

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09376

研究課題名(和文) 上皮間葉転換遺伝子データより見出された遺伝子の機能解析及び薬剤感受性に関する検討

研究課題名(英文) Functional analysis about novel gene which was extracted from gene analyses using gene expression data of epithelial-mesenchymal transition (EMT) genes and drug sensitivities of antitumor agents

研究代表者

川手 美穂子(山出) (Yamade, Mihoko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：10464124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：癌の転移浸潤機構の一つである上皮間葉転換に関わる遺伝子の発現は、癌の予後予測因子や薬剤感受性のマーカーになることが期待されている。本研究ではEMTに関連する新規遺伝子を探索・検討した。癌細胞株・癌組織の遺伝子発現データを解析し、既知のEMT関連遺伝子と強い相関を有す遺伝子LIX1-like (LIX1L)を抽出した。CRISPR/Cas9法によりLIX1L発現をノックアウトした細胞を作成した比較実験で、EMT関連遺伝子発現、細胞の移動能・浸潤能に明らかな違いを認めなかったが、抗腫瘍薬の薬剤感受性に関し現在検証実験中である。またmicroarray法で更なる機能解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能進行癌の薬物治療は昨今新たな薬剤の開発もされている分野であるが、現場で化学療法の治療効果や有害事象を事前に予測することは依然困難である。これらを予測し最善の治療選択につなげるバイオマーカーの開発が必要とされている。

本研究では癌の転移浸潤機構に関わる上皮間葉転換に着目し、LIX1L遺伝子が強い関連性を示すことを見出した。転移浸潤能そのものに現時点で明らかな差異を認めないが、薬剤感受性に関し実験を継続中である。当該遺伝子発現レベルで抗腫瘍薬の効果に差を認めた場合、癌組織のLIX1L発現を治療前に測定することで、より効果的な化学療法レジメンの効果予測が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) is one of the important mechanisms in cancer invasion and metastasis. Expression levels of EMT genes are also expected to predict cancer prognosis and drug sensitivity. In this study, we investigated a novel gene related to EMT. We analyzed expression databases of cancer cell lines and cancer tissues and identified LIX1-like (LIX1L) gene, which had strong correlation with well-known EMT genes. We knocked out LIX1L expression of colon cancer cell lines with CRISPR/Cas9 system and investigated their characteristics. We did not find out significant differences between LIX1L-wild type and -knock out cell lines in expression levels of EMT genes, motility and invasion ability with colon cancer cell lines. We continued verification experiments about drug sensitivity to anticancer agents. We are also looking into novel correlation between LIX1L and another genes by microarray.

研究分野：医学

キーワード：上皮間葉転換 癌の転移浸潤 大腸癌 遺伝子発現 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

切除不能進行癌の薬物治療は日々進歩しているが、臨床現場で治療開始前に治療効果や有害事象を正確に予測することは難しい。治療効果や有害事象を予測する有効なバイオマーカーの検索が進められており、大腸癌領域では遺伝子 UGT1A1 多型からイリノテカンにより生じうる有害事象の一つ下痢の程度を予測し用量を事前に調節することが可能となった。また、RAS 変異の有無で EGFR 阻害薬により得られる効果予測が可能となり、適応決定に活用されている。しかしながら効果予測および有害事象の大部分ははまだ予測困難であり、バイオマーカー等は十分ではない。

進行癌では、しばしば予後決定因子となる転移巣の制御が重要となる。癌の転移・浸潤には、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) に始まる複数のステップが報告されており、本研究では癌の進展を抑制するため EMT 機構の制御に着目した。

最近の遺伝子データ解析技術の進歩は目覚しく、様々な研究機関で大規模な遺伝子データ解析や薬剤感受性試験が行われ一般公開されている。しかしながら一般公開された大量のデータを解析するには生命情報科学の知識と技術が必要であり、臨床医や基礎研究者による直接解析は容易ではなかった。

この問題を解決するために NIH/NCI の研究室で開発されたのが、代表的な 60 の癌細胞株 NCI-60 の遺伝子発現等のデータおよび薬剤感受性が Internet 上で解析可能な platform である CellMiner (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/analysis.do>) と、NCI-60 遺伝子データと CCLE、Sanger といった他の研究機関で報告された癌細胞の遺伝子データを統合した CellMinerCDB (<https://discover.nci.nih.gov/cellminercdb/>) である。既知の EMT 遺伝子の解析により、EMT を促進する間葉系遺伝子 Mesenchymal genes と、これを抑制する上皮系遺伝子 Epithelial genes の解析により、これら 2 グループの遺伝子群は相反する発現パターンを示すことが報告された。これら特徴的な発現パターン解析を行うことで、Mesenchymal genes と高度の関連を示す遺伝子 LIX1-like (LIX1L) が抽出され、乳癌細胞株において LIX1L 発現は転移浸潤能の促進に関与することを示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、癌の転移浸潤機構の一つである EMT 遺伝子発現パターン解析により見出された遺伝子 LIX1L に着目し、大腸癌細胞において LIX1L の発現が癌細胞の転移浸潤能および薬剤感受性にどのように影響するかを検索することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞株における LIX1L 発現パターン

CellMiner を用いて NCI-60 の LIX1L 発現パターンを既知の EMT 関連遺伝子と比較検討した。

(2) LIX1L-KO cell lines の作成

まず、大腸癌細胞株 RKO 等で CRICPR/Cas9 system を用いて遺伝子 LIX1L を knock out (KO) した細胞を作成した。LIX1L の Exon2 を KO した LIX1L-KO1 と、Exon3 を KO した LIX1L-KO2 を作成した。次いで、Western blot と qRT-PCR で LIX1L の発現消失を確認した。

(3) 既知の EMT 関連遺伝子の発現解析

代表的な既知の EMT 制御・関連遺伝子の発現を LIX1L-KO 細胞と Wild type (WT) 細胞で比較した。タンパク発現レベルを Western blot で、mRNA 発現レベルを qRT-PCR で比較検討した。

(4) 癌細胞の転移浸潤能の比較検討

大腸癌細胞株 RKO の LIX1L-WT 細胞と LIX1L-KO 細胞を用い、転移浸潤能を比較した。Wound healing assay 等で移動能の検討を、Matrigel を用いた実験で浸潤能を比較した。

(5) 抗腫瘍薬に対する薬剤感受性の検討

大腸癌で頻用されている殺細胞性抗腫瘍薬、フルオロウラシル、シスプラチン、イリノテカンについて、LIX1L-WT 細胞と LIX1L-KO 細胞を用いて、薬剤感受性の比較を行った。WTS assay を用いて比較検討を行っている。

(6) Microarray

上記実験経過を踏まえ、遺伝子 LIX1L の発現レベルに関連が強い転移浸潤以外の機構を探索するため、Microarray を追加した。

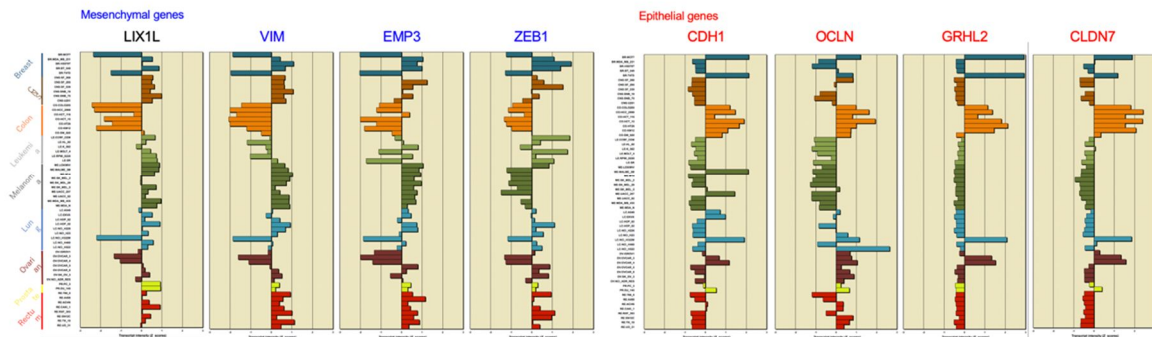
4. 研究成果

(1) 癌細胞株における LIX1L 発現パターン

CellMiner を用いて NCI-60 cell lines の LIX1L 発現パターンを確認した。そのパターンは固形癌において Mesenchymal genes と類似し、Epithelial genes と Mirror images を示していた (図 1)。また各 EMT 関連遺伝子との発現レベルを CCLE 等他の癌細胞の遺伝子データベース毎に検証した。いずれのデータベースにおいても、LIX1L は Mesenchymal genes と強い相関関係を示

していた。

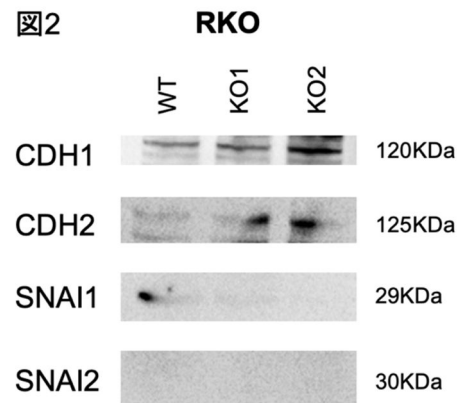
図 1



(2) LIX1L-KO cell lines の作成

大腸癌細胞株 RKO 等を用いて、CRISPR/Cas9 system を用いて作成した上記の LIX1L-KO1、LIX1L-KO2 について、Western blot でタンパクレベルの発現消失を確認した(図2)。次いで、qRT-PCR での明らかな発現低下を確認した。

図2

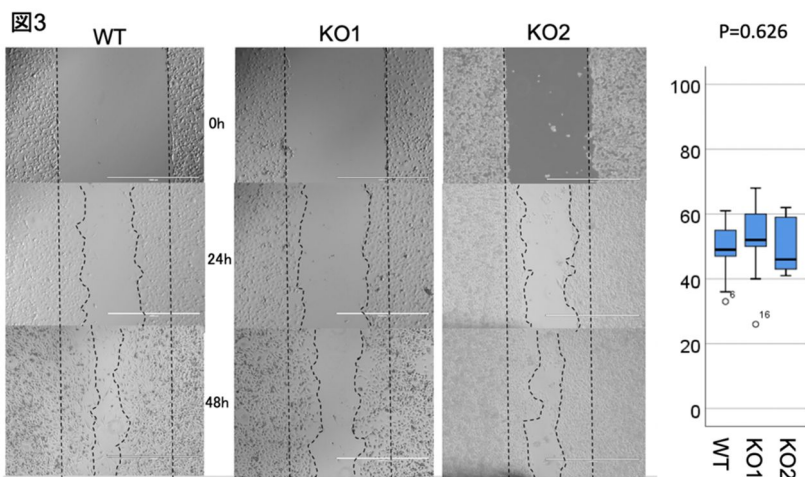


(3) 既知の EMT 関連遺伝子の発現解析

代表的な既知の EMT 制御・関連遺伝子の発現を LIX1L-KO1、LIX1L-KO2 細胞と LIX1L-Wild type(WT)細胞で比較した。タンパク発現レベルを Western blot で、mRNA 発現レベルを qRT-PCR で比較検討したが、RKO 細胞株で特徴的な発現の差を見出すことはできなかった(図2)。

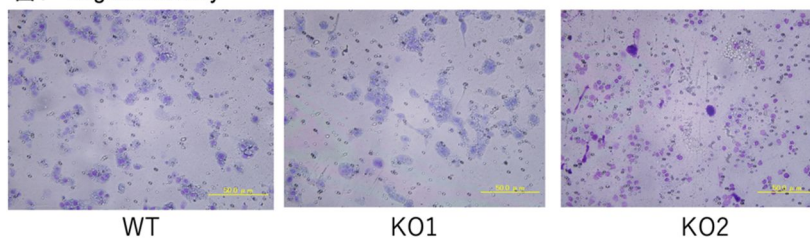
(4) 癌細胞の転移浸潤能の比較検討

大腸癌細胞株 RKO の LIX1L-WT 細胞と LIX1L-KO 細胞を用い、転移浸潤能を比較した。まず Wound healing assay 等で移動能を比較したところ、LIX1L 発現による細胞移動能の差異を大腸癌 RKO 細胞株では認めなかった(図3)。



Matrigel を用いた細胞株の浸潤能を比較する実験では、当初浸潤能が KO 細胞で促進される結果が示唆された。しかしながら、検証実験では明らかな差を認めることはできなかった(図4)。

図4 Migration Assay



(5) 抗腫瘍薬に対する薬剤感受性の検討

大腸癌で頻用されている殺細胞性抗腫瘍薬、フルオロウラシル、シスプラチン、イリノテカンについて、LIX1L-WT 細胞と LIX1L-KO 細胞における薬剤感受性の比較を WTS assay 等で検討中である。一部の抗腫瘍薬に LIX1L 発現による効果の差が示唆され、現在検証実験を行っている。+ LIX1L 発現の違いにより抗腫瘍薬の殺細胞効果に差異が確認された場合、その抗腫瘍薬の作用機序に着目し、更なる機能解析を行う方針である。

(6) Microarray

上記実験経過を踏まえ、遺伝子 LIX1L の発現レベルに関連が強い転移浸潤以外の機構を探索するため、Microarray を追加し、新たな機能の探索を継続しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	古田 隆久 (Furuta Takahisa) (10303546)	浜松医科大学・医学部附属病院・准教授 (13802)	