

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23701060
 研究課題名（和文） *C. elegans* 幹細胞株樹立と腫瘍・糖鎖遺伝子発現制御による腫瘍モデルへの応用
 研究課題名（英文） Using *C. elegans* as a model for studying human cancer: Establishment of *C. elegans* stem cell line and analysis of tumor and glycome-related genes.
 研究代表者
 水口 惣平(MIZUGUCHI SOUHEI)
 宮崎大学・医学部・助教
 研究者番号：50398103

研究成果の概要（和文）：

Notch シグナル関連遺伝子群の異常が *C. elegans* 生殖幹細胞の正常分化の抑制と、過形成を引き起こし、また線虫陰門(vulva)の形成異常や、胚致死、生殖細胞数減少などの表現型の原因となる事を明らかとした。更にこの結果を基に、研究代表者が実施した線虫複合糖質関連 145 遺伝子の網羅的機能阻害結果を再解析したところ、グリコサミノグリカン合成に関わる遺伝子の機能阻害による表現型が、Notch シグナル関連遺伝子の異常で生じる表現型と類似していることが明らかとなった。これは細胞表面の糖鎖、グリコサミノグリカンを介した Notch シグナル伝達系による新しい分化制御、腫瘍形成メカニズムの存在を示唆している。本研究の成果から、線虫が高等動物の幹細胞分化、並びに腫瘍形成機構を明らかとする有力な多細胞生物モデルとなり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Notch signaling is important for differentiation of germ-line stem cells (GSCs) in *Caenorhabditis elegans*. Upon depletion of the core components of the Notch signaling pathway, GSCs undergo abnormal mitosis and resulted in germline tumor. In addition, other phenotypes, such as squashed vulva (Sqv), embryonic lethal (Emb) and decreased number of germ cells were also observed. According to our RNAi experiments of 145 human glycosyltransferase in *C. elegans*, similar phenotype was induced by knockdown of glycosaminoglycan synthases. These results strongly suggest the importance of glycosaminoglycans in the Notch signaling pathway in worms, and the GSCs of *C. elegans* have proven to be a good model for studying the mechanisms underlying stem cell differentiation and tumorigenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：(1) *C. elegans* (2) 癌 (3) 幹細胞 (4) 糖鎖 (5) 腫瘍 (6) 分化

1. 研究開始当初の背景

線虫 *Caenorhabditis elegans* は全遺伝子配列が解読されており、全ての細胞系譜が同定済みのモデル生物である。遺伝学的、組織学

的な詳細な解析の結果から、多細胞生物の基本的特徴を保持していることが確認されており、更に、解析に順遺伝学的手法と並んで RNAi など強力な逆遺伝学的手法が使用可能

であるため、疾病等に関連した多細胞生物の複雑な生体内分子機構の解明に最も適している。アポトーシスや EGFR を介したシグナル伝達経路、RNAi のメカニズムなど、線虫を用いて明らかにされた、高等動物においても保存されている重要な生物学的機構は多い。また、線虫は遺伝学的操作が容易で、遺伝子重複も少ないことから、高等動物で理解が困難な複雑な生体内分子機構を効果的に解析できる利点がある。一方近年、ヒトがんの分化と発生に強く関与するがん幹細胞の存在が報告され、がん再発・治療の上で腫瘍医学の大きなトピックスとなっている。更に現在、iPS 細胞や幹細胞を用いた再生医療の可能性に非常に期待が集まっており、多細胞生物を用いた効率的な実験系の確立が希求されている状況である。線虫の幹細胞に関しては既に研究が進められており、特に生殖幹細胞に関しては、幹細胞を未分化な状態に保つ niche が生殖巣遠位末端に位置する体細胞 (DTC: Distal tip cell) であることや、幹細胞の分化制御が Notch シグナル伝達系を介して行われていることが報告されてきている。本研究ではこれらの知見をふまえて、幹細胞分化制御や、腫瘍関連因子に対する RNAi による遺伝子機能阻害、並びにマイクロインジェクションによるトランスジェニック線虫作成の手法を用いて、*C. elegans* をヒトの幹細胞や腫瘍形成のモデルとして活用することを目指す。

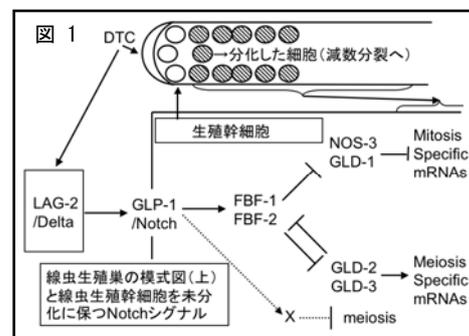
2. 研究の目的

線虫の生殖幹細胞を未分化に保つ生体内分子機構の詳細な解明を試み、更に細胞を長期培養する技術を確立することで、ヒトや高等動物の幹細胞分化や、腫瘍の形成機構解明モデルとする道を開く。線虫は多細胞生物の病態やそれに関連する生体内分子の機能解明に現在最も適したモデル生物の一種であるが、これまで培養細胞株は確立されておらず、また腫瘍の発生機序に関する研究などの実施例は少ない。本研究では、線虫生殖幹細胞を未分化に保つ、線虫 DTC (生殖巣の遠位末端に存在する生殖幹細胞の niche) と、近傍の生殖幹細胞を未分化状態に維持する Notch シグナル関連の遺伝子制御や、細胞周期調節因子、腫瘍形成に重要と考えられる、細胞外微小環境の構築に必須な複合糖質 (特に細胞外基質との連携で重要な各種プロテオグリカン) の同定と機能解明を行う。また遺伝子操作を行った線虫の生殖巣から生殖幹細胞を単離、培養し株細胞の樹立を試み、更にそれらの細胞や、線虫個体に対してヒト腫瘍関連遺伝子の線虫オーソログ遺伝子の機能阻害 (がん抑制遺伝子)、もしくは機能亢進 (がん遺伝子) を計画的に行うことで、腫瘍形成に関する新しい機構を解明し、線虫

及び線虫生殖幹細胞をヒトの腫瘍形成モデルとして医薬、創薬に応用する道を拓く。

3. 研究の方法

線虫生殖幹細胞は DTC からの Notch シグナルによって未分化な状態に保たれていると考えられる。そこで Notch シグナルの下流で細胞の分化制御に関与している *gld-1*, *gld-2* 遺伝子の機能欠失型変異体、または、*gld* 遺伝子の発現を調節する *fbf-1*, *fbf-2* の欠失型変異体を用いて生殖幹細胞分化に対する影響を解析する。また並行して、線虫の Delta として報告されている *lag-2* 遺伝子等の導入による恒常的発現で、Notch シグナルを生殖幹細胞自律的に活性化し、未分化に保つ工夫を行う (図 1)。更に生殖巣より生殖幹細胞を外科的操作で摘出して培養を試みる。また複合糖質の添加 (培地内振り掛け実験) や合成酵素の阻害による細胞周辺微小環境の変化



による幹細胞培養系確立の検討を試みる。ヒト腫瘍関連遺伝子に関しては、Cancer Gene Census などヒト癌関連遺伝子の調査、収集プロジェクトを参考にして候補を選定する。これらの遺伝子に対する線虫オーソログの特定、解析には、研究代表者が、平成 17~18 年度・若手研究 (B) (研究課題: バイオインフォマティクスを用いた *C. elegans* 複合糖質関連遺伝子の機能解析) において構築した、線虫の遺伝子情報解析用サーバー (線虫を含む様々な生物種の遺伝子情報をインターネット上の公共データベースから自動取得し、ローカル Blast による相同性解析や、Pfam ドメイン解析、HMMER による隠れマルコフモデルを用いたモチーフ解析等を行うことが出来るように構築したサーバーコンピューター) (図 2) を使い、解析時のパラメータを線虫腫瘍関連遺伝子用に最適化することで、最大限に有効な結果を得る。選定した腫瘍関連遺伝子に対しては、現在までに報告されている大規模、網羅的遺伝子機能阻害研究の結果や、研究代表者が行った糖鎖関連遺伝子の網羅的機能阻害解析結果から、重要遺伝子を選定し、優先順位を付けた後、系統的・複合的機能解析 (機能阻害と亢進) による詳細な解析を行う。RNAi などにより細胞分裂異常や胚致死など重篤な表現型が現れる

遺伝子、また、共通する表現型を示す遺伝子群の評価などから重要遺伝子の選定を行う。



線虫個体の複合的遺伝子機能阻害には、作業効率を高めるために、大腸菌内で二本鎖 RNA を発現させ、それを線虫に摂食させて機能阻害を行う feeding RNAi 法を使用する。また適宜、遺伝子欠失型変異体同士の交配や、細胞に対しては合成二本鎖 RNA のトランスフェクションによっても遺伝子の機能阻害を試みる。遺伝子機能の亢進に関しては、目的遺伝子発現用のプラスミドを線虫生殖巣へマイクロインジェクションすることでトランスジェニック線虫の作成を行い、遺伝子過剰発現の系統を確立し、維持、解析する (図 3)。更に、重要と考えられる遺伝子に関しては、欠失型変異体の取得と観察、上記トランスジェニック線虫との交配実験、また EGFP 等の蛍光融合蛋白質を用いた生体内での分子の発現解析を実施することで、多角的に生体内分子機能を解析する。

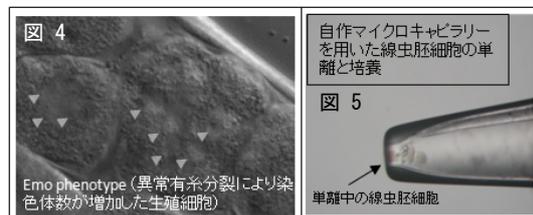


腫瘍関連遺伝子の操作によって現れる表現型は、個体レベルでは線虫の胚発生 (embryonic development) と、幼虫から成体までの発生の段階 (post-embryonic development) に分け、それぞれタイムラプス立体顕微鏡観察により、継時的かつ詳細に観察を行う。また線虫の腫瘍形成や幹細胞の分化に関与する可能性のある複合糖質関連因子を同定し、同様に詳細な解析を行うことで、幹細胞分化と腫瘍形成に関わる新規の生体内分子機構を解明する。

4. 研究成果

線虫の Notch シグナル関連遺伝子群 (*gld-1*,

gld-2, *lag-2*, *fbf-1*, *fbf-2* 等) の RNAi による機能阻害、並びに機能欠失変異体の表現型解析から、Notch シグナル伝達経路に関わる遺伝子の異常が、線虫生殖幹細胞の正常分化の抑制と、過形成を引き起こすことを確認した。更に、Notch 関連遺伝子の異常は、同時に陰門の形成異常 (Sqv: *squashed vulva*)、生殖細胞数の減少、胚致死 (Emb: *embryonic lethal*) など、他の特徴的な表現型を引き起こす場合があることを明らかにした。これらの結果を基に、研究代表者が実施した複合糖質関連 145 遺伝子の網羅的機能阻害結果を再解析したところ、グリコサミノグリカン合成に関わる遺伝子群の機能阻害による表現型が、Notch シグナル関連遺伝子の異常で生じる表現型と極めて類似していることが明らかとなった。特にコンドロイチン合成酵素遺伝子 (*sqv-5*, *mig-22*) の機能阻害では、上記 Sqv, Emb の表現型に加えて、DTC の移動異常や、生殖細胞が正常な減数分裂を行わず有糸分裂を繰り返す Emo (*endomitotic oocytes*) 表現型が観察され、Notch シグナル伝達系による幹細胞分化制御との関連が強く示唆された (図 4)。これらの遺伝子改変を行った線虫の細胞培養に関しては、自作マイクロキャピラリーを用いたハンドリング技術、浸透圧を調整した培地での胚細胞培養系は確立したが、生殖幹細胞を未分化に長期培養する条件は検討を継続中である (図 5)。



また、ヒトの腫瘍関連遺伝子に関しては、Cancer Genome Project (Wellcome trust Sanger Institute) の Cancer Gene Census 及び COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database を基に 465 遺伝子を候補として選定した。更に、これらの遺伝子の線虫オーソログを線虫遺伝子情報解析サーバーを用いて解析し、その 43% に当たる 200 の線虫腫瘍関連遺伝子を特定し (図 6)、その多くが機能阻害により胚致死等、重篤な表現型を示す事を確認した。中でも興味深い事に、ヒト癌遺伝子の線虫オーソログ *egl-43* 遺伝子 (Notch シグナル関連の転写因子) の機能阻害を行った線虫では、研究代表者が以前報告したヘパラン硫酸合成酵素 (*rib-1*, *rib-2*) の機能阻害と類似した表現型が生じることが明らかとなった (図 7・vulva と同時に神経組織の形成にも異常が生じる)。これは、コンドロイチン以外のグリコサミノグリカンが、Notch シグナル伝達系や、細胞分化に関与する可能性を示唆し

①Akiko Niibori-Nambu, Uichi Midorikawa, Souhei Mizuguchi, Takuichiro Hide, Minako Nagai, Yoshihiro Komohara, Megumi Nagayama, Mio Hirayama, Daiki Kobayashi, Nobuyuki Tsubota, Tatsuya Takezaki, Keishi Makino, Hideo Nakamura, Motohiro Takeya, Junichi Kuratsu, Norie Araki “Glioma Initiating Cells Form a Differentiation Niche Via the Induction of Extracellular Matrices and Integrin αV ”

PLoS ONE (査読有) 8(5): 2013, e59558
doi: 10.1371/journal.pone.0059558

②Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, Morikawa T, Nagayama M, Midorikawa U, Wilson MM, Nambu AN, Yoshizawa AC, Kawano S, Araki N ” Integrated proteomics identified novel activation of dynein IC2-GR-COX-1 signaling in NF1 disease model cells.”

Molecular & Cellular Proteomics (査読有) 5(12): 2013, pp1377-1394
doi: 10.1111/1346-8138.12076

③ Shimada H, Nambu-Niibori A, Wilson-Morifuji M, Mizuguchi S, Araki N, Sumiyoshi H, Sato M, Mezaki Y, Senoo H, Ishikawa K, Hatano Y, Okamoto O, Fujiwara S “Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of 3-D cell clusters.”

The Journal of Dermatology (査読有) 4(40): 2013, pp249-258
doi: 10.1111/1346-8138.12076

④Murata D, Nomura KH, Dejima K, Mizuguchi S, Kawasaki N, Matsuishi-Nakajima Y, Ito S, Gengyo-Ando K, Kage-Nakadai E, Mitani S, Nomura K ” GPI-anchor Synthesis Is Indispensable for the Germline Development of the Nematode *Caenorhabditis elegans*.”

Molecular Biology of the Cell (査読有) 6: 2012, pp982-995
doi: 10.1091/mbc.E10-10-0855

⑤Nomura KH, Murata D, Hayashi Y, Dejima K, Mizuguchi S, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Hirabayashi Y, Ito M, Nomura K “Ceramide glucosyltransferase of the nematode *Caenorhabditis elegans* is involved in oocyte formation and in early embryonic cell division.”

Glycobiology (査読有) 6: 2011, pp834-848
doi: 10.1093/glycob/cwr019

[学会発表] (計 16 件)

①荒木令江、南部(新堀)晶子、緑川宇一、永井美奈子、小林大樹、水口惣平、秀拓一郎、中村英夫、菰原義弘、竹屋元裕、倉津純一 “融合プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞の分化誘導ニッチの解析”

第 85 回 日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日 (福岡)

②小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウィルソン-森藤政代、尹浩信、竹屋元裕、倉持朗、荒木令江 “融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症 1 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と、その NF1 腫瘍における機能解析”

第 85 回 日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日 (福岡)

③村田 大輔、野村 和子、出嶋 克史、水口惣平、川崎 ナナ、中島 紫、伊藤 さつき、安藤 恵子、中台 枝里子、三谷 昌平、松田 采子、野村 一也 ” GPI アンカー合成は線虫 *Caenorhabditis elegans* の配偶子幹細胞ニッチの維持と生殖系列細胞発生に必須である”

第 85 回 日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日 (福岡)

④河野 信、渡辺 敦、水口 惣平、荒木 令江、片山 俊明、山口 敦子 ” TogoTable: RDF 技術を利用したテーブル形式データへの自動アノテーション付加ツール”

第 35 回分子生物学会年会 2012 年 12 月 11-14 日 (福岡)

⑤Norie Araki, Souhei Mizuguchi, Takashi Morikawa, Shin Kawano, Atsuko Yamaguchi, Daiki Kobayashi, Mio Hirayama, Uichi Midorikawa, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu “An integrated proteomics by iPEACH, a new application, identified novel activated signal cascades in chemotherapy resistant malignant gliomas.”

HUPO 11th Annual World Congress, 2012 年 9 月 9- 13 日 (Boston, Massachusetts, USA)

⑥Shin Kawano, Tsumomu Watanabe, Sohei Mizuguchi, Norie Araki, Toshiaki Katayama, Atsuko Yamaguchi “TogoTable: semi-automated annotation tool for proteomics experimental data.”

HUPO 11th Annual World Congress, 2012 年 9 月 9- 13 日 (Boston, Massachusetts, USA)

⑦Mio Hirayama, Daiki Kobayashi, Takashi

Morikawa, Megumi Nagayama, Souhei Mizuguchi, Norie Araki “An Integrated Proteomics for Identification of Abnormal Cellular Signals via Silencing of NF1 Tumor Suppressor Protein in Neuronal Cells.”

HUPO 11th Annual World Congress, 2012 年 9 月 9- 13 日 (Boston, Massachusetts, USA)

⑧ Daiki Kobayashi, Mio Hirayama, Yoshihiro Komohara, Souhei Mizuguchi, Masayo Wilson-Morifuji, Hironobu Ihn, Motohiro Takeya, Akira Kuramochi2, Norie Araki ” Integrated Proteomics Identified Translationally Controlled Tumor Protein as a Biological Target for Neurofibroma and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors.” (口頭)

HUPO 11th Annual World Congress, 2012 年 9 月 9- 13 日 (Boston, Massachusetts, USA)

⑨ 小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウイルソン-森藤政代、尹浩信、竹屋元裕、倉持朗、荒木令江 “融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症 1 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と治療標的としての機能解析” 日本プロテオーム学会 2012 年大会 2012 年 7 月 26- 27 日 (東京)

⑩ 村田大輔、野村和子、出嶋克史、水口惣平、川崎ナナ、中島紫、伊藤さつき、安藤恵子、中台枝里子、三谷昌平 “GPI アンカー型蛋白質の生合成は線虫 *C. elegans* の生殖細胞発生に必須である” 第 54 日本脂質生化学会 2012 年 6 月 7- 8 日

⑪ 荒木令江、水口惣平、森川崇、坪田誠之、小林大樹、平山未央、緑川宇一、中村英夫、倉津純一 “融合プロテオミクスによるグリオーマの化学治療予後予測分子ネットワークの解析” (シンポジウム講演) 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3-5 日 (愛知)

⑫ 森藤政代、新堀晶子、水口惣平、小林大樹、荒木令江 “ヒト舌癌における HIF-1 α を介した高転移性がん細胞の増殖機構の解析” 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3-5 日 (愛知)

⑬ 荒木令江、水口惣平、森川崇、坪田誠之、小林大樹、平山未央、緑川宇一、南部晶子、中村英夫、倉津純一 “融合プロテオミクスによる悪性脳腫瘍化学治療耐性に関わる分子ネットワークの解析” (口頭) 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21- 24 日 (京都)

⑭ 平山未央、小林大樹、森川崇、長山慈、緑川宇一、水口惣平、荒木令江 “融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制遺伝子 Neurofibromin の機能欠損による神経系細胞内異常シグナルの解析” (口頭) 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21- 24 日 (京都)

⑮ 水口惣平、荒木令江 ” iPEACH を用いた統合プロテオミクスデータファイルの作成と応用” (招待講演) ライフサイエンス統合データベースセンター勉強会 2011 年 9 月 7 日 (東京)

⑯ 荒木令江、水口惣平、森川崇、緑川宇一、ウイルソン森藤政代、南部-新堀晶子、小林大樹、坪田誠之、中村英夫、倉津純一 “病態マーカーと治療ターゲット開発のための融合プロテオミクス” (教育講演) 日本プロテオーム学会 2011 年大会 / 日本ヒトプロテオーム機構 第 9 回大会 2011 年 9 月 7 日 (東京)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法

発明者: 荒木令江・水口惣平 (他 5 名)

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/58366

出願年月日: 2011 年 3 月 31 日

国内外の別: 国際

名称: 融合プロテオミクスによる NF1 特異的タンパク質の同定方法、NF1 特異的タンパク質の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての使用方法

発明者: 荒木令江・小林大樹・水口惣平・平山未央

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: 10092AB09

出願年月日: 2012 年 3 月 28 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 惣平 (MIZUGUCHI SOUHEI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 50398103