

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650620

研究課題名(和文) 高感度人工レポーターを用いた乳癌幹細胞治療標的遺伝子の発現クローニング

研究課題名(英文) Application of sensitive EMT/MET reporter to identification of target genes for breast cancer stem cells.

研究代表者

吉川 清次 (Yoshikawa, Kiyotsugu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40333562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：EMTレポータースクリーニングにて、EMTを誘導因子としてSnail・Twist2を、EMTと協調してHMLEに軟寒天コロニー形成能を付与する遺伝子としてミトコンドリア電子伝達系構成因子、シグナル伝達ハブ遺伝子が同定されノックダウン実験では、SUM159間葉乳癌細胞のコロニー形成を抑えることが分かった。METスクリーニングでは、E-cadherin発現を強力に誘導するshRNA(shP1と命名)を同定した。軟寒天コロニー形成能の解析から、SUM159細胞にはshP1に感受性をもち軟寒天コロニー形成能が低下する集団と、shP1によりコロニー形成能が変化しない細胞集団が存在することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify cDNA/shRNA that can induce EMT or MET, we established a reporter system where vimentin or E-cadherin promoter drives blasticidine-resistant gene and GFP in HMLE epithelial or MDA-MB-231 mesenchymal breast cancer cell line. The cells were infected with cDNA or shRNA library and subjected to blasticidine selection. In EMT screening, Snail and Twist2 were identified as EMT inducer, and two genes, members of mitochondrial complex I, and a hub gene in signal transduction were identified to support soft agar-colonogenicity of mesenchymal cells. In MET screen, a potent MET-inducing shRNA (called shP1) was identified. The shP1 was tested for soft agar colony formation using monoclonal dual reporter cell clones from SUM159 mesenchymal breast cancer cell line. Interestingly, there are two sets of reporter clones with different response to shP1. Colony formation did not decreased in one set of reporter clones, while in the other clone shP1 reduced colony formation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

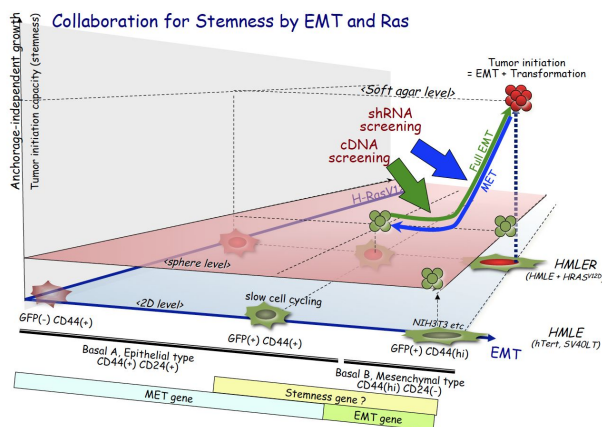
キーワード：EMT 乳癌幹細胞 MET レポーター 発現クローニング トリプルネガティブ乳癌

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療においては、trastuzumab・imatinib等の分子標的薬が登場し、それまで予後不良であったHER2陽性乳癌・慢性骨髄性白血病の治療は格段に進歩した。しかしホルモン受容体・HER2陰性のいわゆるtriple negative (TN)乳癌は、分子標的が未だ同定されておらず、臨床上的の問題となっている。化学療法抵抗性のメカニズムとして癌幹細胞の存在が示唆されている。ヒト乳癌組織はCD44^{hi}CD24^{lo}細胞表面マーカーで識別できる不均一な細胞集団であり、NOD/SCIDマウスに移植した場合、CD44^{hi}CD24^{lo}細胞集団がより効率よく腫瘍を形成することが判っている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983-3988, 2003)。乳癌は遺伝子発現解析によりluminal A/B, basal A/Bに分類される事が知られている。basal type乳癌はホルモン受容体・HER2ともに陰性のtriple negative (TN)乳癌に大まかに対応している。腫瘍形成能の高い細胞集団はCD44^{hi}CD24^{lo}でありbasal Bに分類され、上皮マーカーの発現が失われ、TGFシグナル関連遺伝子、特に間葉系遺伝子の発現が亢進しepithelial-mesenchymal transition (EMT)を起こした細胞であることが判った(Cancer Cell, 11:259-273, 2007)。ヒトin vitro発癌細胞モデルHMLE/HMLER細胞では、EMTの結果、乳癌幹細胞の表現型であるCD44^{hi}CD24^{lo}細胞が誘導され、効率的にsphereを形成する。マウス正常乳腺ではCD49f^{hi}CD24^{med}分画が乳腺再構築能のある正常乳腺幹細胞を内包しているが、この分画も間葉系マーカー遺伝子の発現を亢進している。造腫瘍性には癌遺伝子とEMTの両方が必要であることが報告された(Cell 133:704-715, 2008, 図1)。以上のことから、EMTが正常乳腺と乳癌の両方の幹細胞特性と密接な関係がある事、TN乳癌、なかでもbasal B乳癌と関連がある事が判ってきた。しかし未だ正常乳腺幹細胞を定義できるマーカーが存在せず、EMTの特徴と幹細胞特性を持つ間葉系乳癌の治療標的も未だ同定である。乳癌幹細胞特性であるEMT誘導因子を同定するための新規スクリーニング系を確立しており、Snailを単離している。

図1 EMTと癌遺伝子の協調性



2. 研究の目的

EMT/MET レポーターを用いたスクリーニングにより、癌遺伝子と協調して働くEMTの制御因子を同定すること、また間葉系乳癌細胞においては阻害することで上皮系細胞に分化し得る遺伝子を同定する。これにより、乳癌幹細胞の治療標的遺伝子を網羅し、乳癌組織内の幹細胞を標的にした化合物探索につなげるのが目的である(図1、2)。

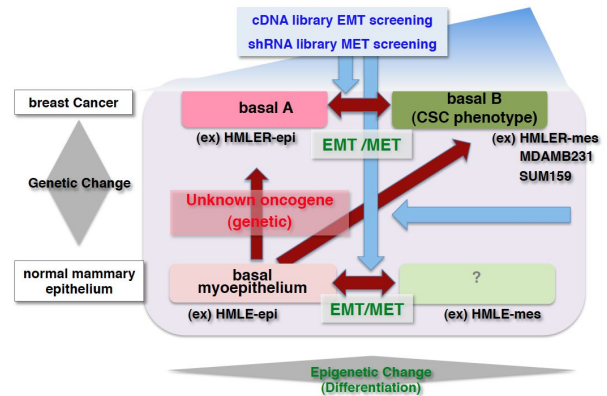


図2 EMT/METスクリーニングの概要

3. 研究の方法

乳腺細胞株においてEMTレポーターに加えて、METレポーターを確立する。間葉系乳癌細胞におけるMET誘導のコントロールとして、iPS細胞リプログラミングの手法を用いる。EMTレポーターに対してレトロウイルスcDNAライブラリー、METレポーターに対してレンチウイルスshRNAライブラリーを用いた発現クローニングを行う。blasticidine耐性遺伝子とGFP発現によるポジティブセレクションにより、目的の細胞クローンを単離し、インサートcDNA、shRNAはPCR産物のシークエンスにより遺伝子を同定する。得られた遺伝子・shRNAを再度EMT/MET両レポーター細胞に導入することでその効果を検証する。検証された遺伝子については、過剰発現・ノックダウンによるEMT誘導能、ソフトアガーコロニー形成能を機能的に検証する。同時にluminal及びbasal両方を含む乳癌細胞株と乳癌臨床検体における定量PCRと免疫組織学的解析にて、サブタイプや臨床病理学的因子(stage, grade, 脈管浸潤)との関連をみる。

4. 研究成果

EMT cDNA library screening:

EMTマーカーのvimentinプロモーター活性をblasticidine耐性遺伝子とGFPの発現にて検出するレポーター系をHMLE乳癌細胞にて確立し、Basal B乳癌細胞株BT549cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、Snail、Twist2を含む複数の1次候補遺伝子を同定した(図3)。EMTと協調してHMLEに軟寒天コロニー形成能を付与するもの遺伝子として、ミトコンドリア電子伝

達系 complex 1 の構成因子遺伝子 2 つ、シグナル伝達のハブとして機能が報告されている遺伝子 1 つが同定された。

EMT screening of cDNA (BT549) library

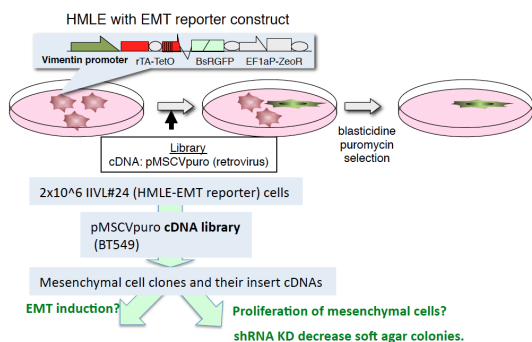


図 3 EMT スクリーニングの概要

これらの遺伝子は、HMLE 乳腺上皮細胞に対する EMT 誘導能はないものの、Snail により誘導される EMT を起こした細胞で EMT と協調して軟寒天コロニー形成能を高める能力があることを dox 誘導系を用いて確認した。ノックダウン実験では、HMLE 間葉細胞・Ras 導入間葉乳腺細胞 (HMLER-mes) の増殖を抑えることが分かった。SUM159 間葉乳癌細胞株におけるノックダウン実験では、コロニー形成が下がることが判明した。

MET shDNA library screening:

乳腺細胞株 MDA-MB-231 細胞において、E-cadherin プロモーター活性を blasticidine 耐性遺伝子と GFP の発現にて検出する MET レポーターを確立した。レンチウイルス shRNA library を用いた発現クローニングを行った (図 4)。

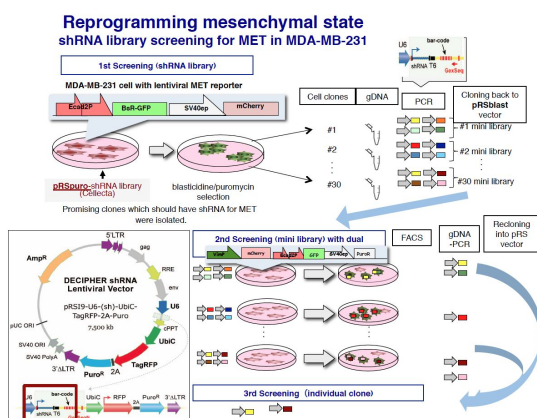


図 4 MET スクリーニングの概要

blasticidine 耐性によるポジティブセレクションにより、56 個の細胞クローンを単離し、PCR 産物のシーケンスにより shRNA 配列を決定した。EMT/MET を GFP, mCherry 発現によりモニターできるレンチウイルスベクターを新たに開発し効果を検証した。16 個の shRNA により E-cadherin プロモーター活性が上昇することが分かった。なかで最も E-cadherin 発現を誘導する、shRNA

(shP1 と命名) を同定した。shP1 による軟寒天コロニー形成能への影響を SUM159 及び、複数の SUM159 EMT/MET monoclonal レポーター細胞を用いて解析した結果、SUM159 細胞株には、shP1 に感受性をもち軟寒天コロニー形成能が低下する集団と (図 5) shP1 によりコロニー形成能が変化しない細胞集団が存在することが判明した。このことから SUM159 細胞における、shP1B に対する感受性を決める未同定の因子の存在が示唆される。

shP1 induce MET and reduce soft agar-colonogenicity in SUM159.

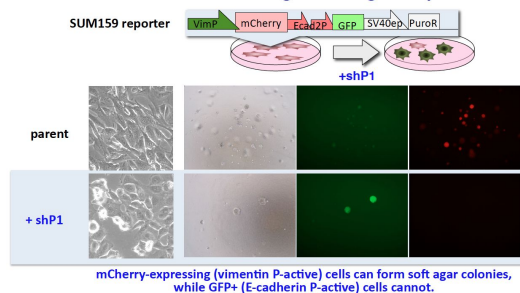


図 5 shP1 による MET 誘導と軟寒天コロニー形成低下

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Itou, J., Matsumoto, Y., Yoshikawa, Y. and Toi, M. (2013) *Sal-like 4 (SALL4) is the factor for cell dispersion in basal-like breast cancer* *FEBS Letters* **587**, 3115-21

[学会発表](計 4 件)

Application of sensitive epithelial-mesenchymal transition (EMT) reporter to identification of mammary stem cell-related genes. OOTR 8th annual conference Yoshikawa K. 2012 年 4 月

Application of sensitive EMT reporter to identification of mammary stem cell-related genes. Gordon Research Conference, mammary gland biology, Barga, Italy. Yoshikawa, K., Matsumoto, Y., Ito, J., Shiojiri Y., Reinherz E., To M. (2012.6)

Application of sensitive EMT reporter to identification of mammary stem cell-related genes. AACR tumor invasion and metastasis meeting, San Diego, USA. Yoshikawa, K., Matsumoto, Y., Ito, J., Shiojiri Y., Reinherz E., To M. (2013.1)

EMT/MET レポーターを用いた網羅的乳癌幹細胞標的遺伝子の同定の試み 松本純明、伊東潤二、塩尻好恵、Ellis Reinherz, 戸井雅和、吉川清次 (2013) 第 21 回日本乳癌学会 浜松 6 月 27 日-29 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dsk.med.kyoto-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

吉川清次（Kiyotsugu Yoshikawa）

研究者番号：40333562

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし