

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06950

研究課題名（和文）順遺伝学的手法を用いた、がん細胞におけるビタミンDシグナル調節因子の網羅的解析

研究課題名（英文）Forward genetic identification of new players in vitamin D signaling.

研究代表者

杉本 幸太郎（Sugimoto, Kotaro）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40791009

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）：核内受容体は脂質リガンドと結合することで遺伝子の転写を調節する転写因子であるが、その活性はリガンドとの結合だけでなくリン酸化などの翻訳後修飾によっても調節されている。しかしながらこれまでの研究は新規リガンドの探索に偏っており、翻訳後修飾に影響する内因性制御因子の同定は不十分であった。本研究では順遺伝学的手法であるCRISPRスクリーニングを用いて、核内受容体の1つであるビタミンD受容体の内因性制御因子を網羅的に抽出した。この候補分子は悪性腫瘍をはじめとする様々な疾患の創薬標的となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンDシグナルはがん治療の標的になり得るが、ビタミンDサプリメントはがんの罹患率や予後を改善しない。よってがん細胞内で減弱しているビタミンDシグナルを活性化させることが有効と思われるが、従来の研究は主に新規脂質リガンドの探索に偏っており、ビタミンDシグナル経路のリン酸化異常や原因キナーゼの理解は進んでいない。本研究でビタミンDシグナルの活性化に関わる内因性蛋白質が明らかになれば、これを標的とする全く新しいがんの予防法や治療法の開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Nuclear receptors are transcription factors that regulate gene transcription by binding to lipid ligands. However, previous studies have been biased toward the search for novel ligands and have failed to identify endogenous regulators that affect post-translational modifications. In this study, we used CRISPR screening, a sequential genetic method, to comprehensively extract endogenous regulators of the vitamin D receptor, one of the nuclear receptors. This candidate molecules might be potential therapeutic targets for various diseases including malignant tumors.

研究分野：実験病理学

キーワード：ビタミンD がん 順遺伝学 CRISPR ゲノム編集 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D はステロイド骨格を持つ脂溶性の分子で、その作用の大部分は核内受容体スーパーファミリー(NRs)に属する転写因子ビタミン D 受容体(VDR)によるものである。VDR は他の転写調節因子と複合体を形成して標的遺伝子発現調節領域に常時結合しており、VDR にビタミン D が結合すると複合体の構成分子が変化して標的遺伝子発現が調節される。NRs は主にリガンドとの結合によってその転写活性が制御されているが、他にリン酸化によるリガンド感受性の変化やリガンド非依存性の活性化機構も知られている。よってビタミン D シグナルには、ビタミン D を細胞内外で活性型または不活性型に代謝する酵素とその調節因子、VDR と転写因子複合体を形成するパートナー分子、および VDR を翻訳後修飾するシグナル分子など多くの遺伝子産物が関与している(図 1)。

ところでビタミン D シグナルはカルシウム代謝以外にも多くの生理作用を持っており、特に腫瘍の進展に対して抑制的に作用することが知られている。多くの進行がんではビタミン D を活性型に代謝する CYP27A の発現減弱や不活性型に代謝する CYP24 の発現亢進がみられ、同シグナルが減弱している(Deeb et al., *Nat Rev Cancer*, 2007)。よってビタミン D やその下流シグナルは潜在的にはがんの治療標的となりうると考えられるが、ビタミン D に焦点をあてた新規がん治療法の開発は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究ではビタミン D シグナル経路を対象とした個別化がん治療戦略の開発を目指す。VDR 蛍光レポーターと CRISPR ライブラリによる網羅的遺伝子ノックアウトを組み合わせ、ビタミン D シグナルを制御する分子群を順遺伝学的に抽出し(図 1)、リガンドによらないビタミン D シグナル標的療法の開発に繋げる。

3. 研究の方法

293T 細胞および HaCaT 細胞に Cas9 と VDRE レポーターを恒常発現する細胞株を樹立した(図 2 左)。続いてその細胞にプール化された sgRNA 発現ベクターをレンチウイルスで導入した(図 2 中央; Addgene 67989; Tzelepis et al., *Cell Rep*, 2016)。ビタミン D を低用量および高用量で 24 時間処理したのちセルソーターで GFP 蛍光を測定した(図 2 右)。まずビタミン D 低用量でレポーター活性の高いもの(図 2 右上、細胞集団 A)を抽出した。これには遺伝子ノックアウトによりビタミン D 感受性が増強した細胞群、すなわちビタミン D シグナルを負に制御する遺伝子群を機能欠失した細胞群が含まれるはずである。同様にビタミン D 高用量培地においてレポーター活性が低いもの(図 2 右下、細胞集団 B)にはビタミン D シグナルを正に制御する遺伝子群を機能欠失した細胞群が含まれる。よってこれらの細胞集団に取り込まれた sgRNA 配列を次世代シーケンシング解析することで、ビタミン D シグナルを制御する遺伝子群を網羅的に同定することができる。選別した細胞からゲノミック DNA を抽出し、gRNA の共通配列を認識するプライマーによって gRNA の固有配列を含む領域を増幅し、Nanopore 社の次世代シーケンサーで配列を解析した。母集団との差を比較してビタミン D の正負の制御因子を同定した。この際に既知の制御因子であるビタミン D 代謝酵素 CYP24 や CYP27A あるいは VDR 自体など

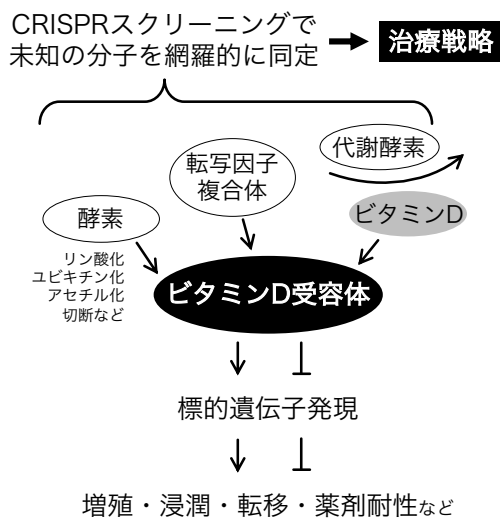


図 1. 本研究の概要

ビタミン D 受容体(VDR)は DNA 結合ドメインを持つ転写因子で、標的遺伝子の発現を調節することによって腫瘍悪性形質を制御している。VDR の活性状態は、ビタミン D との結合(すなわちビタミン D の多寡やリガンド代謝酵素の活性が関与する)、転写因子複合体を構成する共因子、および翻訳後修飾に関わる酵素などで調節されている。CRISPR スクリーニングによる順遺伝学的アプローチでは理論上これらの全てを同定できる。

が含まれることを確認し、本実験系の確からしさを検定した。抽出された遺伝子のうち、データベースを参照して主要ながん細胞株で発現が亢進あるいは減弱している遺伝子群を絞り込み、過去にがん細胞における機能解析が達成されていない遺伝子を最終的な候補とした。

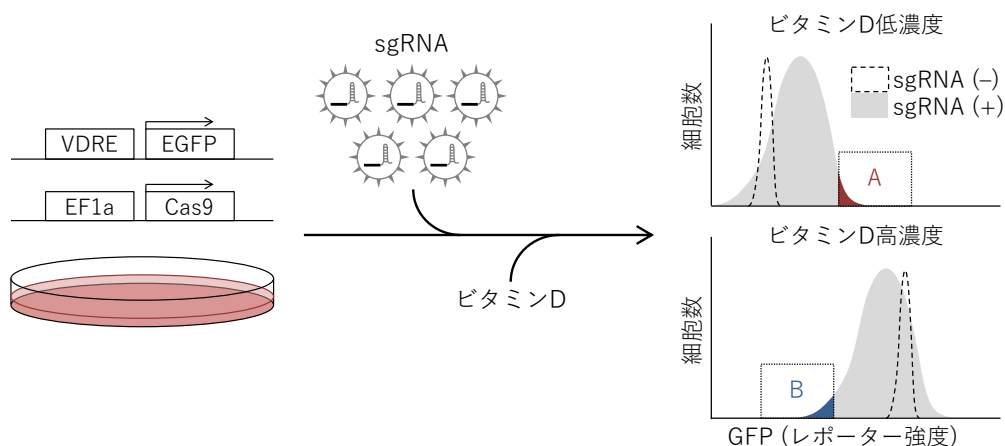


図 2. 研究方法の概要

- (i) ビタミン D 応答プロモーター(VDRE)の下流に蛍光分子(EGFP)を挿入した発現ベクターおよび Cas9 恒常発現ベクターを共発現する細胞株を樹立する。
- (ii) 全遺伝子に対応する sgRNA 発現ベクタープールをレンチウイルスにより導入し、続いて培地に高濃度と低濃度のビタミン D を添加する。
- (iii) セルソーティングにより、ビタミン D 低濃度で GFP 蛍光強度の高い集団 A、およびビタミン D 高濃度で GFP 蛍光強度の低い集団 B を抽出する。
- (iv) 次世代シーケンシングにより各々の細胞集団に組み込まれた sgRNA 配列を解読し、統計解析により遺伝子群を抽出する。

4. 研究成果

ビタミン D のレポーター系は 3 種類作製した。すなわち①最小プロモーターに VDRE 応答配列を 3 つ組み込んだ 200 bp 程度の短いもの、②ビタミン D シグナルによって発現が正に制御される CYP24A 遺伝子のプロモーター領域約 7 kb を組み込んだもの、③CYP24A の翻訳開始コードに EGFP をノックインしたものである。これらのうち①はクローニング後もランダムなサイレンシングにより蛍光強度一定せず、使用に適さなかった。③はおそらく遺伝子コピー数が 1 と少ないためかビタミン D 処理によっても十分な蛍光が誘導されなかった。よって②を選択した。

続いて上記のレポーターを 293T と HaCaT に安定発現させてシングルセルクローニングし、活性型ビタミン D (カルシトリオール)を 1 pM から 1 nM まで様々な濃度で処理し、GFP 蛍光を観察した。その結果 HaCaT では濃度依存性の蛍光の増強がみられた。一方で 293T 細胞では蛍光強度の変化は観察されなかった。おそらく表皮由来細胞株 HaCaT ではビタミン D シグナル経路を構成する分子群が発現していて成体正常組織と同様の応答が保たれているのに対し、胎児の未熟な神経節細胞に由来する 293T (293T 細胞はヒト胎児の腎臓を不死化したものであるが、実際には腎臓の構成細胞ではなく腎周囲に付着していた神経節細胞が選択されたと考えられている)ではビタミン D に応答できないものと考えられた。以上より CRISPR スクリーニングには HaCaT 細胞を用いることとした(図 3)。

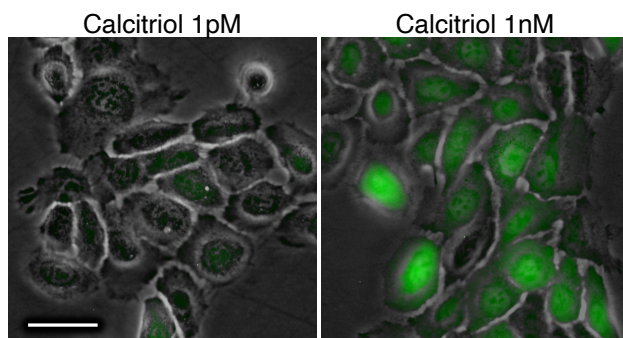


図 3. ビタミン D レポーターの樹立

Cas9 発現ベクターとビタミン D レポーター(CYP24A:EGFP)を導入した HaCaT: Cas9:CYP24A-EGFP 細胞に活性型ビタミン D であるカルシトリオールを低濃度(1 pM)と高濃度(1 nM)で処理し、GFP 蛍光を観察した。ビタミン D 濃度に依存した蛍光の増強がみられる。スケールバーは 50 μ m。

続いてビタミン D レポーターを導入した HaCaT 細胞に、さらに Cas9 発現ベクターをトランスフェクションした。シングルセルクローニングの後、RT-qPCR によって Cas9 発現の強いものを選択した。以降、同細胞株を HaCaT:Cas9:CYP24A-EGFP とする。続いて CRISPR ライブラリをパッケージングし、得られたレンチウイルスをシヨ糖濃度勾配により濃縮した。それを 1 億個の HaCaT:Cas9:CYP24A-EGFP 細胞に感染させ、ピューロマイシンで選択した。ビタミン D を高用量および低用量で処理して FACS で GFP 強度を可視化すると、CRISPR ライブラリを適用していない HaCaT:Cas9:CYP24A-EGFP と比較して、CRISPR ライブラリを適用した細胞では、ビタミン D 低濃度でも GFP を高発現する細胞群と、ビタミン D 高濃度でありながら GFP を発現できない細胞群が観察された。これらの集団をソーティングし、ゲノミック PCR で gRNA コード領域を増幅して次世代シーケンシングによって解析し、ソーティング前の細胞集団の結果と比較した。その結果、ビタミン D シグナルの正および負の制御因子をそれぞれ 200 程度同定した。なおビタミン D シグナルの正の制御因子の筆頭は VDR であり、このライブラリの妥当性が示された。同定された遺伝子のうち 8 割以上はビタミン D シグナルや VDR、および CYP24A との関連が報告されていないものであった。すなわちこれらは「ビタミン D シグナルの調節に関わる内因性蛋白質」の候補であり、ビタミン D シグナルを対象とする創薬標的となり得る可能性を秘めている。候補分子の中には悪性腫瘍で発現する細胞膜分子など、がんの治療標的として有望なものも含まれており、今後は個々の分子について機能解析や治療標的としての有用性の検討を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 13件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Murakami-Nishimagi Yuko, Sugimoto Kotaro, Kobayashi Makoto, Tachibana Kazunoshin, Kojima Manabu, Okano Maiko, Hashimoto Yuko, Saji Shigehira, Ohtake Tohru, Chiba Hideki | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Claudin-4-adhesion signaling drives breast cancer metabolism and progression via liver X receptor | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Breast Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 41 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13058-023-01646-z | 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 Endo Yuta, Sugimoto Kotaro, Kobayashi Makoto, Kobayashi Yasuyuki, Kojima Manabu, Furukawa Shigenori, Soeda Shu, Watanabe Takafumi, Higashi Atsuko, Higashi Tomohito, Hashimoto Yuko, Fujimori Keiya, Chiba Hideki | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Claudin-9 is a novel prognostic biomarker for endometrial cancer | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oncology | 6. 最初と最後の頁 135 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2022.5425 | 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 Ito Yui, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Murakami Taro, Akimoto Taishi, Kyuno Daisuke, Kawata Yuka, Shano Kodai, Kirisawa Kurara, Ota Misaki, Aoyama Tomoyuki, Murata Masaki, Sugimoto Kotaro, Chiba Hideki, Saito Tsuyoshi, Osanai Makoto | 4. 巻 113 |
| 2. 論文標題 Aberrant expression of claudin 6 contributes to malignant potentials and drug resistance of cervical adenocarcinoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 1519～1530 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15284 | 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 Akanuma Haruna, Iizuka Takahiro, Abe Dan, Yoshida Kenji, Matsuda Nozomu, Sugimoto Kotaro, Hashimoto Yuko, Kanai Kazuaki | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with small cell lung cancer and cytotoxic T-cell-mediated pathology: Case report | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 952868 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.952868 | 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 Hui Subhra P., Sugimoto Kotaro, Sheng Delicia Z., Kikuchi Kazu | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Regulatory T cells regulate blastemal proliferation during zebrafish caudal fin regeneration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 952868 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.981000 | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Mochizuki Kazuhiro, Kobayashi Shogo, Takahashi Nobuhisa, Sugimoto Kotaro, Sano Hideki, Ohara Yoshihiro, Mineishi Shin, Zhang Yi, Kikuta Atsushi | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Alloantigen-activated (AAA) CD4+ T cells reinvigorate host endogenous T cell immunity to eliminate pre-established tumors in mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Experimental and Clinical Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 1 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-021-02102-6 | 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 Watanabe Masayuki, Higashi Tomohito, Ozeki Kana, Higashi Atsuko Y., Sugimoto Kotaro, Mine Hayato, Takagi Hironori, Ozaki Yuki, Muto Satoshi, Okabe Naoyuki, Matsumura Yuki, Hasegawa Takeo, Shio Yutaka, Suzuki Hiroyuki, Chiba Hideki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 CLDN15 is a novel diagnostic marker for malignant pleural mesothelioma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91464-0 | 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 Rahman Abidur, Kobayashi Makoto, Sugimoto Kotaro, Endo Yuta, Kojima Manabu, Furukawa Shigenori, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Hashimoto Yuko, Fujimori Keiya, Chiba Hideki | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Reduced Claudin-12 Expression Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 3774 ~ 3774 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073774 | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Sugimoto Kotaro, Chiba Hideki | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 The claudin?transcription factor signaling pathway | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Tissue Barriers | 6. 最初と最後の頁 1 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1908109 | 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 Sugimoto Kotaro, Murakami Toshiki, Ojima Akira, Sekiryu Tetsuju | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Comparison of clinical findings and subjective symptoms in a case of multiple evanescent white dot syndrome (<scp>MEWDS</scp>): A case report from a patient's perspective | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of General and Family Medicine | 6. 最初と最後の頁 154 ~ 157 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgf2.680 | 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 Miyakawa Ryoya, Kobayashi Makoto, Sugimoto Kotaro, Endo Yuta, Kojima Manabu, Kobayashi Yasuyuki, Furukawa Shigenori, Honda Tsuyoshi, Watanabe Takafumi, Asano Shigeyuki, Soeda Shu, Hashimoto Yuko, Fujimori Keiya, Chiba Hideki | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 SPON1 is an independent prognostic biomarker for ovarian cancer | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Ovarian Research | 6. 最初と最後の頁 95 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13048-023-01180-8 | 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 Nishimagi Atsushi, Kobayashi Makoto, Sugimoto Kotaro, Kofunato Yasuhide, Sato Naoya, Haga Junichiro, Ishigame Teruhide, Kimura Takashi, Kenjo Akira, Kobayashi Yasuyuki, Hashimoto Yuko, Marubashi Shigeru, Chiba Hideki | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Aberrant phosphorylation of human LRH1 at serine 510 is predictable of hepatocellular carcinoma recurrence | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Experimental Medicine | 6. 最初と最後の頁 4985 ~ 4995 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10238-023-01098-x | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ichikawa-Tomikawa Naoki, Sugimoto Kotaro, Kashiwagi Korehito, Chiba Hideki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 The Src-Family Kinases SRC and BLK Contribute to the CLDN6-Adhesion Signaling | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 1696 ~ 1696 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12131696 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ogawa Masahito, Geng Fan-Suo, Humphreys David T., Kristianto Esther, Sheng Delicia Z., Hui Subhra P., Zhang Yuxi, Sugimoto Kotaro, Nakayama Maki, Zheng Dawei, Hesselson Daniel, Hodson Mark P., Bogdanovic Ozren, Kikuchi Kazu | 4. 巻 372 |
| 2. 論文標題 Kr?ppel-like factor 1 is a core cardiomyogenic trigger in zebrafish | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Science | 6. 最初と最後の頁 201 ~ 205 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abe2762 | 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 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kojima Manabu, Sugimoto Kotaro, Kobayashi Makoto, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kashiwagi Korehito, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Fujimori Keiya, Chiba Hideki | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Aberrant Claudin-6?Adhesion Signaling Promotes Endometrial Cancer Progression via Estrogen Receptor | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 1208 ~ 1220 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0835 | 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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉本幸太郎、西間木淳、小林信、千葉英樹 |
| 2. 発表標題 肝受容体ホモログ-1 (LRH1)の異常セリンリン酸化による肝癌と膵癌の悪性形質増強機構 |
| 3. 学会等名 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2022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 | 小林 信 (Kobayashi Makoto) (60761947) | 福島県立医科大学・医学部・助教 (21601) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|