

がんの物理的環境応答におけるアクチンと p53 の役割

甲南大学フロンティアサイエンス学部腫瘍分子生物学研究室

川内 敬子

1. 目的

腫瘍内には、がん細胞のみならず免疫細胞や線維芽細胞などの正常細胞や細胞外マトリックス (ECM) が存在している。これらによりつくり出される腫瘍内環境 (がん微小環境) が抗がん剤耐性や転移などのがん細胞の形質に影響することが明らかとなっている。我々は、これまでの研究で、微小環境のひとつである ECM の物理的性質がアクチン細胞骨格の構造の再構成を介して分化や幹細胞化といった細胞の運命決定に重要であることを示してきた。分化や幹細胞化は、がん細胞の抗がん剤耐性や転移能の獲得に深く関与していることが知られているが、ECM の物理的性質が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。そこで本研究では、抗がん剤感受性における ECM の物理的性質の重要性を明らかにすることを目的に、硬さを調節した培養基板ゲルを用いて、ヒト乳がん由来 MCF7 細胞の抗がん剤 Doxorubicin に対する感受性の比較、およびその分子機構の解析を行った。

2. 方法

培養基板ゲルの調整および細胞培養

弾性率 2 kPa および 30 kPa の培養基板ゲルの作成は、以前調整した方法で行った [1]。簡潔に述べると、6-アクリルアミドヘキサノ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。0.5 M 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。細胞は、5% CO₂ 存在下において 10% FBS を含む DMEM 培地中で培養した。

qRT-PCR

細胞から RNeasy Kit (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。次に、cDNA を RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Fermentus) と T7-01igo (dT) プライマー (Invitrogen) を用いて作成した。p21、bax 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。

核タンパク質調整とウェスタンブロッティング

核タンパク質の調整は、以前と同様の方法で行った [2]。核タンパク質を SDS-PAGE にかけて後、PVDF 膜に転写した。1次抗体として抗 p53 抗体 (D01) または抗 HDAC1 抗体 (2E10)、2次抗体に HRP 標識抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

3. 結果

ヒト正常乳腺組織と同等の硬さを有する 2 kPa の基板上で MCF7 細胞を培養したところ、細胞塊 (スフェロイド) を形成した (図 1A)。一方、30 kPa およびプレート (>1 x 10⁶ kPa) 上の硬い基板上ではシート状態で伸展した形態をとった (図 1B、C)。このことは、乳がん細胞が 2 kPa と 30 kPa の硬さの違いを感知していることを示している。

そこで次に、2 kPa と 30 kPa の基板上で

培養した細胞を、抗がん剤 Doxorubicin で処理し、細胞の生存率を比較したところ、30 kPa の基板上で培養した細胞のほうが、死細胞の割合が高かった (図 2)。このことから、足場が柔らかいと Doxorubicin の感受性は低くなることが示唆された。Doxorubicin による細胞死は、がん抑制遺伝子

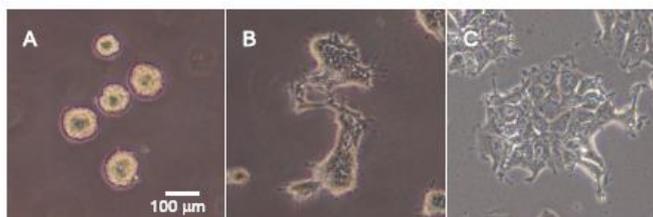


図1 異なる硬さの基板上で培養した細胞の形態変化

MCF7細胞を2 kPa (A)、30 kPa (B)の硬さを有する培養基板ゲルおよびプレート(C)上で24時間培養し、倒立顕微鏡 (OLYMPUS CKX41) で観察した。

p53をノックダウンすることで抑制されることから、基板の硬さで変化するDoxorubicin感受性の違いは、p53の活性化の違いに依存しているのではないかと考えた。

p53は、抗がん剤やがん遺伝子活性化などにより誘導されるDNA損傷時において安定化および活性化し、p21などのCDK阻害因子やBaxなどのアポトーシス促進因子の遺伝子発現を介して細胞の増殖を阻害する機能を有している。そこで、2 kPaおよび30 kPaの基板上で培養した細胞において、Doxorubicin処理により誘導される*p21*と*bax*遺伝子の発現量をqRT-PCRで比較した。その結果、両遺伝子ともに2 kPaの基板上で培養した細胞のほうが、有意に低かった（図3A）。p53をノックダウンした細胞では、30 kPaの基板上で培養した細胞においても、Doxorubicin処理で誘導されるp53の転写活性化は、細胞の足場が柔らかいほど低いことが示唆された。次に、p53の量をウェスタンブロット法で確認したところ、Doxorubicin処理でp53の核内タンパク量は上昇するが、2 kPaの基質上で培養した細胞のほうが有意に少ないことが示された（図3B）。

スフェロイドを形成することで、中心部にDoxorubicinが浸透せずにp53の活性化が抑制されている可能性があると考えられたため、スフェロイド中心部および外周部に存在しているそれぞれ細胞でのDoxorubicinの取り込み量を比較した。Doxorubicinのほとんどが、核内に取り込まれており、スフェロイドの中心部および外周部の細胞においても取り込み量に有意な差は見られなかった（図3A, B）。つまり、本実験の条件では、スフェロイド中心部にもDoxorubicinが十分に取り込まれていることが示された。

以上のことから、細胞の足場の物理的環境は、抗がん剤の取り込み量に依存せずに、p53の活性化に影響を与え、抗がん剤感受性を左右する要因となることが明らかとなった。

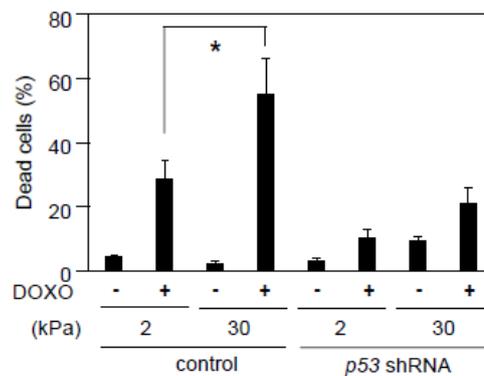


図2 足場の硬さの違いによるDoxorubicin誘導性の細胞死の割合の変化

2 kPaまたは30 kPaの硬さを有する培養基板ゲル上で培養したp53ノックダウン細胞およびコントロールの細胞を、Doxorubicin存在下で48時間培養した。このときの死細胞の割合をトリパンブルー色素排除試験法により求めた。

これら遺伝子の発現はほとんど上昇しないことから、

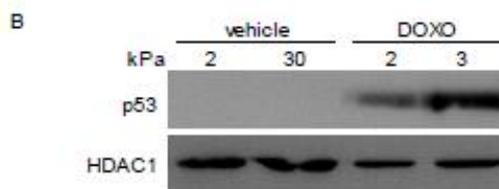
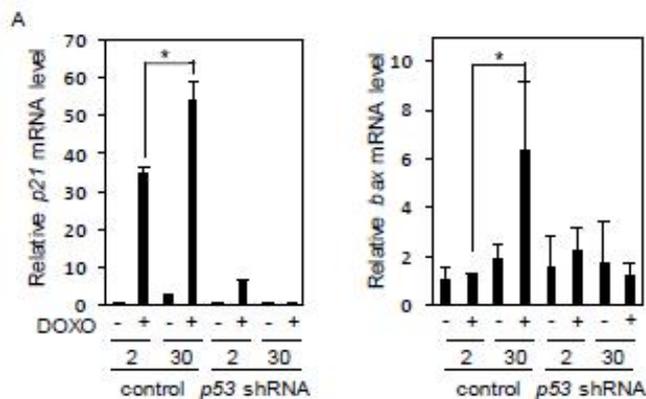


図3 足場の硬さの違いによるDoxorubicin誘導性のp53活性化の変化
2 kPaまたは30 kPaの硬さを有する培養基板ゲル上で培養したp53ノックダウン細胞およびコントロールの細胞を、Doxorubicin存在下で16時間培養した。(A)p53標的遺伝子である*p21* および*bax* の発現量をqRT-PCRで解析した。*Ubiquitin*をコントロールとした。(B)核タンパク抽出液を調整した。p53の発現量をウェスタンブロット法で解析した。HDAC1を核タンパクのコントロールである。

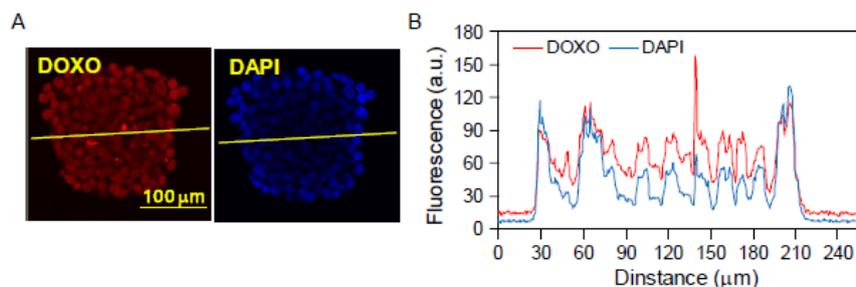


図4 Doxorubicinの浸透性はスフェロイド内外部の細胞で差がない
Doxorubicin存在下において、2 kPaの硬さを有する培養基板ゲル上で培養した細胞が形成したスフェロイドの直径の平均値は190 μmであった(n=100)。(A)直径190 μmのスフェロイドにおけるDoxorubicinの浸透性を調べるために、共焦点顕微鏡 (LSM 700)を用いてDoxorubicin蛍光強度を解析した。DAPIは核を染色するために用いた。(B) A中のラインにおける蛍光強度をプロットした。

4. 考察

細胞の足場の力学的物性は、細胞接着分子であるインテグリンにより感知され、FAKなどの細胞内シグナル分子を介してアクチン細胞骨格の再構成が行われる。これまでの研究から、足場が硬いほど、インテグリンの活性は高くなり、アクチン重合と共にミオシンによる牽引力が増強されることで、さらにインテグリンの活性を増強するというフィードバック機構が存在することが明らかとなっている[3]。インテグリン活性化に伴うシグナルは、抗がん剤感受性を低下させること[4]、またその一方で、ミオシンIIの活性は、Doxorubicin によるp53の活性化の誘導に必要であることが知られており[5]、細胞の足場の力学的物性が抗がん剤感受性に対する影響は不明であった。しかしながら本研究の結果で、基板が硬いほどDoxorubicin により誘導されるp53の活性化は高く、細胞死が亢進されたことから、力学的物性の抗がん剤感受性に及ぼす影響は、ミオシンIIを介したp53の活性化の制御に依存しているということが推察された。

ミオシンIIの活性は、インテグリンシグナルによって調節されるだけでなく、カドヘリンを介した細胞間接着によっても制御される。細胞間の牽引力に依存して、 α カテニンの構造が変化し、その結果ビンキュリンなどのアクチン重合分子と結合し、アクチン重合が促進されるとアクトミオシンによる牽引力が増強される[6]。我々は、硬い基板上で培養した細胞において、ビンキュリン結合部位を欠失した α カテニンの変異体を発現させると、Doxorubicin誘導性のp53の活性化が低下することを明らかにしており（未発表データ）、これはアクトミオシンの牽引力が、力学的物性の抗がん剤感受性において重要な要素となるという本研究の結果を支持していると考えられる。

柔らかい基板上では、幹細胞化や幹細胞の自己複製の維持が促進される[7-8]。また、このような幹細胞の運命をp53は抑制することが知られている[9]。したがって、がん再発や転移の原因として考えられている幹細胞の性質をもったがん細胞（がん幹細胞）は、足場が柔らかい場合に発生してくる可能性が考えられる。本研究結果のさらなる進展によって、新たながん治療方法の創出が期待できる。

5. 参考文献

1. Guo A. K., Hou Y. Y., Hirata H., Yamauchi S., Yip A. K., Chiam K. H., Tanaka N., Sawada Y., Kawauchi K. (2014) Loss of p53 enhances NF-kappaB-dependent lamellipodia formation. *J Cell Physiol* 229:696-704
2. Kawauchi K., Araki K., Tobiume K., Tanaka N. (2008) p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 10:611-618
3. Moore S. W., Roca-Cusachs P., Sheetz M. P. (2010) Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell* 19:194-206
4. Damiano J. S., Cress A. E., Hazlehurst L. A., Shtil A. A., Dalton W. S. (1999) Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93:1658-1667
5. Schramek D., Sandoel A., Segal J. P., Beronja S., Heller E., Oristian D., Reva B., Fuchs E. (2014) Direct in vivo RNAi screen unveils myosin IIa as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas. *Science* 343:309-313
6. Yonemura S., Wada Y., Watanabe T., Nagafuchi A., Shibata M. (2010) alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol* 12:533-542
7. Higuchi S., Watanabe T. M., Kawauchi K., Ichimura T., Fujita H. (2014) Culturing of mouse and human cells on soft substrates promote the expression of stem cell markers. *J Biosci Bioeng* 117:749-755
8. Chowdhury F., Li Y., Poh Y. C., Yokohama-Tamaki T., Wang N., Tanaka T. S. (2010) Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. *PLoS One* 5:e15655
9. Araki K., Ebata T., Guo A. K., Tobiume K., Wolf S. J., Kawauchi K. (2015) p53 regulates cytoskeleton remodeling to suppress tumor progression. *Cell Mol Life Sci* 72:4077-4094