

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18089

研究課題名(和文)細胞系譜解析を用いたSOX2の大腸癌幹細胞としての役割解明

研究課題名(英文)Elucidation of role of Sox2 in cancer stemness of colorectum using Sox2-GFP knock-in mouse

研究代表者

池嶋 遼(Ikeshima, Ryo)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：60745397

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): Sox2 mRNAのリアルタイム発現をGFP蛋白の緑色蛍光によってモニタリングできるマウスを作成した。化学発癌によって人工的にマウスに大腸癌を作り、緑色蛍光を発する癌細胞と蛍光を発しない癌細胞とをFACSで回収し、RT-PCRで各種の癌幹細胞マーカーを測定したところSox2陽性細胞は軒並み全ての癌幹細胞マーカーが高値を示した。このことはSox2発現が化学発現させた大腸癌の癌幹細胞のドライバー遺伝子と連動することを示唆する。大腸癌細胞からシングルセル解析によってSox2陽性細胞が発現する遺伝子セットを同定した。この中に新規の癌幹細胞遺伝子が存在する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sox2はiPS細胞を作るのに必要な山中4因子の一つであり、癌幹細胞が自身の分化細胞を作り癌組織を形成してゆく過程で動員される可能性がある。Sox2遺伝子の発現を可視化した遺伝子改変マウスから採取した大腸癌の細胞を調べた結果、Sox2陽性細胞はLgr5やDcl1、CD133などの癌幹細胞マーカー高発現していた。Sox2陽性細胞の遺伝子発現プロファイルを調べることで新規の癌幹細胞マーカーを見出す可能性があり、11個の候補遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文): Clinical survey indicated that high Sox2 mRNA expression was associated with disease recurrence. In vitro analyses indicated that Sox2 positive cells had resistance to chemotherapy such as 5-FU and oxaliplatin, and produced mouse tumors with smaller number of cancer cells. We then developed Sox2-GFP knock-in mouse in which green fluorescence protein indicates existence of Sox2 mRNA expression. Using azoxymethane and sodium dextran sulfate we produced colorectal cancer in mouse. When we measured a series of cancer stem marker including Lgr5, Klf5, CD133, Dcl1, and so on, GFP-positive tumor cells expressed high level of CSC markers. This suggests that Sox2 expressing cancer cell may reflect existence of cancer stemness in colorectal cancer. We have identified a set of gene expression profile that is specific to Sox2 positivity. This gene set may be useful to assess novel cancer stem markers.

研究分野：癌幹細胞、大腸癌

キーワード：Sox2 癌幹細胞 シングルセル解析 大腸癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CD44 や CD133 などの細胞表面マーカーでは癌幹細胞と非癌幹細胞を正確に分離することができず癌幹細胞の明確な特定は困難である。近年、未分化マーカーの Sox2 (SRY (sex determining region Y)-box2) が皮膚癌の癌幹細胞マーカーであると報告された。Sox2 は、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作成時に必須の山中 4 因子に含まれる未分化マーカーとして知られている。Boumahdi らは近年皮膚癌領域において、Sox2 遺伝子のプロモーターの下流に蛍光蛋白 GFP を挿入することで Sox2 発現細胞を緑色に可視化させた Sox2-GFP マウスの皮膚に発癌を起し、GFP 発現細胞 (=Sox2 陽性細胞) と GFP 非発現細胞 (=Sox2 陰性細胞) を Flow cytometry で分離して免疫不全マウスの皮下に移植したところ、GFP 陽性細胞の方がより少数で腫瘍を形成したことから Sox2 が皮膚癌幹細胞マーカーであることを示した。

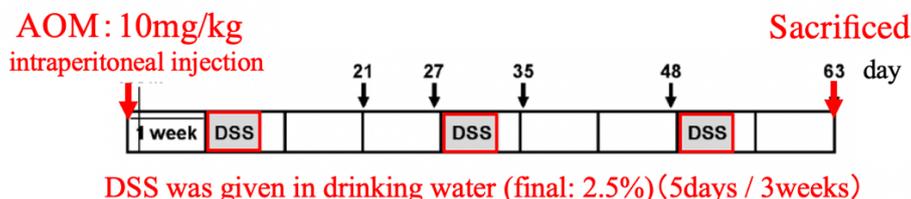
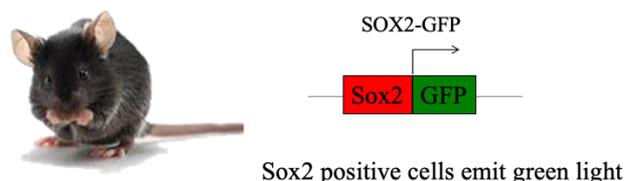
2. 研究の目的

本研究では Sox2-GFP マウスを用いてアゾキシメタン、デキストラン硫酸ナトリウムによって化学発癌させ、大腸癌形成過程を細胞系譜解析によって追跡し、Sox2 が大腸癌でも癌幹細胞となりうるかどうかについて検討する。更に GFP 陽性の癌細胞のシングルセル解析によって、新たな癌幹細胞マーカーを抽出し、治療標的分子の同定を試みる。従来の抗癌剤治療と本研究で同定した癌幹細胞特異的な分子標的治療の併用によって癌の根治を目指す。

3. 研究の方法

- (1) Sox2 mRNA 発現レベルによる大腸癌患者の予後検討
- (2) In vitro 実験における Sox2 発現細胞の挙動に関する検討
- (3) Sox2-GFP knock-in マウスの作成と大腸化学発癌

SOX2-GFP knock-in mice



AOM: Azoxymethane, DSS: Dextran sulfate sodium

(4) 抗 Sox2 抗体によるマウス食道傍基底細胞における Sox2 の発現 (陽性コントロール) の確認と正常大腸粘膜、大腸癌における Sox2 陽性細胞の検討と蛍光顕微鏡による正常大腸粘膜、大腸癌における GFP 陽性細胞の確認

(5) FACS による GFP 陽性細胞の確認: マウス食道粘膜、正常大腸上皮細胞、大腸癌細胞

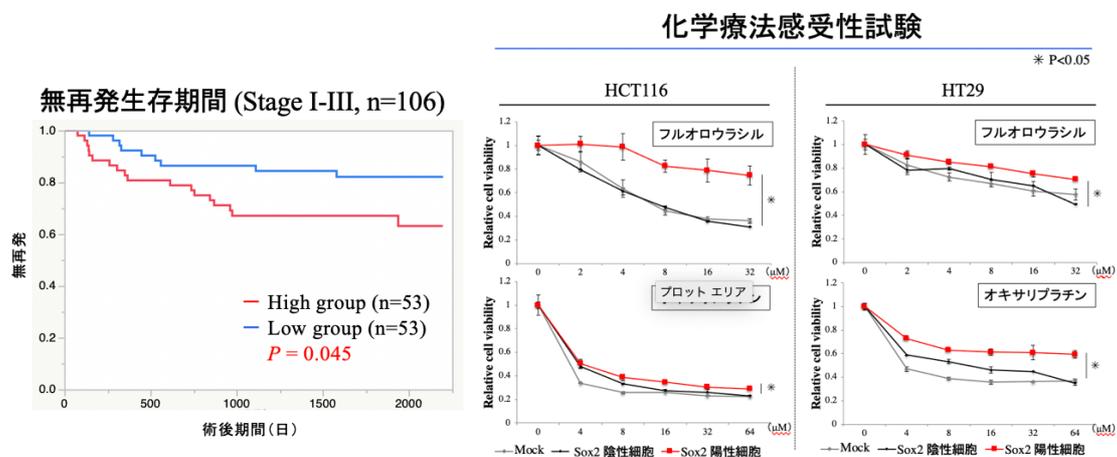
(6) GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞で癌幹細胞マーカー(Sox2, Lgr5, Dclk1, Lrig1, CD133, Klf5)発現を RT-PCR で測定する。

(7) 腫瘍組織から細胞破碎装置 (gentleMACSTM Dissociator) を用いて癌細胞を単細胞化し、CITMSingle-Cell Auto Prep システムを用いて、単一細胞から遺伝子を抽出・増幅した上で RNAseq を行う。GFP 陽性と GFP 陰性細胞との間で差がある遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) 臨床サンプル大腸癌 130 例に対して RT-PCR で Sox2 mRNA を測定し、予後解析を行った。Sox2 高発現群(n=53)は無再発生存期間の短縮と有意に関連した。

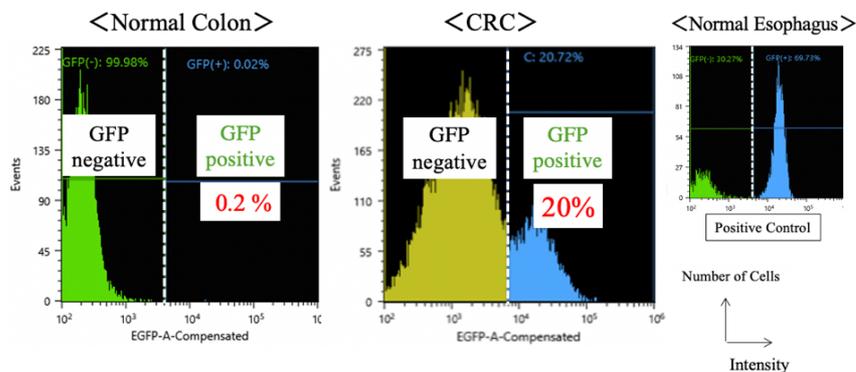
(2) In vitro 実験で Sox2 mRNA 陽性細胞は HCT116、HT29 大腸癌細胞の約 2.5%程度に存在した。Sox2 陽性細胞では CD44v9 や Bmi1 などの癌幹細胞マーカーが有意に発現亢進していた。細胞増殖能は低下し、5-FU やオキサリプラチンなどの抗癌剤に抵抗性を示した。少数の細胞でマウスに腫瘍を造る能力 (造腫瘍性) は亢進した。



(3) Sox2 プロモーターの下流に GFP 遺伝子を挿入したノックインマウスを作成した。AOM を i. p. した後、DSS2.5%を含有した自由飲水を3度加えることで6~8週で大腸癌を作成した。

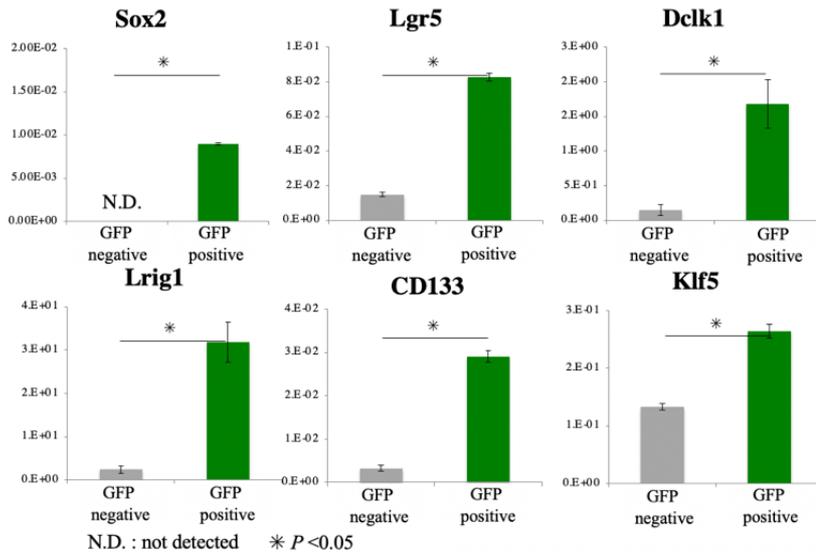
(4) このマウスの食道傍基底層には免疫染色で Sox2 陽性細胞が認められた。また正常の大腸上皮細胞の一部、腫瘍細胞の幾らかに Sox2 陽性細胞、GFP 陽性細胞を認めた。

(5) FACS で GFP 陽性細胞を分離したところ、マウス食道粘膜では 69.7%, 正常大腸粘膜で 0.02%, 大腸癌細胞の 20%に陽性を認めた。



(6) 大腸癌細胞で GFP 陰性と GFP 陽性とで各種のステムマーカーを測定した。

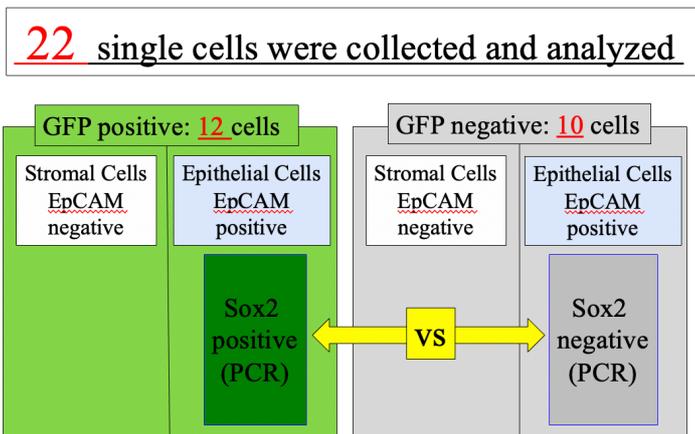
Stem cell marker expression (PCR)



興味深いことに Sox2 陽性細胞は Lgr5, Dclk1, Lrig1, CD133, Klf5 といった癌幹細胞マーカーの著明な上昇を認めた。

(7) 単一細胞で回収した大腸腺癌の 22 個の細胞のうち上皮細胞マーカーである EpCAM 陽性の細胞について PCR にて Sox2 の発現があるものが確認できた細胞と確認できないもので比較して C1 シングルセル解析機器を用いて遺伝子解析を行った。Sox2 陽性細胞で 2.5 倍以上高い発現を示した遺伝子セット (11 個) を同定した。

Selection of Single Cells in CRC



(今後の予定)

個々の遺伝子について新規癌幹細胞マーカーとなるかどうかを検討してゆく予定である。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------