

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17688

研究課題名（和文）染色体工学技術を用いた膵がんにおける新規テロメラーゼ抑制遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of telomerase suppressor genes in pancreatic cancer using chromosome engineering

研究代表者

柳生 拓輝（YAGYU, Takuki）

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00867757

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）：膵がんは5年相対生存率が約10%と他のがんと比較しても突出して予後不良であり、新規治療ターゲットの獲得は喫緊の課題である。一方でテロメラーゼは正常細胞ではほとんど機能していないが、多くのがん腫で共通に活性化されており、分子標的として注目されている。本研究では膵がん細胞株にヒト正常3番染色体を導入する実験系を通じて、膵がんにおいてテロメラーゼ抑制遺伝子が3番染色体短腕の特定の領域（3p21.3領域）に存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、膵がんにおいて3番染色体短腕の特定の領域にテロメラーゼ抑制遺伝子（群）が存在することを明らかにした。またその機序は、テロメラーゼ活性中心のTERTのプロモーター活性を抑制することによる可能性が示唆された。この結果により、膵がんの新たな治療ターゲット開発の糸口となることや、膵がん発生メカニズムの理解が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer has an approximately 10% five-year survival rate, which is a remarkably poor prognosis compared to other cancers, and the development of new therapeutic targets is an urgent issue. Telomerase, on the other hand, has little function in normal cells, but is commonly activated in many carcinomas, thus attracting attention as a molecular target. In this study, through an experimental transfection of normal human chromosome 3 into a pancreatic cancer cell line, it was clarified that the telomerase suppressor gene is located in the 3p21.3 region in pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：膵がん テロメラーゼ 3p21.3領域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵がんは早期発見率が低く根治切除が可能な症例が多くないうえに、根治切除後も高い再発率を有し、他のがんと比べ突出して予後不良である。再発・切除不能例には、化学療法が用いられるが、その抑制効果は十分とは言えない。したがって、膵がんの新たな診断法・治療法の開発は急務である。一方、テロメラーゼは、がんに無限の増殖性すなわち不死化形質と造腫瘍性を与える酵素であり、その活性中心タンパクである TERT (Telomerase reverse transcriptase) の発現により、その活性が制御されることが知られており、がん治療の新たなターゲットとして期待されている。

2. 研究の目的

これまで我々は、染色体工学技術である微小核細胞融合法を用いた正常ヒト 3 番染色体の腎細胞がん細胞株、口腔扁平上皮がん細胞株へ導入によって (図 1) がん細胞株におけるテロメラーゼ活性の抑制を誘導することを明らかにした (Abe S et al. Genome Integr. 2010 / Nishio S et al. Biochem Biophys Res Commun. 2015)。本研究では、膵がん細胞株に正常ヒト 3 番染色体を導入することにより、膵がんにおけるテロメラーゼ抑制遺伝子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

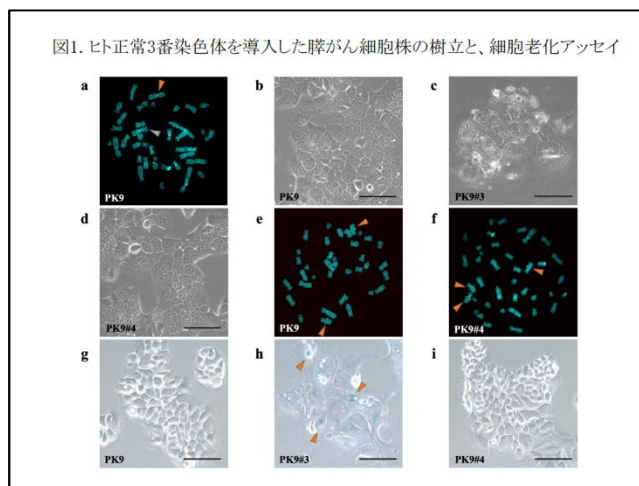
膵がん細胞株 (ヒト ; PK9、マウス ; LTPA) にヒト正常細胞由来の 3 番染色体を導入し、テロメラーゼ活性の中心を担う TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) の発現抑制効果を検討した。具体的には以下の実験を行った。

- (1) ヒト正常 3 番染色体を導入した膵がん細胞株を樹立 (PK9#3、LTPA#3)
- (2) PK9#3 の細胞老化アッセイ、LTPA#3 を用いた qRT-PCR 法による Tert 発現解析
- (3) LTPA#3 の細胞増殖能、浸潤能の検討
- (4) 任意の領域で切断した 3 番染色体を PK9、LTPA に導入することによるテロメラーゼ抑制遺伝子の染色体領域の特定
- (5) LTPA#3 の Tert プロモーター活性を調べるためのレポーターアッセイ

4. 研究成果

(1) ヒト正常 3 番染色体を導入した膵がん細胞株を樹立 (PK9#3、LTPA#3)

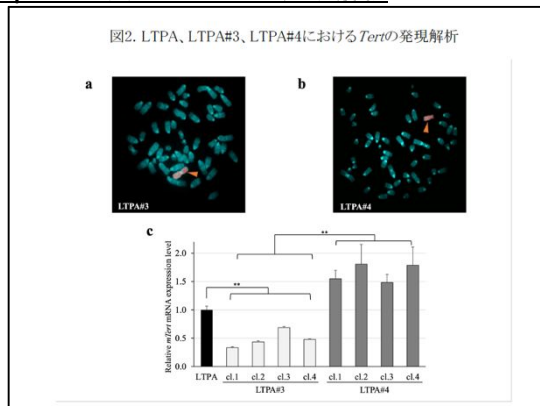
ヒト膵がん細胞株 PK9 の FISH 解析によって、PK9 の片アレルに 3p21.3 領域が欠失していることが分かった (図 1a)。次に、微小核細胞融合法を用いて、正常細胞由来のヒト 3 番染色体を PK9、LTPA にそれぞれ導入した (以後 PK9#3、LTPA#3 と表記)。また Control として 4 番染色体も同様にそれぞれ導入した (以後 PK9#4、LTPA#4 と表記)。その結果、PK9#3 は明らかな細胞形態変化を来し、細胞増殖が停止した。一方で、PK9#4 はそのような変化は見られなかった (図 1b-f)。



(2) PK9#3 の細胞老化アッセイ、LTPA#3 を用いた qRT-PCR 法による Tert 発現解析

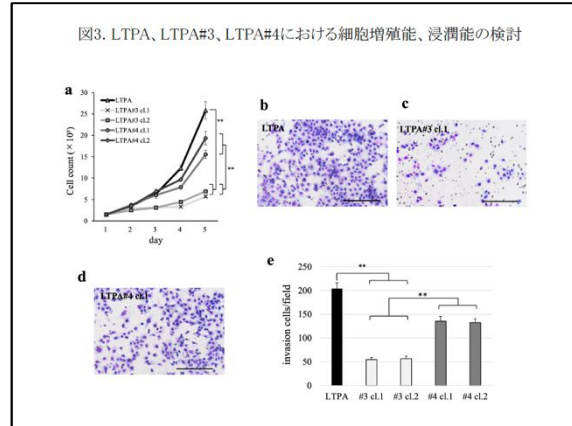
PK9#3 で見られた細胞増殖停止が、テロメラーゼ抑制に起因するものであれば細胞老化を来しているという仮説を立て、PK9、PK9#3、PK9#4 を用いて細胞老化アッセイを行った。その結果、PK9#3 では他の株と異なり、細胞老化が誘導されていることが分かった (図 1g-i)。

次に LTPA、LTPA#3、LTPA#4 を用いて、qRT-PCR 法により Tert の発現解析を行った。その結果、LTPA#3 は親株や 4 番染色体導入株に比べて、優位に Tert 発現が抑制されていた (図 2)。



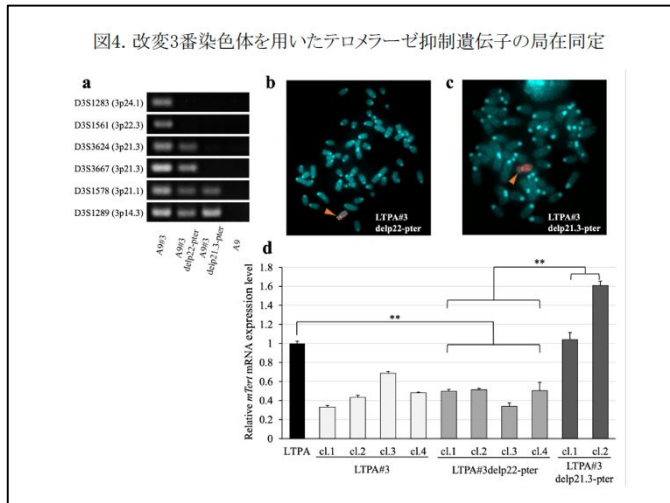
(3) LTPA#3の細胞増殖能、浸潤能の検討

PK9#3で見られた細胞増殖能の変化がLTPAでも同様に認められるか、細胞増殖能を検討したところ、LTPA#3は優位にLTPA、LTPA#4に比べ、細胞増殖能が低下していた(図3a)。また、浸潤能も同様に低下していることが分かった(図3b-e)。



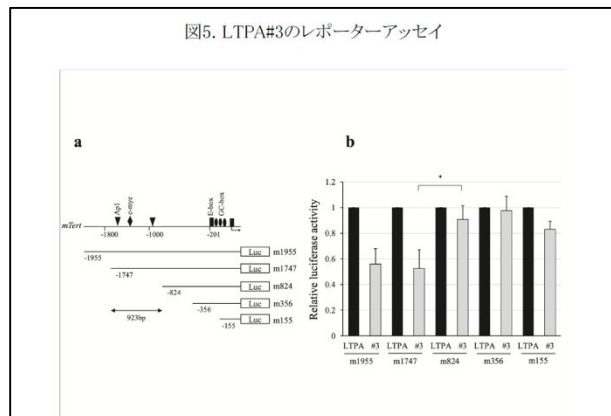
(4) 任意の領域で切断した3番染色体をPK9、LTPAに導入することによるテロメラーゼ抑制遺伝子(群)の染色体領域の特定

これまでの我々の先行研究(Abe S et al. Genome Integr. 2010)から、テロメラーゼ抑制遺伝子の局在が3p21.3領域ではないかという仮説を立てた。これを明らかにするために、2種類の改変3番染色体を用いた。1つは正常3番染色体から3p22~短腕テロメアを削除したもの(delp22-pter)、もう1つは3p21.3~短腕テロメアを削除した(delp21.3-pter)。これをLTPAに導入し(図4a-c) qRT-PCR法によりTertの発現解析を行った。その結果、LTPA#3delp22-pterはLTPA#3同様にTertの発現が抑制されていたが、LTPA#3delp21.3-pterでは、抑制効果は見られなかった(図4d)。このことから、3番染色体上のテロメラーゼ抑制遺伝子(群)は3p21.3領域に局在する可能性が示唆された。



(5) LTPA#3のTertプロモーター活性を調べるためのレポーターアッセイ

TERTの活性調節はプロモーター変異や転写因子によるものが多いが、膵がんにおいてはプロモーター変異の頻度はほとんどないため、これまで明らかとなった3番染色体導入によるテロメラーゼ抑制効果は転写因子による機序によるものという仮説を立てた。Tertのプロモーター領域を任意で削除したプラスミド(図5a)を用い、レポーターアッセイを行い、LTPAとLTPA#3におけるTertプロモーター活性を評価した。その結果、LTPA#3は親株に比べ、Tertプロモーター活性が低下していた。また任意の923bpを削除した段階で、この活性低下は見られなくなった(図5b)。以上の結果から、この923bpに結合する転写因子によってTertプロモーター活性が低下していることが示唆された。



以上の結果から、本研究により、膵がんにおいて3p21.3領域にテロメラーゼ抑制遺伝子(群)が存在する可能性が示唆された。また、その機序は転写因子を介したプロモーター活性の低下であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yagyu Takuki, Ohira Takahito, Shimizu Ryutaro, Morimoto Masaki, Murakami Yuki, Hanaki Takehiko, Kihara Kyoichi, Matsunaga Tomoyuki, Yamamoto Manabu, Tokuyasu Naruo, Sakamoto Teruhisa, Fujiwara Yoshiyuki, Kugoh Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Human chromosome 3p21.3 carries TERT transcriptional regulators in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94711-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yagyu Takuki, Saito Hiroaki, Sakamoto Teruhisa, Uchinaka Ei, Morimoto Masaki, Hanaki Takehiko, Watanabe Joji, Matsunaga Tomoyuki, Yamamoto Manabu, Tokuyasu Naruo, Honjo Soichiro, Fujiwara Yoshiyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Decreased mean platelet volume predicts poor prognosis in patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12893-020-00976-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 柳生拓輝、大平崇人、花木武彦、木原恭一、松永知之、山本 学、徳安成郎、坂本照尚、久郷裕之、藤原義之
2. 発表標題 染色体工学技術を応用した膵がんにおけるテロメラーゼ抑制領域3p21.3の同定
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳生拓輝、大平崇人、清水龍太郎、藤原義之、久郷裕之
2. 発表標題 染色体工学技術を応用した膵がんにおけるテロメラーゼ抑制領域3p21.3の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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