX 細胞が死滅するのに対し、AO 細胞は生存することを明らかにした。これらのことより、我々は AO 細胞を治療抵抗性骨肉腫幹細胞と定義した。

そこで、骨肉腫幹細胞に相当する AO 細胞において、種々の濃度の ROCK 阻害剤、LIMK 阻害剤、アクチン重合阻害剤を作用させることによって、脂肪細胞への分化転換が誘導されるか検討した。AO 細胞に、アクチン重合阻害剤 Latruncurin A、ROCK 阻害効果を持つ Y-27632 及び既存薬剤 compound X を添加すると、単剤投与で脂肪細胞への分化を誘導することに成功した。なお、検討した薬剤の中で compound X 単剤投与が脂肪分化転換の効果が最も高かった。

抗癌剤抵抗性を示す AO 細胞は脂肪分化のマスターレギュレーターである PPAR γ を高発現するが、抗癌剤感受性を示す AX 細胞は PPAR γ を発現しない。また、骨肉腫形成細胞において、抗癌剤アドリアマイシンを処理すると、PPAR γ を高発現する AO-like 細胞のみが生存することを見出した。さらに、残った AO-like 細胞に compound X で処理すると、全ての細胞を脂肪細胞へと分化転換させることに成功した。これらの結果から、アドリアマイシンと compound X を併用することで、骨肉腫を根治できる可能性が強く示唆された。

② アクチン動態により制御される主転写因子の同定

正常な間葉系幹細胞を用いた実験において、ROCK 阻害剤 Y-27632 の処理によって発現変動する遺伝子セットを同定するために、マイクロアレイ解析を行った。その結果、細胞骨格、サイトカイン及び細胞外マトリックスなどの転写が大きく影響受けること、とりわけ SRF・MKL1 によって制御される遺伝子群が多数含まれることが分かった。これまでに研究代表者らは、アクチン細胞骨格の動態が、転写調節因子の MKL1 の核移行及び転写活性を直接、負に制御することで、脂肪細胞分化がトリガーされることを明らかにしている。そこで、ROCK 阻害剤による骨肉腫幹細胞の脂肪細胞への分化転換においても、MKL1 が関与しているかどうか検討した。その結果、AO 細胞に ROCK 阻害剤を単剤投与すると、MKL1 の核移行が抑制された。さらに、AO 細胞において、MKL1 を siRNA にてノックダウンするだけで、脂肪分化特異的タンパク質の発現が誘導できることも見出した。したがって、骨肉腫幹細胞の脂肪細胞への分化転換において、MKL1 が主転写因子として働くことが強く示唆された。

③ 分化転換誘導転写因子を制御する細胞膜透過型タンパク質の作製とその効果検討

Rho 及び Rac の活性型及び不活性型細胞膜透過性タンパク質の作製に成功し、それらを培養に加えると、細胞内に取り込まれることも分かった。しかしながら、ROCK 阻害剤、さらには主転写因子である MKL1 のノックダウンと比較すると、アクチン細胞骨格の動態及び分化に及ぼす影響は低かった。