

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05990

研究課題名(和文) 癌細胞から正常細胞への細胞外プッシュミーアウトシグナル関連分子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes related to signals from transformed cells

研究代表者

丸山 剛 (Maruyama, Takeshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：30613872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞層に、がん変異細胞が生じた時、その変異細胞は正常細胞層から排除される。この現象は、変異細胞が単独で存在するときには見られない。そのため、変異細胞側からシグナル発信により、正常細胞の抗腫瘍能を惹起していると考えられる。しかし、この変異細胞からのシグナルの実体は不明である。正常細胞で発現が亢進している遺伝子の更に下流で発現しているタンパク質に注目したところ、プロスタグランジン群であることが分かった。種々の解析から、特定のプロスタグランジンが変異細胞の逸脱能を抑制していることがわかった。本研究から、変異細胞自身が逸脱しようとするのを、正常細胞側からのシグナルが制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Transformed cells surrounded by normal cells are eliminated from epithelium. Since the elimination does not occur under the condition of single culture, there should be some cross-talk signals between normal and transformed cells. From microarray analyses, we identified several genes that is up-regulated inside of normal cells. Prostaglandins were the downstream of a gene identified in the microarray analyses. Furthermore, a prostaglandin attenuated the elimination efficiency of transformed cells, indicating that signals from normal cells are also important to regulate the elimination of transformed cells.

研究分野：生物学

キーワード：哺乳類細胞競合 細胞死 がん

1. 研究開始当初の背景

癌化過程にある変異細胞の排除機構を詳細に理解することは、抗腫瘍治療法の開発および予防的医療の観点から重要な研究対象である。最近ノーベル賞を受賞したスタインマン博士の研究は、免疫による生体防御機能を用いることで癌を排除する、いわゆる癌免疫治療の発展に大きく寄与してきた。しかしながら、この免疫システムの制御は、多数の因子が複合的に関与するため、効果的な抗腫瘍療法の実立も複雑化してしまう。また、発生してから中・後期の腫瘍は、抗腫瘍免疫を抑制する機能を獲得し、免疫を逃れることも報告されている。これらの問題を解決し、より単純な抗腫瘍機構を基にした癌治療法の開発が求められている。

申請者らは、テトラサイクリン依存性のがんタンパク質 (Ras、Src など) の発現あるいはがん抑制タンパク質 (Scribble など) の発現抑制を誘導できる上皮培養細胞系を確立し、哺乳類の上皮正常細胞が変異細胞を積極的に排除するという「抗腫瘍作用」があることを世界で初めて明らかにしてきた。例えば、がん遺伝子 *Src* 変異細胞や *Ras* 変異細胞を正常上皮細胞と共培養すると、変異細胞が正常上皮細胞層からはじき出されるように管腔側 (体内への浸潤とは逆方向) へ排出されることが観察された (Hogan et al. *Nat. Cell Biol.* 2009)。また、がん抑制遺伝子 *Scribble* 変異細胞や *Mahjong* 変異細胞を正常上皮細胞と共培養すると、変異細胞がアポトーシスを起こし正常上皮細胞層から失われていくことも明らかとなった (Tamori et al. *Plos Biol.* 2010)。重要なことに、これらの現象は変異細胞のみの存在下では起こらない。このことは、正常上皮細胞と変異細胞間のクロストークが、変異細胞の上皮細胞層からの除去を引き起こす、すなわち正常上皮細胞が変異細胞を駆逐する能力を有していることを示している。

最近我々は、この正常細胞が変異細胞を排除する「抗腫瘍機能」についての正常細胞内の詳細な分子機構を示してきた (Kajita et al. *Nat. Commun.* 2014)。正常細胞は、フィラミンなどの細胞骨格形成因子を積極的

に細胞境界面に集積させることで、物理的に変異細胞を押し出そうとするモーメントを作り出している。また、この変異細胞を押し出すためのフィラミンの集積は、Rho/Rho キナーゼシグナル伝達経路によって引き起こされることも示唆してきた (図 2)。しかしながら、この Rho/Rho キナーゼ-フィラミン経路がどのように惹起されるか、その上流シグナルは依然不明である。共培養特異的に正常細胞内でシグナルが惹起されることから、i) 変異細胞側からの未知の細胞外シグナル (細胞外液性因子、接着面の膜受容体など) により、正常細胞の受容体などを介して、押し出し機能が惹起されることが予想される。また、これまで報告してきた知見に加え、共培養特異的な正常細胞内の遺伝子発現を、マイクロアレイ解析によりプロファイリングしたところ、細胞間接着因子群や膜タンパク質受容体を含むいくつかの遺伝子 [正常細胞内-共培養特異的誘導遺伝子 (Co-culturing-induced genes in normal cells: CCI 遺伝子)] の増減が確認されている。興味深いことに、Rho/Rho キナーゼシグナルとの関与が報告されていない遺伝子発現に優位な差も確認された。この結果への 1 つの解釈としては、ii) Rho/Rho キナーゼシグナル以外にも、正常細胞内の押出機能を惹起するシグナル伝達経路が存在する可能性を示唆している。しかしながら、i) の細胞外シグナル関連分子同様、これまで正常細胞の押出機能を惹起するシグナル伝達経路は不明である。そこで、本研究では、マイクロアレイ解析で同定した遺伝子 (CCI 遺伝子) の発現をモニターできるレポーターアッセイ系を正常細胞で構築し、このレポーター系を用いて、変異細胞側の全ゲノムを対象とした CRISPR/Cas9 ノックアウトスクリーニングにより、変異細胞から発せられる未同定の細胞外シグナルに關与する因子を網羅的に同定することを目的とする。スクリーニングで同定した細胞外シグナル関連分子の受容体などの情報を基に、正常細胞の押出シグナル伝達候補経路を絞り込むまでを今回の目標とする。ii) に対する押出シグナル伝達経路の詳細な解析は、今回の期

間内目標外とする。

## 2. 研究の目的

本研究では、i)の細胞外シグナル関連分子群を同定することを期間内の基本目標とする。同定された細胞外シグナル関連分子の受容体などの情報を基に、正常細胞内シグナル伝達経路の候補を絞り込むことを目標とする。方法としては、1年目に、正常細胞内で誘導される CCI 遺伝子群の遺伝子座に mCherry などの蛍光レポーター遺伝子を挿入し、それぞれの CCI 遺伝子発現をイメージング解析により定量的に検出できるレポーター細胞を作製する。この蛍光レポーター細胞を用いたスクリーニング系の構築と最適化をおこなう。2年目では、全ゲノムを対象とした CRISPR/ Cas9 レンチウイルスライブラリーを用いて、個々の遺伝子をノックアウトした変異細胞と、レポーター細胞との共培養によって、スクリーニングをおこなう。二次スクリーニングと生化学的な検証実験により、同定された遺伝子が変異細胞の押出排出に関与するかを解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) テトラサイクリン誘導性 GFP-RasV12 安定発現細胞株の樹立

マウスもしくはヒトの全ゲノムを対象とする single guide (sg) RNA ライブラリー (Shalem et al. *Science* 2014, Wang et al. *Science* 2014, Yusa et al. *Nat. Biot.* 2014 など) を用いるため、マウス/ヒト由来細胞テトラサイクリン誘導性 GFP-RasV12 安定発現細胞株(Tet-on/GFP-RasV12 細胞)が、変異細胞として必要となる。これまで、Tet-On/GFP-RasV12-MDCK(イヌ腎臓由来)細胞樹立では、収率が低いこと、テトラサイクリン非誘導性株の高頻度出現や発現の不均一性が問題となっていた。これらの問題を解決するため、リコンビナーゼにより対象遺伝子を特定の遺伝子座に導入できる Flippase システムを導入し、上記問題点を打開し、安定細胞株を樹立する。申請者の CRISPR/Cas9 ノックイン技術

(Maruyama et al. *Nat Biot* 2015)を活かし、Flippase のターゲット配列である、FRT 配列を *Rosa26* 遺伝子座に CRISPR/Cas9 システムにより導入し、FRT 配列ノックイン細胞を樹立する。

FRT 配列ノックイン細胞に、Tet-On-CMV/GFP-RasV12 カセットを挿入したベクター (pFRT-TetOn-CMV-GFP-RasV12)および Flippase 発現ベクターを遺伝子導入し、リコンビネーションによって、*Rosa26* 遺伝子座に同 DNA カセットを挿入し、Tet-on/GFP-RasV12 ヒト/マウス細胞を樹立する。

### (2) 共培養特異的な CCI 遺伝子発現をモニターするためのマルチレポーター「正常」細胞株の樹立

研究目的 ii)で触れた通り、CCI 遺伝子発現制御には2つ以上の正常細胞内シグナル経路が関与する可能性がある。これは、複数のシグナル伝達経路が、異なる転写因子を使って CCI 遺伝子「群」の発現を制御している可能性を内包する。すなわち、1つの CCI 遺伝子の発現を指標としたスクリーニングでは、ヒット遺伝子(細胞外シグナル因子)の取り溢しを生じる危険性がある。そのため、複数のシグナル経路もしくは転写因子によって CCI 遺伝子発現が制御されているかを予測するため、パスウェイ解析およびプロモーター解析をおこなう。仮に2つの「異なる」シグナル経路-転写因子があり、CCI 遺伝子も2つのグループに分けられた場合には、それぞれの CCI 遺伝子グループの中から1つずつの遺伝子を選択する。この時の遺伝子の選択基準は、スクリーニングを考慮し、共培養依存的な発現変動量と発現量の多い CCI 遺伝子を優先的に選択する。選択した2つの CCI 遺伝子の C 末端に異なる蛍光タンパク質 (mCherry, Sirius など) をノックインし、2つの遺伝子発現を同時検出できるダブルレポーター細胞を樹立する。これにより、ヒット遺伝子の取りこぼしを最小限にする。

(3) Tet-on/GFP-RasV12 細胞とレポーター正常細胞の共培養依存的な正常細胞内の二色蛍光強度をイメージング解析により二色同

## 時定量解析する

ROI(region of interest:解析対象領域)の起点を GFP 陽性変異細胞の外周とし、周辺にある正常細胞内の蛍光強度を定量測定する。

共培養時に変異細胞周辺にあるレポーター正常細胞の中で、十分な蛍光強度が得られるか、いわゆるダイナミックレンジが十分に得られるかを検討する。この時スクリーニングに適するかは、Z' factor を用いてダイナミックレンジの十分性を評価し、細胞株および遺伝子の精選をおこなう。

(4) 全ゲノムを対象とした CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトスクリーニング

変異細胞にプールド sgRNA/Cas9 発現レンチウイルスライブラリーを感染させる。感染させた変異細胞を 1 ウェルあたり 1 細胞になるように、予め正常細胞を播種した 1536 ウェルプレートに撒く。両種細胞が接着した後、テトラサイクリンにて GFP-RasV12 の発現を誘導し、周辺正常細胞の mCherry および Sirius 由来の蛍光をイメージングアナライザーにて定量的に解析する。ノックアウトによって蛍光が減弱しているウェルにて、単一細胞ジェノタイピングをおこなう。これにより、sgRNA のガイド配列部位のみを PCR により増幅し、ターゲット遺伝子を同定する。ライブラリーのスケールは、(全遺伝子数) $\times$ (一遺伝子に対して 4 sgRNA)= 80000 の sgRNA が含まれる。このため、スクリーニングに約 52 枚の 1536 ウェルプレートを使い、一次スクリーニングを二回おこなう。最終的に、全ゲノムより 100 遺伝子程度まで絞り込む。

(5) 検証スクリーニングおよび生化学的手法による検証

検証二次スクリーニングでは、で作製した他の CCI 遺伝子発現をモニターできるレポーター細胞を用いて、さらなる絞り込みをおこなう。最終的には、ヒト、マウス細胞もしくは、すでに細胞競合が見やすい MDCK 細胞にて、共焦点顕微鏡下で細胞競合の有無を確認する。共培養特異的な正常細胞内の遺伝子発現を、マイクロアレイ解析によりプロファイリングしたところ、特

定の遺伝子の増減が確認された。さらに発現が増強した遺伝子について、詳細な解析をおこなったのち、HA タグや GFP タグなどを遺伝子のプロモーター下流に挿入し、レポーター細胞を作製する。

## 4. 研究成果

同定した遺伝子の解析をおこなっている過程で、液性因子の上流であることが分かった転写因子が発現亢進していることに注目した。同液性因子は、プロスタグランジン・ファミリーに属し、正常細胞から放出され、変異細胞の逸脱効率を負に制御することが分かってきた。このことから、正常細胞側からのシグナルも変異細胞の排除を制御することが分かってきた。

当初の目的としていた、細胞外シグナルを同定するという目的は達成された。さらなる解析をするため、作製したレポーター細胞を用いて、CRISPR/Cas9 スクリーニングをおこなう予定である。

## 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)

Maruyama T, Saitoh S, Yako Y, Kajita M, Fujioka Y, Ohba Y, Kasai N, Sugama N, Kon S, Ishikawa S, Hayashi T, Yamazaki T, Tada M and Fujita Y Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2017) 査読有 114(12):E2327-E2336 10.1073/pnas.1701746114.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者：丸山 剛

(MARUYAMA, Takeshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：30613872

(2)研究分担者  
なし  
研究者番号：

(3)連携研究者  
なし  
研究者番号：

(4)研究協力者  
なし