

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) がん-間質におけるメカノバイオロジー機構の解明  
(英語) Mechanobiology in Cancer and Stroma Cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 北海道大学 大学院先端生命科学研究院 教授 芳賀 永  
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University,  
Professor, Hisashi HAGA

実施期間： 平成28年10月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 基質の硬化に伴うがん細胞の悪性化機構の解明と新規スクリーニングシステムの開発

開発課題名： (英語) Elucidation of Cancer Progression Triggered by Substrate Stiffness and Development of a New Screening System

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

がん組織は悪性度が進行するとともに硬くなることが知られている。本研究開発提案では、なぜがん組織は硬くなるのか、がん細胞はどのように組織の硬さを感知し悪性化するのか、という疑問に対し、がん細胞と間質の關係に着目し、硬さ応答のメカニズムの解明を目指す。

これまでに芳賀グループは、基質の硬さによって活性化が誘引される転写因子として ATF5 を発見した。平成 28 年度では、基質の硬さによる ATF5 の核内移行がどのようながん細胞種でみられる現象なのか検証を行った。免疫蛍光染色法によって ATF5 の核移行を観察したところ、7 種のがん細胞株で核移行を観察することができた。さらに、基質の硬さとがん細胞の動態との關係を調べるために、新規スクリーニングシステムの構築に着手した。本システムにより、50 箇所以上に及ぶ逐次タイムラプス観察が可能となった。

がん関連線維芽細胞（CAF）は促進性 CAF と抑制性 CAF から構成される。これまでに榎本グループは、がん抑制性 CAF のマーカーとして膜分子 Meflin を同定し、Meflin の発現が基質の硬さによって抑制されることを示してきた。平成 28 年度では、Meflin 陽性のがん抑制性 CAF と Meflin 陰性のがん促進性 CAF の量比が患者の予後を規定する可能性について検証を開始した。具体的には、膀がん、乳がんの病理組織検体を用いた組織学的検証を実施し、患者予後や抗がん剤感受性との関連について検証した。さらに、Meflin のレポーターアッセイを確立するために同遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行った。Meflin の機能を解明するために、質量分析によってその結合分子の候補となる分子を二種類同定した。これまで成功していなかったヒト Meflin のモノクローナル抗体の作製を再度開始した。また、がん進展におけるがん抑制性 CAF の意義について検証するために、膀がん発症モデルマウスの作成を開始した。

木岡グループは、これまでにマウス胎児線維芽細胞を用いて細胞外基質の硬さを感知するセンサー分子として接着斑タンパク質ビンキュリンが働くことを明らかにしてきた。平成 28 年度では、マウス間葉系幹細胞 ST2 株におけるビンキュリンの役割について検討した。間葉系幹細胞は、がん関連線維芽細胞の由来の一つと考えられている細胞である。その結果、ビンキュリンが細胞外基質の硬さに応じた脂肪細胞への分化調節に関与していることを明らかにした。また、がんとのかわりも報告されている転写因子 YAP の核局在や活性が、ビンキュリンの下流で制御されて細胞外基質の硬さに応じて調節されていることも見出した。さらに、線維芽細胞においては、ビンキュリンの脂質ラフトへの分配が細胞外基質の硬さによって調節されていること、および脂質ラフトが細胞外基質の硬さに依存した細胞遊走の調節に必要であることを明らかにし、間葉系幹細胞と線維芽細胞における細胞外基質の硬さの感知の仕組みの一端を明らかにした。

Abnormally stiff substrates have been shown to trigger cancer progression. Our main goal in this research and development program is to elucidate the detailed molecular mechanisms underlying this trigger.

We found that activating transcription factor 5 (ATF5) localized to the nucleus on a stiff substrate, whereas it localized to the cytoplasm on a soft substrate. This result shows that substrate stiffness regulates ATF5 localization. In FY2016, we examined the localization of ATF5 in cancer cells and found that in response to substrate stiffness, ATF5 localized to the nucleus in seven different cancer cell lines. We are developing a new screening system to observe the effects of substrate

stiffness on malignancy. This system has enabled us to perform successive time-lapse observation in more than 50 fields of view.

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are composed of cancer-promoting CAFs and cancer-restraining CAFs. We have identified the membrane protein Meflin as a marker for cancer-restraining CAFs. In FY2016, we started to examine the influence of the ratio of Meflin-negative cancer-promoting and Meflin-negative cancer-restraining CAFs in the progression of cancer and its sensitivity to chemotherapy in patients, using pancreatic and breast cancer tissue sections. We isolated the promoter region of the human Meflin gene to establish a reporter assay system to monitor Meflin promoter activity. Mass spectrometric analysis identified two proteins as candidate Meflin-binding proteins, and we are working towards generating monoclonal antibodies that specifically recognize human Meflin. Finally, we have begun generating a mouse model of pancreatic cancer to investigate the significance of cancer-restraining CAFs in the progression of cancer.

We previously identified that vinculin, a focal adhesion protein, could function as a sensor of stiffness of the extracellular matrix in mouse embryonic fibroblasts. In this study, we first examined the function of vinculin in mouse ST2 mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells are one of source cells of cancer-associated fibroblasts. We showed that vinculin is involved in the differentiation of ST2 cells to adipocytes in a stiffness-dependent manner. Vinculin promoted the nuclear localization of transcription factor YAP on rigid extracellular matrix to inhibit the differentiation to adipocytes. Furthermore, we also found that vinculin distribution to lipid rafts is regulated by the stiffness of the extracellular matrix, and lipid rafts are necessary for stiffness-dependent regulation of cell migration.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 3件）

1. Nukuda A, Endoh H, Yasuda M, Mizutani T, Kawabata K, Haga H. Role of ATF5 in the Invasive Potential of Diverse Human Cancer Cell Lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 474, 509-514.
2. Sakane A, Yoshizawa S, Nishimura M, Tsuchiya Y, Matsushita N, Miyake K, Horikawa K, Imoto I, Mizuguchi C, Saito H, Ueno T, Matsushita S, Haga H, Deguchi S, Mizuguchi K, Yokota H, Sasaki T. Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides 'law and order' in collective cell migration. *Molecular Biology of the Cell.* 2016, 27, 3095-3108.
3. Mizutani T, Haga H, Kawabata K. Data Set for Comparison of Cellular Dynamics between Human AAVS1 Locus-modified and Wild-type Cells. *Data in Brief.* 2016, 6, 793-798.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Role of ATF5 in cancer cell invasion of several diverse human cancer cell lines, ポスター, 温田晃弘, 安田元昭, 芳賀永, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.
2. Fascin-1 promotes cancer cell invasion via activation of Stat3, ポスター, 高橋都史樹, 温田晃弘, 加野将之, 松原久裕, 芳賀永, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) がん-間質におけるメカノバイオロジー機構の解明  
(英語) Mechanobiology in Cancer and Stroma Cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 北海道大学 大学院先端生命科学研究院 教授 芳賀 永  
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University,  
Professor, Hisashi HAGA

実施期間： 平成28年10月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) がん関連線維芽細胞特異的なメカノセンシング機構の解明とがんの新規診断技術・治療法の開発

開発課題名： (英語) Elucidation of Mechanosensing Mechanisms of Cancer-associated Fibroblasts and the Development of Novel Methods for Cancer Diagnosis and Therapy

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学 大学院医学系研究科 総合医学専攻 准教授 榎本 篤  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medicine, Nagoya University,  
Associate Professor, Atsushi Enomoto

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：北海道大学 大学院先端生命科学研究院 芳賀 永 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 4 件）

1. Sunagawa M, Mii S, Enomoto A, Kato T, Murakumo Y, Shiraki Y, Asai N, Asai M, Nagino M, Takahashi M. Suppression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice. *Oncotarget*. 2016, 7, 82836-82850.
2. Arita S, Kinoshita Y, Ushida K, Enomoto A, Inagaki-Ohara K. High-fat diet feeding promotes stemness and precancerous changes in murine gastric mucosa mediated by leptin receptor signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2016, 610, 16-24.
3. Nakai T, Kawasaki T, Tada T, Ishida M, Iwakoshi A, Enomoto A, Okuda S, Takahashi M, Ambo JI, Sugai T, Ohbayashi C, Ichihara S. *Pathol Int*. 2016, 66, 706-707.
4. Han YP, Enomoto A, Shiraki Y, Wang SQ, Wang X, Toyokuni S, Asai N, Ushida K, Ara H, Ohka F, Wakabayashi T, Ma J, Natsume A, Takahashi M. Significance of low mTORC1 activity in defining the characteristics of brain tumor stem cells. *Neuro Oncol*. 2016 [Epub ahead of print].

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Meflin is a specific marker for mesenchymal stem cells (MSCs) whose expression is regulated by substrate stiffness, ポスター, Atsushi Enomoto, Naoya Asai, Takeshi Kobayashi, Nobuhisa Nakamura and Masahide Takahashi, ASCB Annual Meeting 2016, 2016/12/4, 国外.
2. 脳腫瘍幹細胞における mTORC1 活性制御とその分子機構の解析, ポスター, 榎本篤、翁良、韓一梵、浅井直也、三井伸二、高橋雅英, 第 62 回日本病理学会秋期特別総会, 2016/11/11, 国内.
3. Role of Akt-Girdin signaling in cancer progression, 口頭, 高橋雅英、榎本篤、浅井直也, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.
4. Aneuploidy and premature aging in vimentin phospho-deficient mice, ポスター, 牧原弘幸、田中宏樹、後藤英仁、猪子誠人、榎本篤、稲垣昌樹, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
5. Suppression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice with chronic skin inflammation, ポスター, 三井伸二、砂川真輝、榎本篤、村雲芳樹、椰野正人、高橋雅英, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
6. Immunohistochemical analysis of CD109 expression in human lower grade glioma, ポスター, 白木之浩、砂川真輝、三井伸二、浅井直也、榎本篤、百田洋之、夏目敦至、若林俊彦、高橋雅英, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
7. Amino acid signaling is desensitized by MAPK-mediated regulation of the 4F2hc-Girdin complex, ポスター, Liang Weng、Yipeng Han、Atsushi Enomoto、Yasuyuki Kitaura、Naoya Asai、Yoshiharu Shimomura、Masahide Takahashi, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内.
8. Collective invasion of cancer cells : perspectives from pathology, 口頭, 榎本篤, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016/11/25, 国内.

9. A role of mTORC1 activity in cancer stem cells and its regulatory mechanisms, ポスター, 榎本篤,  
Liang Weng、Yi-Peng Han、高橋雅英, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) がん-間質におけるメカノバイオロジー機構の解明  
(英語) Mechanobiology in Cancer and Stroma Cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 北海道大学 大学院先端生命科学研究院 教授 芳賀 永  
所属 役職 氏名： (英語) Hokkaido University, Faculty of Advanced Life Science,  
Professor, Hisashi HAGA

実施期間： 平成28年10月 1日 ~ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) がん細胞およびがん関連線維芽細胞におけるメカノセンサーの同定とセン  
シング機構の解明

開発課題名： (英語) Identification and Analysis of Mechanosensor Molecules in Cancer Cells  
and Cancer-associated Fibroblasts

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻 准教授 木岡 紀幸  
所属 役職 氏名： (英語) Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture,  
Kyoto University, Associate Professor, Noriyuki Kioka

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：北海道大学 大学院先端生命科学研究院 芳賀 永 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 4 件）

1. Omachi T, Ichikawa T, Kimura Y, Ueda K, Kioka N. Vinculin association with actin cytoskeleton is necessary for stiffness-dependent regulation of vinculin behavior. PLoS One, 2017, in press.
2. Kuroda M, Wada H, Kimura Y, Ueda K, Kioka N. Vinculin promotes nuclear localization of TAZ to inhibit ECM stiffness-dependent differentiation into adipocytes. J Cell Sci, 2017, 130, 989-1002.
3. Nagasato AI, Yamashita H, Matsuo M, Ueda K, Kioka N. The distribution of vinculin to lipid rafts plays an important role in sensing stiffness of extracellular matrix. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, in press.
4. Fukada T, Sakajiri H, Kuroda M, Kioka N, Sugimoto K. Fluid shear stress applied by orbital shaking induces MG-63 osteosarcoma cells to activate ERK in two phases through distinct signaling pathways. Biochemistry and Biophysics Reports, 2017, 9, 257-265.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Vinculin Promotes Nuclear Localization of TAZ to Inhibit ECM Stiffness-Dependent Differentiation into Adipocytes, ポスター, Mito Kuroda, Hiroki Wada, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, and Noriyuki Kioka, Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrin & Related Molecules, 2017/1/29-2/3, 国外.
2. 細胞収縮力発生におけるビネキシンファミリータンパク質の役割, 口頭, 市川尚文, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸, 2017 年生体運動研究合同班会議, 2017/1/6-1/8, 国内.
3. ビンキュリンはアクチン細胞骨格を介して間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制する, 口頭 黒田美都, 植田和光, 木岡紀幸, 2017 年(平成 30 年度)日本農芸化学学会大会, 2017/3/17-20, 国内.
4. 間葉系幹細胞分化のレチノイン酸制御に与える接着斑タンパク質ビネキシンの影響, 口頭, 高田恭子, 黒田美都, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸, 2017 年(平成 30 年度)日本農芸化学学会大会, 2017/3/17-20, 国内.
5. ビネキシンのホスファチジン酸結合領域の解析, 口頭, 伊藤有亮, 市川尚文, 折田雄一郎, 安部真人, 木村泰久, 植田和光, 三芳秀人, 木岡紀幸, 2017 年(平成 29 年度)日本農芸化学学会大会, 2017/3/17-20, 国内.
6. ビネキシン $\alpha$ の両親媒性ヘリックスはビンキュリンの構造変化に必要である, 口頭, 日野直也, 市川尚文, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸, 2017 年(平成 29 年度)日本農芸化学学会大会, 2017/3/17-20, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 第97回 日本農芸化学会サイエンスカフェ コーディネーター 2016/12/10 国内
2. 第96回 日本農芸化学会サイエンスカフェ コーディネーター 2016/11/26 国内

(4) 特許出願

該当なし