

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08101

研究課題名（和文）がん細胞での遺伝子発現可視化を応用したがん幹細胞生成メカニズムの解析

研究課題名（英文）Application of a gene expression visualization system to analyze cancer stem cell generation

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトがん細胞株のEカドヘリン（Ecad）の遺伝子の下流にウイルスの2A配列を介して発現するDsRedを導入するベクターの構築を試みた。困難であったが、相同組換え領域を延長した改良ベクターの構築により最終的に組換え細胞を構築した。この組換え細胞の一つにOct4の遺伝子の下流に2A配列を介して発現するEGFPを導入するベクターを利用してダブル組換え細胞LNCaP/Ecad-DsR3/Oct4-EGFPを構築した。この細胞で試験をしたが、Ecadの発現抑制とDsRedの発現抑制の程度が完全には一致せず、EGFPの発現抑制が観察されなかった。今後も検討を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の完結により、EMTからCSC形成についての分子経路の解析が可能になる。また、それにより新規がん治療の開発に結びつく可能性がある。さらに、本研究で実施している遺伝子発現の可視化については、さまざまな遺伝子に応用することが可能であり、多くの細胞応答で見られる現象を分子レベルで簡便に解析するためのツールとなる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to construct a vector that introduces DsRed, expressed downstream of the E-cadherin (Ecad) gene in human cancer cell lines via a viral 2A sequence. Despite the difficulties, we successfully generated recombinant cells by creating an improved vector with an extended homologous recombination region. Using a vector that introduces EGFP, expressed downstream of the Oct4 gene via a 2A sequence, we then created double recombinant cells, LNCaP/Ecad-DsR3/Oct4-EGFP. Tests on these cells revealed that the suppression levels of Ecad and DsRed expression did not completely match, and there was no observed suppression of EGFP expression. We plan to continue our investigations in the future.

研究分野：放射線生物学

キーワード：上皮間葉転換 蛍光タンパク CRISPR-Cas9 がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (EMT) は、上皮系細胞の性質を持った細胞がそれらの性質を喪失し、間葉系細胞の性質を獲得する細胞の形質転換である。個体発生や創傷治癒、さらにはがん細胞でも観察される。がん細胞では悪性化過程の一つとされており、治療抵抗性の獲得、転移やがん幹細胞 (CSC) の形成に関与するとされる。

がん細胞は様々な刺激に応答して EMT を引き起こし悪性化する。そこで、どのような刺激が EMT を引き起こすのか、さらには、それらの制御法について検討するために、EMT のマーカー遺伝子である E-カドヘリン (Ecad) の下流に実質的にバイシストロニックな遺伝子発現を実行するためのウイルス由来の 2A 配列を介してウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子を、ビメンチン (Vim) の下流には同様にホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれゲノム編集により導入した様々ながん細胞を構築した。両ルシフェラーゼ遺伝子の発現量は、それぞれの上流遺伝子の発現量を反映すると考えられ、構築した細胞はデュアルルシフェラーゼアッセイによりそれぞれの EMT を把握できる EMT モニター細胞となる。我々は、構築したこれらの細胞を利用して、放射線刺激による EMT 誘導の解析が行えることをすでに示した (Kato ら、ICRR2019, Manchester, UK (2019))。また、これまでに、このシステムを利用することで、放射線以外の刺激でも EMT の促進が観察されたが、その際、CSC 様の性質を示す細胞が増加することも確認できた。このように、細胞の状態を発光や蛍光などの検出の容易な方法で把握できるいわゆる「可視化」により複雑な現象の解析が容易になると考えられる。

CSC は、治療抵抗性を示し、高い腫瘍原性を保持していることから、がん治療後の再発原因の一つと考えられている。EMT を抑制すると CSC 形成が阻害されるなど、EMT が CSC 形成に深く関与していると考えられているが、その詳細なメカニズムは未だに明確ではない。CSC のメカニズムを突き止めることで、発がんや転移や再発を制御することが可能になるかもしれない。

そこで、EMT モニター細胞の作成法を応用し、EMT に関わる遺伝子や CSC のマーカーとなりうる遺伝子の下流にウイルス由来の 2A 配列を介して発現検出の容易な蛍光タンパクの遺伝子などを導入し、これらキー遺伝子の発現をモニターできる、EMT=CSC モニター細胞を構築することで、EMT を引き起こした後の CSC 形成の分子過程の詳細を解析できると考えた。

2. 研究の目的

EMT モニター細胞の由来は 1 つの細胞クローンであるが、放射線刺激により引き起こされる EMT の程度と、その後、CSC 形質を獲得する細胞の割合が照射条件などによって異なることに気がついた。このことから、同じ刺激で EMT を引き起こし、その後、CSC の形質を獲得する細胞群としない細胞群をそれぞれ集めて比較することで、CSC への形質転換メカニズムの解析が可能になるのではないかと考えた。

EMT を介して CSC に至る経路としては、WNT/beta-catenin 経路や SOX2 と YAP が関与するとの報告もあるが、完全には明確になっていないのが現状である。我々は、EMT のスイッチとされる Ecad をノックダウン、あるいは、ノックアウトすることで強制的に EMT を引き起こし、その後の CSC への形質転換の有無で細胞を分画し、それぞれを比較することで CSC 形質転換のメカニズムの詳細を明らかにできると考えている。

本研究では、それぞれのキーとなる遺伝子、あるいは、マーカー遺伝子の下流にそれらの遺伝子の発現を反映するように蛍光タンパク遺伝子など容易に発現を検出できる遺伝子を導入してそれらの遺伝子発現を「可視化」することで、それを目印にセルソーターで細胞を分画すること

が可能になる。これによって同じ刺激でも応答性の異なる細胞集団を集めて解析することで、それぞれの違いを分子レベルで明らかにし、CSC 形成メカニズムの解明に迫ることを第一の目的とした。これにより、CSC 形成をブロックするための標的分子やそのメカニズムを同定することで CSC 形成を阻害しながら放射線治療などを行うことのできる、より効果の高い治療法に結びつけることを最終的な目的としたい。

3 . 研究の方法

(1)細胞培養

ヒト肺癌由来の A549 細胞、ヒト前立腺がん由来の LNCaP 細胞、ヒト前立腺がん由来の DU145 細胞、ヒト肝臓がん由来の HepG2 細胞を使用して、組換え細胞を構築した。これらの細胞は、Health Science Research Resource Bank などから購入し、長く本研究室で利用、保存してきたものである。これらの細胞はすべて、牛胎児血清を 10%と適切な抗生物質を添加した RPMI1640 培地中で、5% CO₂ 雰囲気下の 37 ℃ インキュベーターで培養した。

(2)組み換え細胞の構築

Oct4 をコードする遺伝子の下流にウイルス由来の 2A 配列を介して EGFP 遺伝子を導入するためのベクター、OCT4-2A-eGFP-PGK-Puro (Addgene plasmid #31938) を入手して使用した。この EGFP 遺伝子は Guide-it CRISPR/Cas9 System (TAKARA Bio) を利用した Oct4 の遺伝子下流部位を切断するベクターを同時に細胞に導入することにより相同組み換えの促進を図った。具体的には、60 mm 細胞培養さらに蒔いた細胞に、それぞれのベクター 1 ug を遺伝子導入試薬により同時に導入した。3 日間そのまま培養したのち、細胞の感受性に合わせた濃度のピューロマイシン (Pur) を添加した。その後、コロニーが出現するまで培養し、それぞれの細胞で 3 つずつコロニーを単離、保存した。これらの一部を増殖し、Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (キアゲン社) でゲノム DNA を単離した。これを鋳型に、EGFP 遺伝子の一部の配列とベクターにクローニングされていない上流側 Oct4 遺伝子の一部、また、ピューロマイシン耐性遺伝子の一部と Oct4 遺伝子下流側の配列の一部に結合する合成 DNA プライマーを使用して PCR を行い、その増幅される DNA 断片のサイズで構造を確認した。

E カドヘリン (Ecad) と同調して DsRed を発現する組換え細胞を構築するためのベクターは以下の様に構築した。以前に構築した Ecad 下流に 2A とウミシイタケルシフェラーゼ (hRLuc) を導入するベクターは、ヒト結腸がん由来の HCT116 細胞のゲノム DNA を鋳型に Ecad 遺伝子の最終エクソンを含む領域とそれよりも下流側の領域をそれぞれ相同組み換え用 DNA 断片としてクローニングし、その間に最終エクソンにインフレームで 2A 配列を介して hRLuc さらにその下流側に IRES とさらに Pur 耐性遺伝子を結合した DNA 断片を導入して構築した。このベクターの hRLuc から下流側の Pur までを、DsRed 遺伝子と IRES とハイグロマイシン (Hyg) 耐性遺伝子が結合した DNA 断片とを入れ換えることで、Ecad 遺伝子の下流に同調して発現する DsRed を導入するためのベクター pEcadDsR-Hyg を構築した。組換え細胞は上記の Oct4 遺伝子下流に EGFP 遺伝子を導入する場合の実験と同様に、CRISPR-Cas9 で Ecad 下流を切断するベクターを構築して、両プラスミドを遺伝子導入して構築し、細胞株毎の適正濃度の Hyg 存在下で選択、単離、増殖した。構造の確認も上記の組換え細胞の場合と同様に実施した。

(3)リアルタイム PCR

細胞培養プレート上の培地を吸引除去し、RLT Lysis Buffer (QIAGEN) を 350 ul 添加し、細胞を完全に溶解して回収した。QIASHredder で処理した後に、回収した細胞溶解液を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用してトータル RNA を抽出・精製した。また、on-column で DNaseI 処理も実

施した。RNA の品質は、BioAnalyzer6000 (Agilent Technologies) による解析で行い、RIN が 8 以上のものを使用した。抽出したトータル RNA は、PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio) の添付プロトコールに従い、トータル RNA 1 ug を使用して SYBR Green Assay 用に cDNA を合成した。TB Green Premix EX Taq (Takara Bio Int.) の添付プロトコールに従って定量的リアルタイム PCR 反応混合液を調製し、定量リアルタイム PCR システムストラタジーン Mx3005P (Agilent Technologies) を使用して、95 10 分、[95 10 秒、60 40 秒] × 40 サイクルのシヤトル PCR で測定した。mRNA の発現量は、内部標準として使用した GAPDH の発現量に対する割合として算出した。

(4) siRNA による上流遺伝子のノックダウン

2A 配列で結合した 2 つの遺伝子発現が連動しているかどうかを探るために、上流遺伝子の発現を siRNA で制御した。siRNA は、メルク社のプレデザイン siRNA を使用した。それらの配列は開示されておらず不明であるが、その配列と機能は製品番号で管理されており再現が可能である。一つの遺伝子につき、効果が確認された複数の siRNA が用意されており、それらのうちいくつかを選択して使用した。siRNA は、最終濃度が 30 nM になるように調整し、TransIT-X2 (TAKARA Bio) 試薬を利用して細胞に導入した。導入後、24-72 時間の間に遺伝子発現に関するアッセイを行った。

4 . 研究成果

A549、LNCaP、DU145、HepG2 などのヒトがん細胞由来の株細胞に pEcadDsR-Hyg と Ecad 下流側の部位を CRISPR-Cas9 で切断するためのベクターを同時に導入し、Hyg 存在下でコロニーを形成するクローンを選択した。それらの構造を確認したのちに組換え細胞 A549/Ecad-DsR1、LNCaP/Ecad-DsR1、DU145/Ecad-DsR1、HepG2/Ecad-DsR1 を確立した。さらにこれらのうち LNCaP/Ecad-DsR1 に OCT4-2A-eGFP-PGK-Puro と POU5F1 遺伝子下流側の部位を CRISPR-Cas9 で切断するためのベクターを同時に導入し、Pur 存在下でコロニーを形成するクローンを選択し、二価組換え細胞 LNCaP/Ecad-DsR1/Oct4-EGFP を構築した。

次に、構築した組換え細胞の発現する蛍光が上流遺伝子の発現への応答について解析するために Ecad の発現を抑制する siRNA を LNCaP/Ecad-DsR1 にまず導入した。3 種類の異なる siRNA をそれぞれ導入し、その後ウエスタンブロットやリアルタイム PCR により Ecad の発現を追跡したが、組換え細胞について Ecad の発現が認められなかった。しかしながら、親株の LNCaP をポジティブコントロールとして使用したところ、どちらでも Ecad の発現が確認された。また、A549 細胞でも親株では検出された Ecad が組換え細胞 A549/Ecad-DsR1 では検出されなかったため、組換え体作成過程に問題があると考え、作成するベクターの相同組み換え領域の塩基配列を分析したところ、Ecad の最終エクソンの数塩基が欠失していることが判明した。さらに、抽出した LNCaP/Ecad-DsR1 のゲノムを鋳型に PCR で増幅した最終エクソン部分の延期配列分析でも同じ欠失が確認された。

そこで、Ecad 下流への DsRed 導入組換え用ベクターの新たな構築を試みるのと同時に、Oct4 下流に EGFP を導入した単独の組換え細胞を 4 種類の細胞を使用して A549/Oct4-EGFP、LNCaP/Oct4-EGFP、DU145/Oct4-EGFP、HepG2/Oct4-EGFP を作成した。それぞれの組換え細胞から抽出したゲノムを鋳型に PCR により構造を確認した。さらに、Oct4 の発現をウエスタンブロットおよびリアルタイム PCR により確認した。これらの組換え細胞を使用して EMT や CSC の促進による EGFP 発現の変化についての検討を行った。EMT の促進は、StemXVivo EMT Inducing Media Supplement (RD Systems) を加えた培地で細胞を 72 時間以上培養した。CSC 形成の促進には CSC-Sphere 培地

(20 ng/ml EGF と 40 ng/ml FGF2 および 2% B27 を含む DMEM/F12 培地：参考文献) で細胞を 72 時間以上培養した。培養後、細胞をトリプシン処理後に回収し、それぞれの細胞による緑色蛍光についてフローサイトメーターで解析した。その結果、EMT 促進培地での培養の場合、通常培養のものと比較して EGFP の蛍光強度の変化は大きくなかったが、CSC 形成培地での培養の場合、EGFP の蛍光強度が大きく変化した。細胞の種類や組換え体のクローンの違いにより蛍光強度や処理の違いによる変化が異なったが、CSC 促進培地でもっとも蛍光強度の変化の大きかった LNCaP/Oct4-EGFP について調べてみると、Oct4 をはじめとして幹細胞マーカーとして知られている ALDH、CD133 などが有意に発現を増強していることがリアルタイム PCR により確認された。

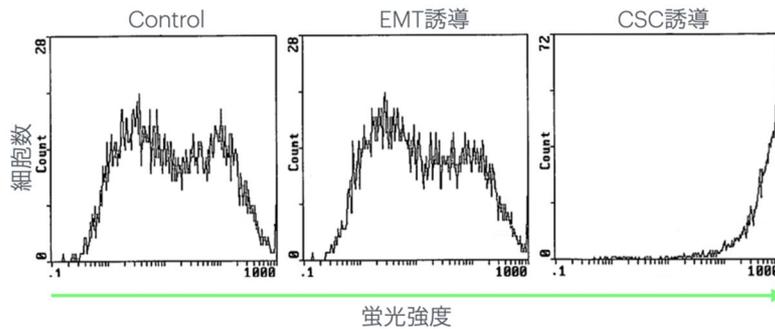


図 EMT 培地、CSC 培地処理後の組換え細胞 LNCaP/Oct4-EGFP の緑色蛍光強度分布

Ecad 遺伝子下流に DsRed を導入するためのベクター構築に関しては、再度クローニングしたが組換え細胞の構築がうまくいかなかった。そこで相同組換え領域を延長して再度構築したところ、Ecad 下流に 2A 配列を介して DsRed を発現する組換え細胞を作成できるベクターの構築に成功した。LNCaP/Oct4-EGFP にこのベクターを導入してダブル組換え細胞である LNCaP/Ecad-DsR3/Oct4-EGFP を取得した。これを使ってまず EMT 促進と CSC 形成の関係についての解析をおこなうために、siRNA を利用して Ecad の発現抑制を試みた。その結果、DsRed による発現がある程度抑えられたが、ウエスタンやリアルタイム PCR で解析した Ecad 発現の程度とは完全には一致しなかった。また、E カドヘリンの発現量が大きくノックダウン (>80%) した状況でも Oct4 下流の EGFP の発現はほとんど変化が見られなかった。

DsRed も EGFP も半減期が長く (>1 日)、非常に安定なタンパクであることが知られている。蛍光を測定したのは Ecad をノックダウンして 48 時間前後である。したがって、それぞれのタンパクの発現低下は始まっていたかもしれないが、うまく検出できなかった可能性もある。現在、継続的に複数回 siRNA を導入して 100 時間以上 Ecad のノックダウンをおこない蛍光タンパクによる蛍光を測定する実験を試みている。また、CRISP-Cas9 による Ecad 遺伝子のノックダウンの検討も始めた。さらには、より半減期の短い蛍光タンパクも知られており今後はそれらの使用も検討したい。さらには、Oct4 だけではなく、幹細胞で特異的に発現するいくつかの遺伝子の下流に蛍光タンパクの遺伝子を導入する検討も行いたい。本研究は、予期できなかったトラブルで、予定よりも大きく遅れ、まだ完成していないが、CSC 形成の分子メカニズムの解明やその新規がん治療への応用を目指して、今後も継続的に検討していきたい。

<引用文献>

Shasha Su ら、Lgr5 Methylation in Cancer Stem Cell Differentiation and Prognosis-Prediction in Colorectal Cancer、PLOS ONE、10 巻、2015、e0143513

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 鍵谷豪、小川良平、畑下昌範	4. 巻 48
2. 論文標題 放射線により誘発する腫瘍ない細胞死の可視化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳美希、小川良平、畑下昌範、兵藤文紀、鍵谷豪
2. 発表標題 高線量X線照射による腫瘍内アポトーシスの誘発メカニズム
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第59回生物部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部なな子、鍵谷豪、小川良平、畑下昌範、兵藤文紀
2. 発表標題 X線による腫瘍内アポトーシス誘発における免疫システム及び腫瘍血管損傷の関与
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第61回生物部会
4. 発表年 2024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・教授 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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	趙 慶利 (Zhao Qing Li) (90313593)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	
研究分担者	渡部 明彦 (Akihiko Watanabe) (20377253)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	

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