

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10472

研究課題名(和文) マイクロRNAによる上皮間葉転換の制御と放射線感受性の修飾

研究課題名(英文) Modulation of radiation sensitivity of cancer cells through regulating the epithelial mesenchymal transition using microRNAs

研究代表者

小川 良平 (OGAWA, Ryohei)

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：60334736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の上皮間葉転換をデュアルルシフェラーゼアッセイにより検出することのできるEMT可視化細胞を複数のがん細胞で構築した。これらの細胞は、EMTの主要マーカーであるE-カドヘリンとビメンチン遺伝子の下流にウミシイタケ由来、ホタル由来のそれぞれのルシフェラーゼ遺伝子を導入し、これらはマーカー遺伝子の発現に同期して発現する。これらの細胞を使用することで、がん治療の刺激によりEMTが引き起こされ、がんの悪性化も促進されることを示した。この細胞を利用してメカニズムを解析し、最終的にはEMTが起こってもがんの悪性化やがん幹細胞の形成が起こらないような安全で効率的ながん治療の開発に結びつけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EMT可視化細胞を複数のがん株細胞で構築した。これらの細胞を使用することで、どのような刺激ががん細胞のEMTを誘導し、その悪性化を促進するかについてより簡便な解析が可能となった。さらには、この細胞を使用することにより、EMTと関連の深いがん幹細胞形成のメカニズムを明らかにすることで、その制御法の確立にも役立つと思われる新たながん治療の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have constructed cancer cell lines that express the renilla luciferase and the firefly luciferase genes in a manner with synchronizing expression of the E-cadherin and the Vimentin genes, respectively, two main markers for the epithelial mesenchymal transition (EMT). When EMT was induced in these cell lines, it is easily detected by the dual luciferase assay. Taking advantage of these cell lines, we could easily show that therapeutic stimulations including radiation induce EMT, which facilitates malignant transformation of cancer cells. In addition, the cell lines was also used for easily analyzing the mechanism of EMT induction. We are going to use the cell lines to eventually establish a novel cancer therapy suppressing its malignant transformation even if the therapy induces EMT in the future.

研究分野：放射線生物学、分子生物学

キーワード：上皮間葉転換 がん幹細胞 ゲノム編集

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (EMT) は胚形成や創傷治癒のプロセスの一つとして見いだされた細胞の形質転換である。また、正常な胚形成や正常組織の創傷治癒のみならず、がん細胞の浸潤や転移にも関わっていることが知られている。すなわち、極性や接着性に特徴付けられる上皮様の性質を持ったがん細胞が、細胞間の接着を失い移動活性や細胞間マトリックスを形成する因子の産生などの間葉性細胞の性質を獲得することにより、がんの悪性化である、原発組織での浸潤、原発組織からの離脱や転移、さらには転移先における定着や増殖、浸潤などを可能とする性質を獲得するプロセスである。このプロセスはさらに、それぞれの細胞の性質の異なる腫瘍組織の中で、自己複製能や腫瘍形成能を持つ癌幹細胞の発生と維持に密接に関与していることが指摘されている。実際に、EMT を進行させる転写因子群ががん細胞の幹細胞性を調節することが示されており、いくつかの EMT 関連転写因子遺伝子の強制発現により、がん幹細胞マーカーの発現増強やがん細胞のスフィア形成や腫瘍形成能の向上が認められている。がん幹細胞は、がんの治療抵抗性や治療後の再発の原因とも考えられており、がん幹細胞を標的とした治療戦略は、次世代のがん治療の要になると考えられる。

TGF- $\beta$  は EMT の主要な誘導サイトカインである。しかしながら、その他にも各種成長因子、さらには細胞外マトリックスを構成する分子などもこのプロセスを誘導する。EMT プロセスに付随して起こる遺伝子発現の変化は、Snail、Slug、Twist、Zeb1、Zeb2 などの E カドヘリンの発現を抑制する、いわゆる EMT 転写因子群によって媒介されることが知られているが、E カドヘリン以外のこれらの転写因子によって制御される遺伝子も多く、EMT のプロセスは非常に複雑なネットワークを形成している。さらには、標的とする mRNA の翻訳を阻害したり、安定性を低減するとされるマイクロ RNA (miRNA) もそのネットワークの重要な要素の一つである。たとえば、miR-200 ファミリーとその標的である ZEB はお互いに負のフィードバックループを形成することで EMT を制御するなど、その過程の様々な部分に複数の miRNA が関与することが報告されている。

### 2. 研究の目的

EMT により細胞の性質は大きく変化するため、その検出は困難ではないが、細胞レベル・分子レベルでの検証には時間がかかる。そこで、EMT の主要マーカーである E-カドヘリン (Ecad)、ビメンチン (Vim) の発現の増減をそれぞれ由来の異なるルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子の発現の増減を同期させデュアル Luc アッセイ (DLA) で EMT を検出できる EMT 可視化細胞を構築し、EMT の研究、特に治療刺激による EMT 誘導のメカニズム解析、特に EMT とがん幹細胞の形成のメカニズムを見だし、shRNA などの RNAi を利用したその制御を最終的な目的として本研究に着手した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用細胞

本研究では、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した HCT15、HCT116 (ヒト結腸腺がん由来細胞株)、DU145 (ヒト前立腺がん由来細胞株)、HepG2 (ヒト肝がん由来細胞株)、HaCaT (ヒト表皮角化細胞株) を使用した。

#### (2) EMT の可視化細胞の構築

EMT 可視化のために上皮系細胞マーカーの Ecad 遺伝子と間葉系細胞マーカーの Vim 遺伝子の下流に、それぞれの遺伝子の発現に同期して発現するように、異なる由来の Luc 遺伝子をウイルス由来の 2A 配列を挟んで CRISPR-Cas9 ゲノム編集を利用して導入した。

まず Ecad 遺伝子下流を標的にしたガイド RNA (gRNA) を発現するベクターとその gRNA による切断部位近傍のゲノム DNA 配列を含む組換え用ベクターを同時に細胞に導入した。相同組換えによってウミシイタケ Luc (hRLuc) 遺伝子と同時にゲノム中に導入されるピューロマイシン耐性遺伝子により付与されるピューロマイシン耐性で選択した。選択後、Cre リコンビナーゼ発現ベクターを導入することで、挟み込むように位置する LoxP 部位でピューロマイシン耐性遺伝子を脱落した。脱落を確認後、Vim 遺伝子下流を標的にした gRNA を発現するベクターとその gRNA による切断部位近傍のゲノム DNA 配列を含む組換え用ベクターを同時に細胞に導入し、相同組換えによってホタル Luc (FLuc) と同時にゲノム中に導入されるピューロマイシン耐性遺伝子により付与されるピューロマイシン耐性で選択し、ゲノム中の異なる 2 カ所に異なる由来の Luc 遺伝子を導入した細胞を構築した。

#### (3) 培養細胞へのがん治療刺激

以下の条件で、各種 EMT 可視化細胞に刺激を与えた。刺激後、12~96 時間後に DLA で行った。

##### 放射線刺激

50 万個程度の DU145、HaCaT、HCT15、HepG2 細胞由来の EMT 可視化細胞を撒いた 35 mm の培養皿を一晚培養後に、放射線照射装置 MBR-1520-3 (日立メディコ社) を使用して、5 Gy/min の線量率で照射した。

##### 超音波刺激

50 万個程度の DU145, HaCaT, HepG2 細胞由来の EMT 可視化細胞を撒いた 35 mm の培養皿を一晩培養後に、超音波照射装置 (OG 技研, ES-2) を使用して、0.4 W/cm<sup>2</sup> で、20 秒、Duty factor 10% で照射した。

#### 紫外線刺激

50 万個程度の HepG2 と DU145 由来の EMT 可視化細胞を撒いた 35 mm の培養皿を一晩培養後に、UVA ならびに UVB を発生する紫外線照射装置を利用し、UV 発生管から 50 cm 離して 15 秒、30 秒、60 秒照射した。UVA の照射では細胞に変化はほとんど認められなかったが、UVB を 60 秒照射した場合、一部の細胞が細胞死の聴講を見せ始めた。

#### 大気圧プラズマ刺激

各ウェルに 4 万個程度の DU145, HaCaT, HepG2 細胞由来の EMT 可視化細胞を撒いた 24 ウェルプレートの培養皿を一晩培養後に、自作のプラズマ照射装置を使用して、35 mm 細胞培養さらに添加した 4 ml の細胞成長培地に 2 分間プラズマを照射した。このプラズマ照射培地を 1.5 倍、3 倍に希釈して、培地交換後 48 時間、72 時間培養して DLA をおこなった。

#### (4) EMT の検出

刺激後適当な時間培養し、細胞を様々なアッセイに供して細胞が EMT を起こしているかどうかの判断を可視化細胞の利用ということでは DLA がメインであるが、様々なアッセイを行った。DLA は、DLA キット (プロメガ) を利用し、マニュアルに沿って実施した。DLA によって EMT を起こしていると思われる細胞については、細胞形態の変化、細胞遊走能アッセイ (wound-healing assay) および EMT 転写抑制因子の定量などにより確認した。

#### (5) 遺伝子発現の検出・定量

遺伝子発現の定量は、リアルタイム PCR (転写レベル) およびウエスタンブロッティング (翻訳レベル) により行った。前者リアルタイム PCR では、様々な処理の後に細胞より抽出した全 RNA をもとに逆転写酵素を利用した cDNA 合成を行い、目的遺伝子の一部に相補的な配列をもとに合成した DNA をプライマーとして利用し、SYBR グリーン取り込みによる定量的リアルタイム PCR を行った。ハウスキーピング遺伝子の一つである GAPDH 遺伝子との CT の比較により相対的な定量を行なった。後者ウエスタンブロッティングでは、様々な処理の後に細胞を RIPA バッファーで溶解し、定量後に Leamli 変性バッファー中で 95 °C、5 分間処理した。これを SDS-PAGE にてタンパク分離を行い、ニトロセルロース膜に転写後、特異抗体を反応させた。この特異抗体に反応した二次抗体に結合したホースラディッシュペルオキシダーゼの反応による化学発光を利用して検出し、イメージアナライザに取り込み解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) EMT 可視化細胞の確認

まず、構築した EMT 可視化細胞が設計通りに構築できていることを確認するために、ゲノム DNA を抽出し、PCR を利用して構造の確認を行った。プライマーの結合配列に外来遺伝子導入部位近傍の配列と導入した外来遺伝子の配列を選択してゲノム DNA を鋳型に PCR を行い増幅する DNA の解析をおこなうことで、外来遺伝子の導入とその部位の確認を実施した。導入した二つの遺伝子について部位の上流と下流のそれぞれを調べたところ、すべての細胞で目的の遺伝子が目的の部位に設計通りに導入されていることが確認された (Data Not Shown)。

次に、多くの細胞に EMT を引き起こすことが確認されている TGF- $\beta$  1 で処理した。また、細胞を 1 mM 程度の Sodium Butylate (SB) で処理することで EMT とは逆の反応である MET を引き起こすことができる。これら 2 つの処理の後に EMT 可視化細胞の Ecad 遺伝子および Vim 遺伝子の発現と 2 種類の Luc 遺伝子の発現変化を確認した。結果の一部を図 1 に示す。調べた細胞すべてにおいて SB または TGF- $\beta$  1 を含む培地で培養した場合、SB によって Ecad 遺伝子の発現が増加し、TGF- $\beta$  1 によって Ecad 遺伝子の発現減少することが定量的リアルタイム PCR とウエスタンブロットで確認された。また、これに

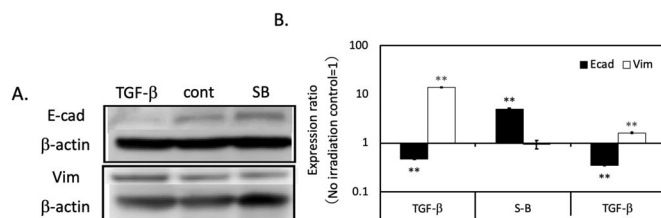


図 1 DU145由来EMT可視化細胞のEcadおよびVim発現の変化とhRLucとFLucの同調発現変化

(A)ウエスタンブロッティングによるEcadおよびVim発現変化の解析、(B)リアルタイムPCRによるEcadおよびVimの発現変化とデュアルルシフェラーゼアッセイによるhRLucとFLucの発現変化

する結果が DLA でも得られており、Luc 遺伝子の発現が定量的リアルタイム PCR およびウエスタンブロットの結果を反映するものである事が示され、EMT モニター細胞が予想通りの働きをしている事が確認された。

### (2) 放射線による EMT の誘導とそのメカニズムの解析

がん治療に利用される刺激でも EMT が引き起こされることがすでに指摘されている。可視化細胞の働き確認と、それらの解析を行うためにまず放射線照射をおこなった。異なる 4 種類の EMT

モニター細胞に 2, 4, 8 Gy の X 線を照射してから 24 時間後に細胞を回収して DLA を行なった。結果を図 2 に示す。それぞれのルシフェラーゼ遺伝子の発現量は細胞間で異なっているため、放射線を照射していないそれぞれの EMT モニター細胞の値を 1 とし、それに対する割合で変化を表した。Ecad 遺伝子の発現減少と Vim 遺伝子の発現増加という EMT に特徴的な両遺伝子の発現変化は DU145, HepG2 由来 EMT モニター細胞で認められた。EMT が引き起こさ

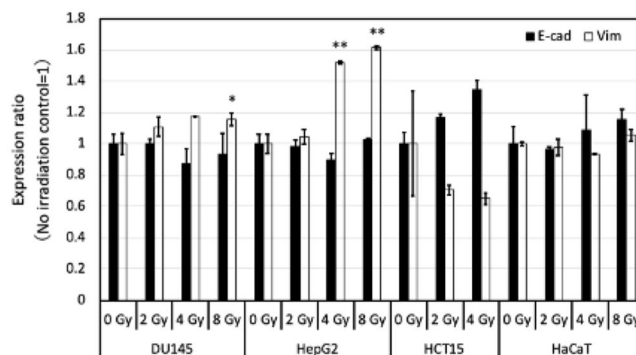


図2 放射線照射によるEMT可視化細胞のhRLuc (Ecad) と FLuc (Vim) の発現変化

れていることをさらに確認するために、放射線照射後の細胞の形態変化を調べると DU145 細胞と HepG2 細胞で、細胞間接着が失われ、紡錘状形態へと変化した EMT に特徴的な細胞の存在が認められた。また細胞の遊走能を調べてみると、wound-healing assay で、放射線を照射した細胞の方が早いスクラッチの修復を示し、さらに EMT 転写抑制因子として知られている Snail、Zeb1 の発現が放射線照射後増加していることが示された。これらの結果は、これまでの報告で示されているように、放射線で EMT が誘導されることを示している。しかしながら、大腸がん由来の HCT15 細胞や正常ヒトケラチノサイト由来の HaCaT 細胞では EMT の誘導は認められなかった。

次に放射線による EMT 誘導のメカニズムの解析を試みた。放射線誘導により細胞に引きこされる大きな変化の一つは酸化ストレスである。そこで、放射線誘導 EMT に対する抗酸化剤である N アセチルシステイン (NAC) 添加効果について検討をおこなった。培地に 1 mM の NAC を添加して放射線を照射した場合、添加しない場合と比較して、Ecad の発現を反映する hRLuc の発現減少と Vim の発現を反映する FLuc の発現増加が弱められる事が示され、酸化ストレスが放射線誘導 EMT に関与する事が示唆された。

また、EMT の誘導において最もよく知られており詳しく調べられているのは TGF- $\beta$  の関与である。そこで X 線誘導性の EMT に TGF- $\beta$  の関与がないか、TGF- $\beta$  ファミリー遺伝子であるのうち代表的なリガンドである TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  2 と受容体である T $\beta$ RI、T $\beta$ RII 発現について 4 Gy の X 線照射による発現変化を定量的リアルタイム PCR で解析した。その結果、受容体の遺伝子の発現は変化がなかったが、TGF- $\beta$  1 および TGF- $\beta$  2 の線量依存的な発現増強が示され、その関与が示唆された。そこで、これらの関与をより明確にするために TGF 受容体阻害剤存在下での放射線による EMT 誘導について EMT 可視化 HepG2 細胞で DLA により調べてみたところ、hRLuc 遺伝子つまり Ecad 遺伝子の発現は減少が緩和され、また、同様に、増加していた FLuc 遺伝子つまり Vim 遺伝子の発現は抑制され、より非照射コントロール細胞のものに近づくことが示された。これらの結果は X 線誘導性 EMT に TGF- $\beta$  シグナル経路が関与していることをより強く示唆している。さらには、NAC 存在下で TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  2 の発現増強が抑制されることなども見だし、放射線照射による細胞への酸化ストレスが、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  2 の発現増強を引き起こし、この経路の活性化を通して EMT が誘導されるというメカニズムが推測された。

EMT とがん幹細胞の形成は密接な関係にある事が指摘されている。そこで、放射線誘導 EMT でもがん幹細胞形成が促進されているかについて検討した。がん幹細胞は、幹細胞と似た様々な表現系を示すが、その中の一つに幹細胞マーカーの発現増加がある。そこで、4 種類のがん細胞マ

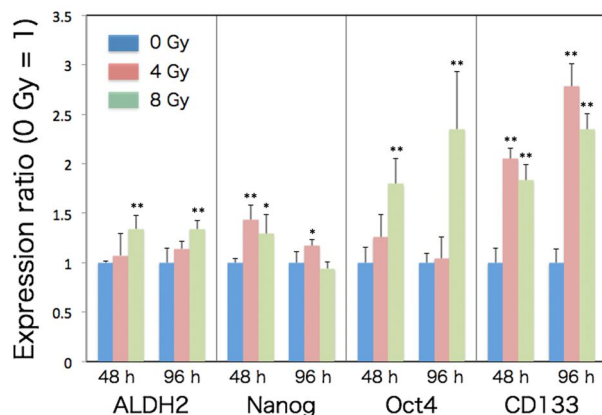


図3 放射線照射によるCSCマーカーの発現変化

ーカーについて、HepG2 細胞への放射線照射後の発現動向についてリアルタイム PCR で調べてみた。0、4、8 Gy 照射した 48 時間ごと 72 時間後に細胞を回収してその発現変化をリアルタイム PCR で調べてみた。その結果、調べた全ての幹細胞マーカー遺伝子の発現が増強している事が示され (図 3)、放射線誘導性の EMT でもがん幹細胞の形成が促進されることが示唆された。

### (3) その他刺激による EMT の誘導

放射線以外の刺激についても EMT を誘導するかどうか EMT 可視化細胞を利用して調べてみた。超音波照射による EMT 誘導の可能性については DU145, HaCaT, HepG2 細胞由来の EMT 可視化細胞で検討を行ったが、

HepG2 でのみ照射後 24 時間、48 時間で EMT 様のマーカー遺伝子発現変化が認められた。現在、そのメカニズムについての解析を継続している。紫外線については、UVA の照射ではほとんど変化は認められなかったが、UVB の照射により、HepG2 で照射時間依存的に EMT が誘導されることを見いだした。今後、皮膚がん由来の細胞でも同様の検討を行い、メカニズムの解析に着手する予定である。プラズマで活性化した培養液による刺激では、DU145, HaCaT, HepG2 細胞由来の EMT 可視化細胞で検討を行ったが、HaCaT, HepG2 細胞で条件によっては EMT 様の変化が認められた。メカニズムの解析を含めて、今後も解析を行っていききたい。

#### (4)まとめと今後の展開

本研究において、ゲノム編集を利用し構築した EMT 可視化細胞を利用する事で EMT についての研究が迅速に実施できる事が示された。計画では、これらの細胞を使用して、siRNA ライブラリーなどの利用や、刺激により誘導される EMT に関与する miRNA などの利用により、EMT やその後のがん幹細胞形成の制御の検討を行う予定であったが、いくつかの miRNA について細胞内で発現を試みたが、がん幹細胞制御の検討までには至っていない。しかしながら、本研究についてはさらに継続して、EMT からがん幹細胞形成の分子メカニズムについての解析を続けていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Kato, R. Ogawa, Q.-L. Zhao, A. Sato, G. Kagiya, K. Noguchi, J. I. Saitoh, L. B. Feril, Jr.
2. 発表標題 Establishment of EMT monitoring cells and their use for analyzing EMT induction by therapeutic stimuli.
3. 学会等名 International Congress of Radiation Research 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	鍵谷 豪 (KAGIYA Go) (30524243)	北里大学・医療衛生学部・准教授  (32607)	ベクター構築、遺伝子発現解析など
連携研究者	趙 慶利 (ZHAO QingLi) (90313593)	富山大学・学術研究部医学系・助教  (13201)	遺伝子発現解析など