

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15231

研究課題名(和文) 悪性中皮腫の発生・悪性化・中皮細胞の上皮間葉転換にかかわる新規遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel genes contributing to pathogenesis, progression and Epithelial-Mesenchymal Transition in malignant mesothelioma

研究代表者

奥田 真帆 (Okuda, Maho)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：50803441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫の詳細な発症メカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究ではがん細胞の悪性形質の一つであるアノイクス抵抗性に関する遺伝子の探索を目的として、研究代表者の所属する研究室にて樹立されたヒト正常不死化中皮細胞株HOMCをモデル細胞に用いて、ゲノム編集技術を利用した網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングを実施した。その結果、アノイクス抵抗性を獲得した細胞において多くノックアウトされている遺伝子として、悪性中皮腫の主要な遺伝子異常の一つであるNF2遺伝子に加えて、今までに悪性中皮腫との関連が報告されていない新規の遺伝子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫は既存の分子標的薬に抵抗性を示すことから予後が非常に悪く、発症メカニズムに基づく新規治療標的薬の開発が求められている。本研究では全遺伝子を対象とした遺伝子ノックアウトスクリーニングにより、健康人由来のヒト正常不死化中皮細胞株によるアノイクス抵抗性の獲得に寄与する遺伝子として新規の候補遺伝子を複数同定することに成功した。今後は本研究により得られた候補遺伝子の中皮細胞における機能解析を通して、悪性中皮腫の発症メカニズムが解明されることで、悪性中皮腫に対する新規薬剤ターゲットやバイオマーカーの同定に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The detailed pathogenesis of malignant mesothelioma remains unclear. In this study, we carried out a genome-wide gene knockout screening using CRISPR/Cas9 system to explore genes involved in acquisition of anoikis resistance, which is considered one of the hallmarks of the malignant phenotypes of cancer cells. Through the screening performed on the human immortalized normal mesothelial cell line (HOMC) established in our laboratory, we successfully identified the NF2 gene, which is one of the major gene mutations in malignant mesothelioma, as well as novel genes that have not been reported to be associated with malignant mesothelioma.

研究分野：分子生物学

キーワード：悪性中皮腫 アノイクス抵抗性 がん化 不死化正常中皮細胞株 CRISPR/Cas9 ゲノムワイドノックアウトスクリーニング ゲノム編集 上皮間葉転換

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臓器を保護する胸膜・腹膜等の表面に存在する中皮細胞は、アスベスト曝露を主因としてがん化し、悪性中皮腫を発症する。悪性中皮腫は予後が極めて悪く、既存の分子標的薬に抵抗性を示すことなどから、新規治療標的薬の開発が必要とされる。本研究では、特に下記の2点に着目して研究を実施し、新規治療標的薬の開発に貢献する。

#### (1) 中皮細胞がん化の分子機構について

悪性中皮腫は、がん抑制遺伝子である NF2、CDKN2A、BAP1 の不活性化変異を主な原因として発症する希少がんである (Bueno et al., Nat. Genet., 2016)。研究代表者の所属する研究室では、NF2 遺伝子変異による Hippo シグナル伝達系の不活性化が悪性中皮腫発症に強く関与することを明らかにし (Sekido et al., Cancer Res., 1995; Murakami et al., Cancer Res., 2011; Tanaka et al., Oncogene, 2015)、さらに Hippo シグナル伝達系の不活性化により誘導される転写調節因子 YAP/TAZ の恒常的活性化が腫瘍形成を促進することを示している (Yokoyama et al., Carcinogenesis, 2008; Mizuno et al., Oncogene, 2012)。しかし近年、YAP/TAZ 活性化のみでは中皮細胞がん化は起こらず、さらに他の因子の関与が必要であることを明らかにしており (Kakiuchi, et al., Carcinogenesis, 2016)、発がんに関わる分子機構の全容解明に向けて、さらなる解析が必要とされている。

#### (2) 悪性中皮腫の肉腫型を決定する分子機構について

悪性中皮腫には3種類の主要な組織型 (上皮型、肉腫型、二相型) が存在する。肉腫型が最も悪性度が高く、予後不良であるが、これら固有の組織型を形成する原因となる遺伝子異常は特定されていない。上皮型/肉腫型間の遺伝子発現プロファイルのクラスター解析では、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) に関する遺伝子が複数同定されており (Bueno, et al., Nat. Genet., 2016)、肉腫型の形態は EMT と密接に関係することが示唆されている。また、正常中皮細胞は刺激によって上皮型から間葉型へ容易に移行する (Yanez-Mo et al., NEJM, 2003, etc.) ことから、肉腫型を形成する悪性中皮腫細胞は、上皮型の悪性中皮腫細胞の分化によって形成されるだけでなく、間葉型へと移行した中皮細胞のがん化によっても形成される可能性が高いと考えられる。しかし、中皮細胞の EMT を惹起する分子、分子機構についてはほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、CRISPR/Cas9 システムによる全遺伝子を対象とした網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングを実施し、正常不死化中皮細胞に造腫瘍能を付与する遺伝子、もしくは EMT を惹起する遺伝子を同定し、悪性中皮腫の発生・悪性化に関与する分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞株

研究代表者が所属する研究室で樹立・保有されている、上皮型、間葉型、そして中間型のそれぞれの形態を示す正常不死化中皮細胞 HOMIC (Human Omental Mesothelial Cell line) をモデル細胞株に用いた。

#### (2) 網羅的遺伝子ノックアウト細胞群の作製 (遺伝子ノックアウト HOMIC)

Addgene から Genome-scale CRISPR Knock-Out (GeCKO) v2 human pooled library を購入し、プロトコルに従ってプラスミドの増幅およびレンチウイルスの調製を行なった。まず上皮型 HOMIC に Cas9 遺伝子を導入して Cas9 の安定発現細胞株を樹立した後、ガイド RNA 配列を搭載した レンチウイルスライブラリーを感染させ、薬剤セレクションにより遺伝子ノックアウト HOMIC を作製した。

#### (3) スクラッチアッセイおよびボイデンチャンバーアッセイによる細胞運動能の評価

スクラッチアッセイは HOMIC 3 株を 6 ウェルプレートに培養し、100% コンフルエントなった状態で、ピペットチップでウェルにひっかき傷をつけて溝を作製し、顕微鏡を用いて溝をタイムラプス観察した。ボイデンチャンバーアッセイでは、細胞をボイデンチャンバーの上層に播種し、一定時間培養後にメンブレンを通過して下層に移動した細胞を固定・染色により計数、またはスクレーパーを用いて回収して血球計算板により計数した。

#### (4) アノキス抵抗性アッセイ

HOMIC 3 株を 0.5% メチルセルロース-RPMI1640 培地に懸濁し、6000 cells/cm<sup>2</sup> になるように

超低接着表面加工されたフラスコに播種して2週間浮遊培養した。2週間の培養の後、細胞培養液に通常のRPMI培地を加えて粘性を下げ、接着細胞培養用のフラスコに移した。翌日フラスコ底面に接着した生細胞のみをトリプシン処理して回収し、細胞数を計数した。

(5) アノイクス抵抗性獲得細胞スクリーニングおよびノックアウト遺伝子の同定 (図1)

遺伝子ノックアウトHOMCを、(4)と同様に2週間浮遊培養した後、接着細胞培養用のフラスコに移した。細胞を2日間培養し、底面に接着した生存細胞をスクレイパーで集め、遠心分離により回収した。細胞からフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によってゲノムDNAを精製し、ゲノムDNAを鋳型としてHT Sequencing Kits (Illumina)を用いてガイドRNA領域をPCR増幅した。その後、Illumina社ハイスループットシーケンシングを行い、各ガイドRNA配列の出現頻度の解析や、標的遺伝子の同定を行った。

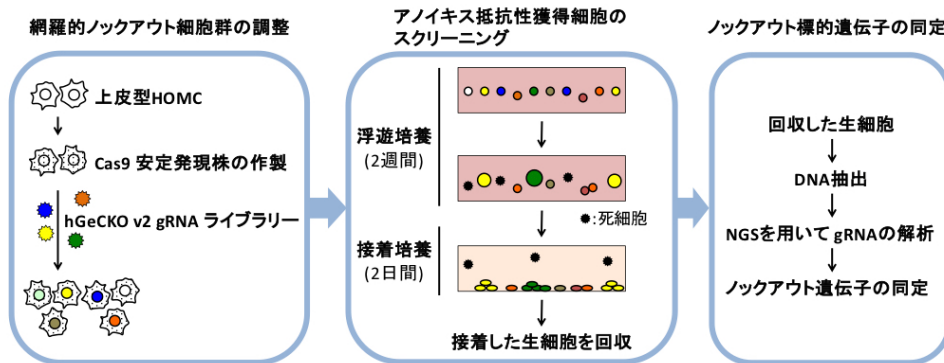


図1. CRISPR/Cas9システムを用いた網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングによるアノイクス耐性獲得に関与する遺伝子の探索の概要

4. 研究成果

(1) 上皮間葉転換を起こした細胞のスクリーニング方法の検討

上皮間葉転換により間葉系形質を獲得した細胞は運動能が亢進することに着目し、網羅的遺伝子ノックアウト細胞群から、より高い運動能を獲得した細胞をボイデンチャンバーアッセイ法によって分離するスクリーニング方法について検討した。予備実験として細胞極性を制御するRac1の活性型(G12V)および不活性型変異体(T17N)を発現させた運動能亢進・低下モデルHOMC細胞を作製し、ボイデンチャンバーアッセイを行ったところ、一定時間内にメンブレンを通過する細胞数に違いが見られた(図2)。続いて運動能亢進HOMCを親株である上皮型HOMCと混ぜてボイデンチャンバーアッセイを行ったが、上皮型HOMC自体の運動能が高いため、運動能亢進モデルHOMC細胞を安定して分離することが困難であることが判明した。さらにスクラッチアッセイにより上皮型HOMCと間葉型HOMCの運動能を比較すると、両者に大きな差が見られなかったことから(図3)、上皮型HOMCは上皮間葉転換を起こしても運動能が大きく亢進しない可能性が高く、上皮間葉転換を起こした細胞のスクリーニングには運動能以外の形質を利用したアッセイ系を探索する必要があると考えた。

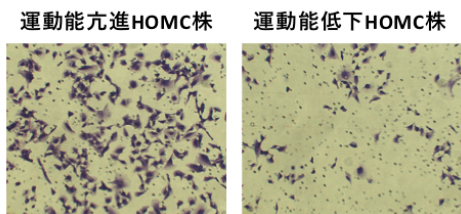


図2. ボイデンチャンバーアッセイによる運動能亢進・低下モデルHOMC株の運動能比較

同一時間内にメンブレンを通過し、下層側に移動した細胞を固定し、ギムザ染色した。

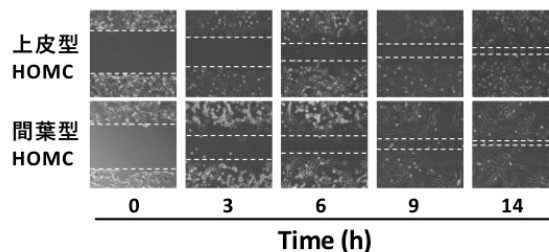


図3. スクラッチアッセイによる上皮型HOMCと間葉型HOMCの運動能比較

(2) アノイクス抵抗性アッセイとスクリーニング方法の確立

HOMC 3株についてアノイクス抵抗性アッセイを実施したところ、上皮型HOMCのみが浮遊条件下で細胞死を引き起こすことが判明した(図4)。一方で、上皮型HOMCに腫瘍形成を促進する転写コアクチベーターであるYAPの活性型変異体遺伝子を導入・発現させると、2週間の浮遊培養における細胞増殖率は大きく上昇した(図5)。さらに活性型YAP発現HOMCと親株である上皮型HOMC

を浮遊状態で共培養したところ、生存細胞において変異型 YAP 発現 HOMC が濃縮されていたことから、浮遊培養によるアノキス抵抗性獲得細胞のスクリーニングが機能すると判断した。

### (3) アノキス抵抗性獲得細胞スクリーニングとノックアウト遺伝子の同定

網羅的遺伝子ノックアウト HOMC を (2) で確立した条件下で浮遊培養し、アノキス抵抗性を獲得した細胞をスクリーニングした。回収された生存細胞のゲノム DNA に含まれるガイド RNA 配列について次世代シーケンサーによる解析を行い、増幅率および p 値から候補遺伝子を選出した。候補遺伝子の中で最も有意に増加が認められたのは、*NF2* 遺伝子および *NF1* 遺伝子だった。*NF2* 遺伝子の不活性化変異は悪性中皮腫の主要な遺伝異常の一つであり、また *NF1* 遺伝子は様々ながん種において不活性化変異が認められるがん抑制遺伝子である。この結果は、本研究のスクリーニングが細胞のがん化に関与する遺伝子の探索に有効であることを裏付けている。さらに候補遺伝子のうち、有意ではないものの増加の傾向を示した遺伝子の中には、酸化ストレス応答因子など複数のアポトーシス関連因子に加えてリンパ球の移動に関連する遺伝子などが含まれていた。これらの遺伝子の中には、現在までに中皮細胞や悪性中皮腫との関連が報告されていない遺伝子も多く、今後はこうした候補遺伝子の中皮細胞および悪性中皮腫における機能や発現制御機構の解析を通して、悪性中皮腫発症の分子機構の解明が進むことが期待された。

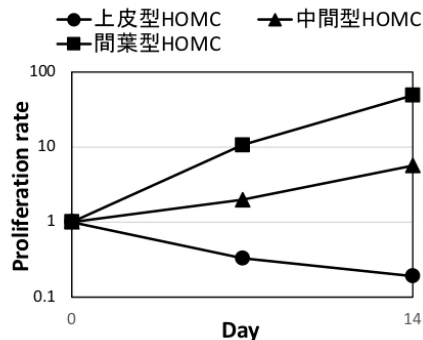


図4. 足場非依存的増殖条件下におけるHOMC 3株の増殖能比較

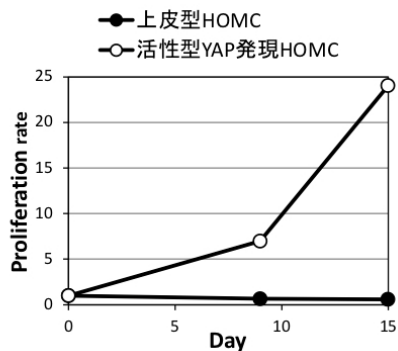


図5. 浮遊条件下における上皮型HOMCおよびアノキス耐性モデルHOMCの増殖能の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsushita Akihiro, Sato Tatsuhiro, Mukai Satomi, Fujishita Teruaki, Mishiro-Sato Emi, Okuda Maho, Aoki Masahiro, Hasegawa Yoshinori, Sekido Yoshitaka	4. 巻 38
2. 論文標題 TAZ activation by Hippo pathway dysregulation induces cytokine gene expression and promotes mesothelial cell transformation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1966 ~ 1978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0417-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------