

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08764

研究課題名(和文) 7型コラーゲン消失有棘細胞癌の遠隔転移機構：網羅的ゲノム編集を用いた解析

研究課題名(英文) Genome-wide screening of the key molecules for metastasizing collagen VII-deficient squamous cell carcinoma.

研究代表者

中村 秀樹 (Nakamura, Hideki)

北海道大学・医学研究院・助手

研究者番号：60435956

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)：本研究は、VII型コラーゲン(COL7)遺伝子の変異で生じる栄養型表皮水疱症(DEB)患者に発生する有棘細胞癌(SCC)の遠隔転移機構を解明することを目的としている。網羅的ゲノム編集を行なったDEB患者モデルの表皮細胞はマウスの皮下に移入しても遠隔転移を生じなかったが、DEB患者モデルの皮下腫瘍は通常の表皮細胞で生じる皮下腫瘍よりも全体の構築が不整で、周囲に線維化や血管増生が見られた。この結果から、DEB患者モデルの皮下腫瘍は基底膜構築異常を介した周囲の組織環境変化を引き起こすことが示唆され、これらの変化がDEB患者におけるSCCの遠隔転移メカニズムの一因である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、栄養障害型表皮水疱症患者(DEB)の表皮細胞は癌化する前に血管増生などの遠隔転移に繋がる組織環境を作ることが明らかとなった。今までは、線維芽細胞が主に関連するTGF- β の持続的な活性化に伴う慢性炎症がDEB患者の表皮細胞を取り囲む組織環境を変化させていると考えられてきた。本研究で得られた、DEB患者の表皮細胞自体が周囲の組織環境を遠隔転移しやすいように変化させる新たな知見は、今後DEB患者の表皮細胞を標的とした有棘細胞癌の予防法や治療法の可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the metastatic mechanism of squamous cell carcinoma (SCC) arising in patients with dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) caused by mutations in type 7 collagen (COL7) gene. DEB patient model keratinocytes with a comprehensive gene-editing did not develop metastasis when transplanted subcutaneously in mice, but the subcutaneous tumors of DEB patient model showed an overall irregular structure, surrounding fibrosis, and hypervascularization compared to subcutaneous tumors of normal keratinocytes. These results suggest that subcutaneous tumors in DEB patient model induce changes in the surrounding tissue environment via abnormal construction of the basement membrane, and that these changes may contribute to the metastatic mechanism of SCC in DEB patients.

研究分野：皮膚科学

キーワード：VII型コラーゲン 有棘細胞癌 遠隔転移 網羅的ゲノムスクリーニング CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

栄養障害型表皮水疱症(DEB)は、表皮真皮間接合を担う基底膜関連分子の一つである VII 型コラーゲン (COL7) 遺伝子に変異を生じ発症する (図1)。DEB に対する根治的治療法は未だ存在せず、患者は水疱形成に加え、食道狭窄など多くの合併症を抱えた生活を余儀なくされている。中でも有棘細胞癌 (SCC) は DEB で特に発生頻度が高く、容易に転移するため致命的となることも稀ではない。そのため、予防法と治療法開発は喫緊の課題だが、DEB 患者における SCC 発症機序や遠隔転移しやすい理由は未だ不明である。

COL7 遺伝子に変異を持つ DEB 患者皮膚や DEB モデルマウス皮膚では、TGF- β の持続的な活性化に伴う線維化と慢性的な炎症が持続しており、特殊環境に曝露されることで表皮細胞の悪性化に至ると考えられている (Guerra L, et al. Matrix Biol 63, 1-10, 2017)。しかし、発症機序の多くは不明であり、特に腫瘍細胞が遠隔転移しやすい機序に関しては殆ど解明されていない。腫瘍細胞が遠隔転移するためには、原発巣から血管やリンパ管など周囲組織へ腫瘍細胞が浸潤し、

血流あるいはリンパ流へ合流した後遠隔部組織へ生着し増殖するステップを要する。従って、遠隔転移能は周囲の環境だけでなく腫瘍細胞自体に起因する可能性が高い。DEB 患者の SCC がどのような機序で周囲組織へ浸潤し遠隔転移するかを明らかにすることは、DEB 患者の SCC に対する予防法と治療法開発へと繋がる。



図1 栄養障害型表皮水疱症 (DEB)

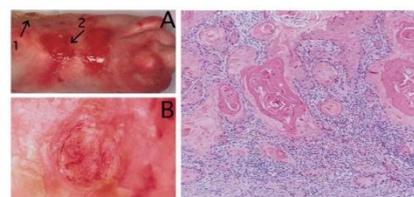


図2 12歳のDEB患者に生じたSCC

2. 研究の目的

本研究の目的は、DEB 患者における SCC が周囲組織へ浸潤し、遠隔転移を生じやすくなる機序を解明することである。DEB 表皮細胞モデルである COL7 遺伝子をノックアウトした不死化表皮角化細胞 (HaCaT 細胞) を作成し、同細胞の 19,500 種類の遺伝子を 1 細胞につき 1 遺伝子ずつランダムにゲノム編集し、癌化し浸潤・転移を来した細胞から標的となった遺伝子を同定する。得られた結果から DEB 患者の SCC における転移能獲得因子を明らかにすることで、DEB 患者の SCC の予防法や治療法の開発などへの応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) DEB 表皮細胞モデル (= GFP+/Cas9+/COL7- HaCaT 細胞) の作成

浸潤・転移した臓器でゲノム編集した細胞を同定し回収する必要があるため、予め Cas9+ HaCaT 細胞を GFP (緑色蛍光) 標識する。pmaxGFP ベクターを Cas9+ HaCaT へトランスフェクションし、7~10 日後にゲノムへ取り込まれ安定発現する細胞を FACS ソーティングする。得られた GFP+/Cas9+ HaCaT 細胞へ、COL7 遺伝子の Exon 5 を標的とする gRNA をトランスフェクションし、GFP+/Cas9+/COL7- HaCaT 細胞をクローニングする。

(2) 19,500 種類の遺伝子を標的とするゲノム編集の導入

(1) で作製した、“GFP+/Cas9+/COL7- HaCaT 細胞” と “GFP+/Cas9+ HaCaT 細胞” へ、19,500 種類の遺伝子を標的とする gRNA が導入されたレンチウイルスベクターライブラリを用いて導入する (Human CRISPR Knockout Pooled Library, Addgene no. 1000000048)。その際、ウイルス titer を測定後、0.3~0.5 コピー/細胞程度の濃度で遺伝子導入し、標的遺伝子の数が 1 細胞あたり一つとなる様に工夫する。

(3) *in vitro* でゲノム編集後に浸潤能を獲得した細胞の同定と解析

19,500 種類の遺伝子の中には、癌化を抑制する機能のタンパクが含まれるはずであり、上記 (2) で作製した細胞には癌化するものが生じると予想される。癌化し浸潤能を獲得した細胞を、“癌細胞浸潤アッセイ” を用い採取する。ゲノム編集用のライブラリはレンチウイルスベクターを使用してゲノムへ組み込まれるため、得られた細胞から DNA を回収し、次世代シークエンスを用いて gRNA の配列を解読することで標的となった遺伝子を同定する。

(4) *in vivo* での COL7 依存性の遠隔転移獲得因子の同定

上記 (2) で作製した 19,500 種類の遺伝子がゲノム編集された HaCaT 細胞を、ヌ-ドマウス皮

下へ移植する。網羅的にゲノム編集された細胞投与群では、移植 5 週後、移植部に腫瘍が形成され、肺や肝臓には転移巣が生じていると予想される。移植細胞は GFP で標識されているため、遠隔転移部から直接、あるいは FACS ソーティングを用い転移した腫瘍細胞を回収する。上記 (3) と同様の手法および次世代シークエンスを用い、標的となった遺伝子を同定する。in vitro の結果と併せ、COL7 の有無で生じる特徴的な標的分子を同定する。

4. 研究成果

(1) 網羅的ゲノムスクリーニングのための不死化表皮細胞の樹立

網羅的ゲノムスクリーニングのため、Cas9 を安定発現する不死化表皮細胞 (HaCaT 細胞) を作成した。遠隔転移を可視化するため、Cas9+ HaCaT 細胞に GFP を強制発現させた。さらに、COL7 遺伝子を標的とする gRNA を導入し、GFP 及び Cas9 陽性 COL7 遺伝子ノックアウト HaCaT 細胞株を樹立した (図 3)。19,500 種類の遺伝子を 1 細胞につき 1 遺伝子ずつランダムにゲノム編集することが出来る GeCKO CRISPR Knock-Out pooled library (addgene) プラスミドからレンチウイルスを作製し、1 細胞あたり 1 遺伝子となるウイルスタイトルを同定した。そして GeCKO library 発現レンチウイルスを、GFP+/Cas9+/COL7+ HaCaT 細胞 (COL7 遺伝子ノックアウト前の宿主細胞) と、GFP+/Cas9+/COL7- HaCaT 細胞へそれぞれ遺伝子導入し、

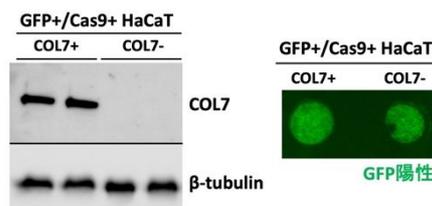


図3 GFP+/Cas9+/COL7- HaCaT細胞の樹立

- A. GFP+/Cas9+/COL7+ HaCaT 細胞 (健康人モデル)
 - B. GFP+/Cas9+/COL7- HaCaT 細胞 (DEB 患者モデル)
 - C. GeCKO+/GFP+/Cas9+/COL7+ HaCaT 細胞 (健康人の SCC モデル)
 - D. GeCKO+/GFP+/Cas9+/COL7- HaCaT 細胞 (DEB 患者の SCC モデル)
- 上記 4 つの細胞群を作成した。

(2) in vitro 転移モデルを用いた網羅的ゲノムスクリーニング

まず、in vitro 転移モデルである癌細胞浸潤アッセイで作成した細胞の浸潤能を評価した。A 及び C の健康人モデル及び健康人 SCC モデルの細胞群をそれぞれマトリゲルコーティングした 8 μm 孔のチャンバ-上で培養した。網羅的に遺伝子がノックアウトされ浸潤能を獲得して孔を通過する前後の細胞からそれぞれ DNA を抽出し、次世代シークエンス (Miseq) で標的となった遺伝子をアンプリコンシークエンスし MAGeCK ソフトウェアで解析したところ、マトリゲルを通過した健康人の SCC モデルでは PICALM 遺伝子ノックアウト細胞が優位に増加していた (図 4)。

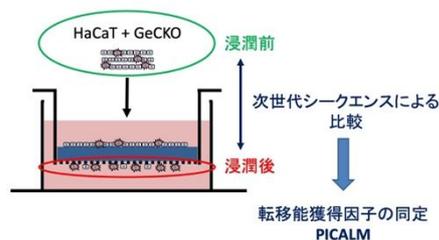


図4 in vitro 転移モデルを用いた網羅的ゲノムスクリーニング

(3) in vivo 皮下腫瘍モデルの樹立

A~D の 4 つの細胞群を免疫不全マウスに皮下注入した。5 週間後、増大した皮下腫瘍、肝臓、肺をサンプリングし、腫瘍の性状と転移の有無を評価した。C 及び D の細胞では肺や肝臓への転移が生じることを期待したが、いずれの細胞でも肺や肝臓への転移細胞を認めなかった。そのため、次世代シークエンスによる転移細胞の解析は行わなかった。一方で、A と B を比較すると、COL7 遺伝子ノックアウト HaCaT 細胞の腫瘍は全体の構築が不整で、周囲に繊維化や血管増生が見られた (図 5)。これらの結果から、COL7 遺伝子をノックアウトした皮膚腫瘍は基底膜構築異常を介した周囲の組織環境変化を引き起こすことが示唆され、これらの変化が DEB 患者における SCC の遠隔転移メカニズムの一因である可能性がある。

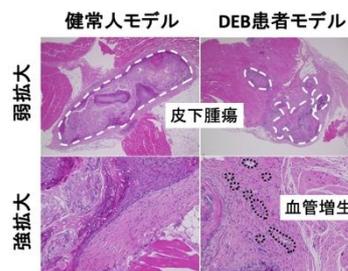


図5 in vivo 皮下腫瘍モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinkuma S, Nakamura H, Maehara M, Takashima S, Nomura T, Fujita Y, Hasegawa S, Sato-Matsumura K, Abe R, Shimizu H	4. 巻 99(12)
2. 論文標題 Electron Microscopic and Immunohistochemical Findings of the Epidermal Basement Membrane in Two Families with Nail-patella Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 1110 ~ 1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3318	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 -
1. 著者名 Matsumura Wakana, Fujita Yasuyuki, Shinkuma Satoru, Suzuki Shotaro, Yokoshiki Saki, Goto Hideki, Hayashi Hiroshi, Ono Kota, Inoie Masukazu, Takashima Shota, Nakayama Chihiro, Nomura Toshifumi, Nakamura Hideki, Abe Riichiro, Sato Norihiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 139(10)
2. 論文標題 Cultured Epidermal Autografts from Clinically Revertant Skin as a Potential Wound Treatment for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2115 ~ 2124.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.03.1155	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 -
1. 著者名 Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Nomura Toshifumi, Ujiie Hideyuki, Natsuga Ken, Iwata Hiroaki, Nakamura Hideki, Vorobyev Artem, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 139(8)
2. 論文標題 Efficient Gene Reframing Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa with CRISPR/Cas9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1711 ~ 1721.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.02.015	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 該当する
1. 著者名 Fujimura Yu, Watanabe Mika, Ohno Kota, Kobayashi Yasuaki, Takashima Shota, Nakamura Hideki, Kosumi Hideyuki, Wang Yunan, Mai Yosuke, Lauria Andrea, Proserpio Valentina, Ujiie Hideyuki, Iwata Hiroaki, Nishie Wataru, Nagayama Masaharu, Oliviero Salvatore, Donati Giacomo, Shimizu Hiroshi, Natsuga Ken	4. 巻 22
2. 論文標題 Hair follicle stem cell progeny heal blisters while pausing skin development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e50882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202050882	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 該当する

1. 著者名 Imafuku Keisuke, Kamaguchi Mayumi, Natsuga Ken, Nakamura Hideki, Shimizu Hiroshi, Iwata Hiroaki	4. 巻 384
2. 論文標題 Zonula occludens-1 demonstrates a unique appearance in buccal mucosa over several layers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 691 ~ 702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03425-8	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 -

1. 著者名 Fujita Y., Nohara T., Takashima S., Natsuga K., Adachi M., Yoshida K., Shinkuma S., Takeichi T., Nakamura H., Wada O., Akiyama M., Ishiko A., Shimizu H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Intravenous allogeneic multilineage differentiating stress enduring cells in adults with dystrophic epidermolysis bullosa: a phase 1/2 open label study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e528-e531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.17201	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Fujimura Y, Watanabe M, Ohno K, Kobayashi Y, Nakamura H, Lauria A, Proserpio V, Ujiie H, Iwata H, Nishie W, Nagayama M, Oliviero S, Donati G, Shimizu H, Natsuga K
2. 発表標題 Hair follicle stem cell progeny repair subepidermal blisters at the expense of skin development.
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashima S, Shinkuma S, Fujita Y, Nomura T, Ujiie H, Natsuga K, Iwata H, Nakamura H, Vorobyev A, Abe R, Shimizu H
2. 発表標題 Efficient gene reframing therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa with CRISPR/Cas9
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Virtual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosumi H, Watanabe M, Shinkuma S, Nohara T, Fujimura Y, Tsukiyama T, Donati G, Nakamura H, Iwata H, Ujiie H, Natsuga K
2. 発表標題 Wnt/ -catenin signaling regulates hemidesmosomes in keratinocytes
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology(Kyoto, Japan)
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
研究分担者	西江 渉 (Nishie Wataru) (20443955)	北海道大学・医学研究院・客員教授 (10101)	
研究分担者	柳 輝希 (Yanagi Teruki) (50755973)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	泉 健太郎 (Izumi Kentaro) (50793668)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

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