

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月30日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09438

研究課題名(和文) Establishment of a synthetic promoter-based system for sensing oncogenic alteration in human live thyroid cells at a single-cell level

研究課題名(英文) Establishment of a synthetic promoter-based system for sensing oncogenic alteration in human live thyroid cells at a single-cell level

研究代表者

サエンコ ウラジミール (SAENKO, Vladimir)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：30343346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、一個の生細胞レベルでがん遺伝子活性化を検出できるシステムの構築である。このシステムには、がん遺伝子導入によって引き起こされる遺伝子発現亢進と関連する転写因子結合領域を組み込んだ人工プロモーターによる蛍光レポーターを用いた。まず、転写因子結合領域ライブラリーに対するスクリーニングを二重発光アッセイを用いて行った。最適なプロモーターを蛍光レポーターベクターに組み込み、がん遺伝子をコードしたベクターと共にトランスフェクションすることによってさらなるスクリーニングを行った。選り出したいくつかのベクターを標的細胞に安定導入し、がん遺伝子によって誘導される蛍光を検出できることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a system for sensing oncogene activation at a single-cell level in live cells was the purpose. The system employs a fluorescent reporter driven by a synthetic promoter consisting of transcription factor binding sites (TFBSs) that correlated with upregulation of gene expression after oncogenic challenge. The library of single- or multiple-copy TFBSs was prepared and screened for activity in a dual-luminescent assay. The best promoters were inserted into the fluorescent reporter plasmid and screened by cotransfection with small amounts of oncogene-encoding vectors. Several selected synthetic promoter-reporter plasmids were stably transfected into target cells, which after transfection with oncogene-encoding vectors displayed a fluorescent signal observed by live cell imaging.

研究分野：分子生物学

キーワード：甲状腺癌 癌遺伝子 遺伝子プロモーター 合成生物学 単一細胞レポーター

1. 研究開始当初の背景

甲状腺がんは最も頻繁に見られる内分泌系の悪性腫瘍であり、過去数十年間に渡って世界的に発生率が上昇傾向にある。日本では年齢調整した甲状腺がんの発生率は、人口 10 万人当たり、1975 年の 1.4 から、2007 年には 5.1 になった。甲状腺乳頭がん (PTC) が主な組織型であり、2003 年には国内のすべての甲状腺がんの 92.5% を占めていた (*Takami H, World J Surg 2011*)。2011 年 3 月に起きた福島第一原発での大規模事故により、甲状腺がんへの特別な関心が向けられるようになった。

電離放射線は甲状腺がん発生リスクを高める環境因子である。特に小児期の被ばくはリスクが高い。人工的に放射線照射した甲状腺細胞において、遺伝子の再配列が起きる確率が被ばく線量に応じて高くなる (*Caudill, JCEM 2005*)、また日本の原爆被ばく者 (*Hamatani, Cancer Res 2008*)、およびチェルノブイリ周辺の住民 (*Leeman-Neill, Cancer 2013*) においても同様の傾向が認められている。今までに、遺伝子変異イベント、特に腫瘍の発生早期に起こるとされるがん遺伝子の生成を容易に検出するシステムは存在しなかった。例えば遺伝子の再配列は、1-10Gy の γ 線照射によって 10^6 個の細胞中 2-4 個しか生じず、数個の細胞におけるがん遺伝子発生の検出は技術的に難しく、過去の研究ではかなりの時間とコストが掛かる手法を用いるしか方法がなかった (*Caudill, JCEM 2005*)。よって、生細胞において一細胞のレベルでがん遺伝子発生を検出できる高感度で汎用的なシステムへのニーズは非常に高い。

PTC において高頻度に認められる遺伝子異常は遺伝子再配列 (*RET/PTC*, *TPR-NTRK1*, *ETV6/NTRK3*, *AKAP9/BRAF*, *EML4/ALK*) および前がん遺伝子の点突然変異 (*BRAF^{G60E}* and *RAS-family members*) である。これら様々な遺伝子再配列と点突然変異は、それぞれ異なった下流のシグナルに影響を与える可能性があるが、共通のものは MAP キナーゼ経路を活性化する能力である。PTC においてがん遺伝子ごとに遺伝子発現の違いが報告されてきたが、有意に発現が増加または低下するものだけでも数百遺伝子が認められている (*Giordano, Oncogene 2005*)。培養正常甲状腺細胞に異なるがん遺伝子を導入すれば、同様に発現が変化する共通の遺伝子セットを特定することができると考えられる。

この遺伝子セットは、バイオインフォマティクスと統計学的アルゴリズムによりプロモーター解析に用いることができ、この解析によって、それぞれの転写因子結合領域の重要性 (効果量および統計学的有意性) を算出し、最も強力な転写因子結合領域を用いてプロモーターライブラリーを合成、さらに感度と特異度をスクリーニング後に最適な人工プロモーターを作成できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、一個のヒト甲状腺生細胞内におけるがん遺伝子の生成を検出できるシステムの確立である。非常に高い感度が必要になるので、人工プロモーターによる蛍光レポーターシステムを採用した。人工プロモーターには、甲状腺細胞におけるがん遺伝子刺激による遺伝子発現亢進と関連する転写因子結合領域を含む。また、複数のそのような転写因子結合領域を一つの配列に組み入れることによって、生細胞内の蛍光レポーター発現を制御するのに最適な合成プロモーターを作ることができる。このようなシステムは、放射線を含む環境因子や、がん遺伝子を活性化させ甲状腺がんのリスクを高めるそれらの組合せの特定に用いることができる。

3. 研究の方法

(1) ヒトの甲状腺由来の不活化 Nthy-ori 3-1 細胞へ、*RET/PTC1* と *BRAF^{G60E}* がん遺伝子を導入した。対照群としては TurboRFP (TRFP) が用いられた。いずれにも我々の実験室でつくられた 3' -end に V5 タグをもつレンチウイルスベクターが用いられた。これらレンチウイルスは 293FT 細胞で作成し、標的細胞に感染させるために用いられた。V5 タグ付きがん遺伝子または対照としての TRFP タンパク発現は、 $>70\%$ の感染効果があることを蛍光免疫染色法および Western blotting によって確認した。

(2) 遺伝子導入された細胞の RNA を 48 時間の培養の後 Isogene によって抽出、DNase で処理した後、Qiagen コラムを用いて精製した。RNA の質は Agilent 2100 Bioanalyzer によって、RIN >8 であることを確認した。遺伝子発現プロファイルは Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 マイクロアレイを用いて解析した。得られたシグナルは、GeneSpring GX ソフトを使い、TRFP 対照群と比較して 2 倍以上発現が変化した遺伝子を抽出した。

(3) 発現が変化した遺伝子の転写開始地点 -2000 から +500bp のプロモーター領域の配列をデータベースからダウンロードし、転写因子結合領域の存在は、JASPAR データベースを用いてスコア閾値 90% で検出した。さらにプロモーター近位領域 (転写開始部位 -500bp から +500bp) に関しては、全マイクロアレイデータセットに対する ISMARA プラットフォーム (<https://ismara.unibas.ch/fcgi/mara>) を用いて解析した。これによって、がん遺伝子における遺伝子発現亢進に関連するもっとも重要な転写因子結合領域を同定した。

(4) 5' リン酸化によってライゲーション可能な EcoRI 断端をもち、転写因子結合領域に相当する合成二本鎖オリゴヌクレオチドのセットを用意した。このオリゴヌクレオチドを連結し、pEZx-ePG04 (GLuc/SeAP) プラスミ

ドに挿入、ライブラリーを作成した。個々のプラスミドを精製、シークエンスを確認した後、*RET/PTC1*、*BRAF^{V600E}* もしくは *TRFP* 発現ベクターと同時に Nthyr-ori 3-1 細胞へトランスフェクションし、プロモーター活性は 48-well フォーマットの分泌二重発光アッセイシステムを用いて測定した。

(5) 上記二重発光アッセイで良好な反応を示したシングルコピー、あるいは連結したものの、あるいは混成の転写因子結合領域を、pZsGreen1-DR レポーター・ベクターに挿入した。

(6) 発光ルシフェラーゼアッセイにおけるプロモーター活性がどのように蛍光 GFP シグナルに反映されるかを確認するために、人工プロモーター/pZsGreen1-DR レポータープラスミドライブラリーと少量の *RET/PTC1* と *BRAF^{V600E}* をエンコードするベクターとの一時的な共トランスフェクションを用いてスクリーニングを行った。シグナル=ノイズ比および特異性の面で許容範囲内の蛍光がいくつかの人工プロモーター/ZsGreen1-DR コンストラクトで認められた。

(7) これらのプラスミドを安定的に Nthyr-ori 3-1 細胞に導入し、クローンをネオマイシンを用いて選択した。これらのうち、無視できるレベルのバックグラウンド蛍光をもつサブクローンのみを使用することとした。これらのサブクローン細胞は、*RET/PTC1* と *BRAF^{V600E}* コードするベクターをトランスフェクションし、GFP シグナルの誘導を生細胞イメージングを用いて観察した。

4. 研究成果

(1) がん遺伝子および TRFP の Nthyr-ori 3-1 細胞への導入 蛍光免疫染色にて細胞への導入効率 >70%を達成するために、レンチウイルスベクターが用いられた。形態学的に、がん遺伝子を導入された細胞は、間葉系細胞的な変化が見られた (図 1)。

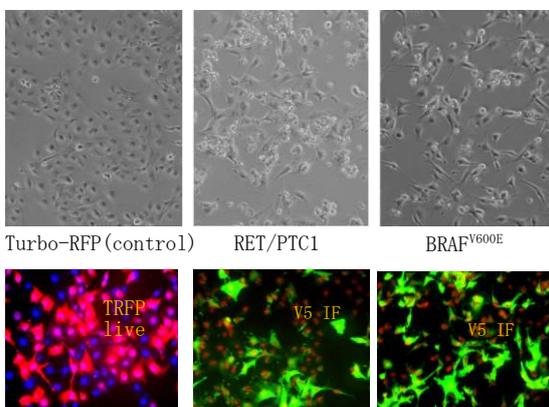


図 1

MAP キナーゼ経路の活性化 (pERK1/2) は、がん遺伝子導入細胞において確認されたが、無処理の親細胞や TRFP 導入細胞においては確認

されなかった (図 2)。

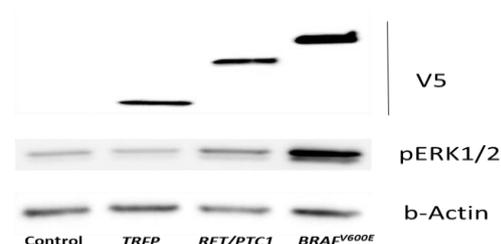


図 2

(2) マイクロアレイ遺伝子発現解析 Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 マイクロアレイによって、*RET/PTC1* もしくは *BRAF^{V600E}* を感染させた細胞においては、無処理および TRFP 感染細胞と比べて、発現が変化した遺伝子群が確認された。また、個々のがん遺伝子に特有な発現パターンを示した遺伝子も同定された (図 3)。

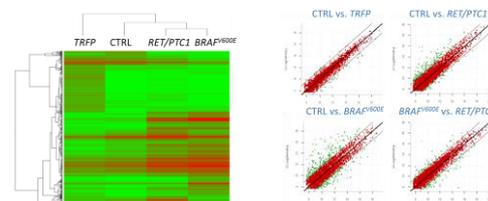


図 3

無処理または TRFP 導入 Nthyr-ori 3-1 細胞に比べ、*RET/PTC1*、*BRAF^{V600E}* 導入の後に 2 倍を超える発現変化を示した計 246 個の遺伝子が確認された。

(3) 発現が変化した遺伝子の転写開始部位 -2000bp から +500bp のプロモーター領域の配列を Eukaryotic Promoter Database or Mammalian Promoter/Enhancer Database (RIKEN) からダウンロードし、JASPAR データベースによるスコア閾値 90%を用いて転写因子結合領域を検出した。さらにプロモーター近位領域 (転写開始地点 -500bp から +500bp) に関しては、全マイクロアレイデータセットに対する ISMARA プラットフォームを用いて解析した。これによって、がん遺伝子刺激による遺伝子発現亢進に関連するもっとも重要な転写因子結合領域を決定した (図 4)。



図 4 ISMARA のアウトプットの一例

二つの独立したアプローチを用いたプロモーター解析を行い、がん遺伝子への反応としての遺伝子発現亢進に関連する転写因子結

合領域 15 個を特定した。

(4) 人工プロモーターは、特定した 15 の転写因子結合領域について既知の配列情報を用いて合成した。シングルコピーおよび連結した転写因子結合領域を図に示すように使用した(図 5)。



図 5

これらの合成した転写因子結合領域を、pEZX-ePG04 (GLuc/SeAP) プラスミドの EcoRI 切断部位にクローニングした。このベクターを用いると、細胞溶解を必要とせず、細胞導入の後に、カスタムプロモーター由来の G. Luciferase および CMP プロモーター由来の分泌アルカリホスファターゼを同時に測定することができる。大腸菌の形質転換後のコロニーは、コロニー-PCR によってスクリーニングし、シーケンシングによって配列を確認した。

(5) 10-15 の異なる人工プロモーターに対し、それぞれの転写因子結合領域の活性を調べた。この目的のために、pEZX-ePG04 プラスミドを RET/PTC1、BRAF^{V600E} をコードするベクター、もしくは対照群として TRFP をコードするベクターと共に Nthyr-or 3-1 細胞へ共トランスフェクションし、培養液を 48 時間後に回収、二重発光アッセイを行った。この二重発光アッセイの結果の一例を、TFBS1 と TFBS2 と名付けられた二つの転写因子結合領域について下図に示す(図 6)。

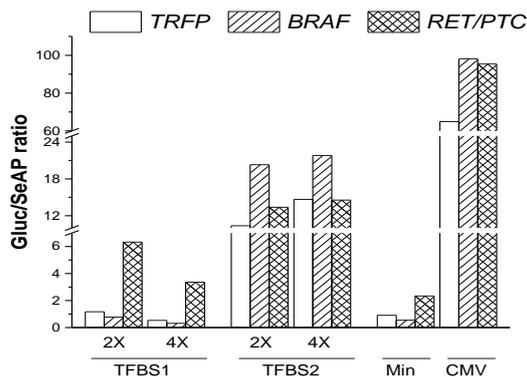


図 6

その結果、最も強い 3 つの転写因子結合領域が特定され、がん遺伝子刺激に反応していることが確認された。

(6) 個々の転写因子結合領域を用いたライブラリーに加え、多種混合の転写因子結合領域ライブラリーを作成し、pZsGreen1-DR レポータープラスミドの EcoRI 切断部位に挿入した(このプラスミドは GFP をコードしている)。合計 46 個の人工プロモーター

/pZsGreen1-DR コンストラクトを作成し、これらを検証した。これらのプラスミドと少量の RET/PTC1、BRAF^{V600E} をコードしているベクター、またはコントロールとして TRFP をコードするベクターと共に Nthyr-ori 3-1 細胞に共トランスフェクションした。緑色蛍光レポーターからのシグナルが、下図に示される通り、いくつかのコンストラクトで観察された(図 7)。

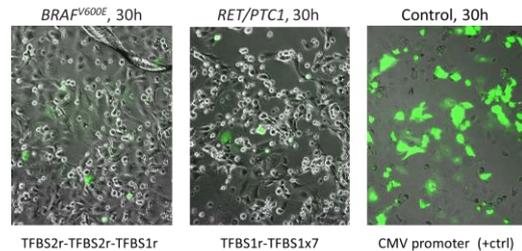


図 7

(7) 4 つの人工プロモーター/ZsGreen1-DR プラスミドを Nthyr-ori 3-1 に安定的に導入し、ネオマイシンにより選択した。バックグランドシグナルを発生したクローンは排除し、無視できるレベルのバックグランド蛍光をもつサブクローンのみを使用した。サブクローニングされた細胞を、RET/PTC1 と BRAFV600E ががん遺伝子をコードするベクターによって刺激し、下図の例に示されるように、GFP シグナルの誘導が、3 つの細胞クローンにおいてライブイメージングにより確認することができた(図 8)。

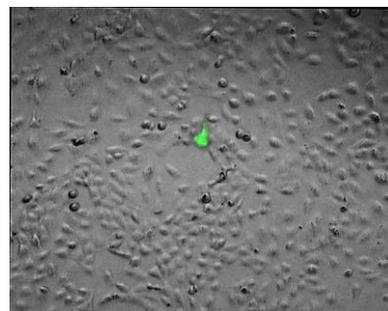


図 8

結論

本研究は、以下の通り順次進展した。①がん遺伝子の刺激を受けた際に発現が変化した遺伝子の同定 ②それら遺伝子のプロモーター解析 ③そのプロモーター上で遺伝子発現亢進と関連する転写因子結合領域の特定 ④二重発光アッセイにおいて、これら転写因子結合領域を含む人工プロモーター配列の準備とテスト ⑤GFP レポーターをコードするベクターに挿入された合成プロモーターライブラリーの作成 ⑥がん遺伝子による刺激を受けた際に活性化されるこれらのプロモーターを同定するための標的細胞におけるライブラリーのテスト ⑦がん遺伝子刺激により反応し、かつ低バックグランド蛍光をもつ安定遺伝子導入細胞株の樹

立 このように、このシステムがワークするという一定の証明は得られた。

半減期の短い蛍光タンパクを用いるレポーターシステムは、放射能およびホルモンかく乱物質を含む広範囲の物理的・化学的因子、またその組み合わせが、甲状腺細胞における発がん効果の検証に用いることができ、それら因子の甲状腺発がんにおける役割を解明するのに用いることができると考えられた。

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 8 件)

①Todorović L, Stanojević B, Mandušić V, Petrović N, Živaljević V, Paunović I, Diklić A, Saenko V, Yamashita S. Expression of VHL tumor suppressor mRNA and miR-92a in papillary thyroid carcinoma and their correlation with clinical and pathological parameters. *Med Oncol* 2018, 35(2):17 査読有 DOI: 10.1007/s12032-017-1066-3

②Iyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko VA, Suzuki K, Ashizawa M, Ookouchi C, Suzuki S, Mizunuma H, Fukushima T, Suzuki S, Yamashita S. Identification of Three Novel Fusion Oncogenes, SQSTM1/NTRK3, AFAP1L2/RET, and PFIIP2/RET in Thyroid Cancers of Young Patients in Fukushima. *Thyroid* 2017, 27(6):811-818 査読有 DOI: 10.1089/thy.2016.0673

③Matsuse M, Yabuta T, Saenko V, Hirokawa M, Nishihara E, Suzuki K, Yamashita S, Miyauchi A, Mitsutake N. TERT promoter mutations and Ki-67 labeling index as a prognostic marker of papillary thyroid carcinomas: combination of two independent factors. *Scientific Rep* 2017, 7:41752 査読有 DOI: 10.1038/srep41752

④Nikitski A, Rogounovitch T, Bychkov A, Takahashi M, Yoshiura K, Mitsutake N, Kawaguchi T, Matsuse M, Drozd V, Demidchik Yu, Nishihara E, Hirokawa M, Miyauchi A, Rubanovich A, Matsuda F, Yamashita S, Saenko V. Genotype analyses in the Japanese and Belarusian populations reveal independent effects of rs965513 and rs1867277 but do not support the role of FOXE1 polyalanine tract length in conferring risk for papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2017, 27(2):224-235 査読有 DOI: 10.1089/thy.2015.0541

⑤Nikitski A, Saenko V, Shimamura M, Nakashima M, Matsuse M, Suzuki K, Rogounovitch T, Bogdanova T, Shibusawa N, Yamada M, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Targeted Foxe1 overexpression in m

ouse thyroid causes the development of multinodular goiter but does not promote carcinogenesis. *Endocrinology* 2016, 157(5):2182-2195 査読有 DOI: 10.1210/en.2015-2066

⑥Drozd VM, Saenko VA, Brenner AV, Drozdovitch V, Pashkevich VI, Kudelsky AV, Demidchik YE, Branovan I, Shiglik N, Rogounovitch TI, Yamashita S, Biko J, Reiners C. Major Factors Affecting Incidence of Childhood Thyroid Cancer in Belarus after the Chernobyl Accident: Do Nitrates in Drinking Water Play a Role? *PLoS One* 2015, 10(9): e0137226 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0137226

⑦Rogounovitch TI, Bychkov A, Takahashi M, Mitsutake N, Nakashima M, Nikitski AV, Hayashi T, Hirokawa M, Ishigaki K, Shigematsu K, Bogdanova T, Matsuse M, Nishihara E, Minami S, Yamanouchi K, Ito M, Kawaguchi T, Kondo H, Takamura N, Ito Y, Miyauchi A, Matsuda F, Yamashita S, Saenko VA. The common genetic variant rs944289 on chromosome 14q13.3 associates with risk of both malignant and benign thyroid tumors in the Japanese population. *Thyroid* 2015, 25(3):333-340 査読有 DOI: 10.1089/thy.2014.0431

⑧Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Yamashita S. Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. *Cancer Science* 2015, 106(2):127-133 査読有 DOI: 10.1111/cas.12583

[学会発表] (計 2 件)

① サエンコ ウラジミール: Establishment of a highly sensitive transcription factor-specific synthetic promoter-based reporter assay system for detecting intracellular oncogenic signaling in the studies of molecular mechanisms of thyroid carcinogenesis. (コスミック・研究創成賞優秀賞) 第 59 回日本甲状腺学会, 2016 年

② サエンコ ウラジミール: Establishment of a highly sensitive transcription factor-specific synthetic promoter-based reporter assay system for detecting intracellular oncogenic signaling in the studies of molecular mechanisms of thyroid carcinogenesis. (コスミック・研究創成賞優秀賞) 第 58 回日本甲状腺学会, 2015 年

[その他]

長崎大学 原爆後障害医療研究所 放射線リスク制御部門 放射線分子疫学研究分野ホームページ

<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/dhrc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

サエンコ ウラジミール (SAENKO,
Vladimir)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授
研究者番号： 30343346

(2) 研究分担者

ログノビッチ タチアナ (ROGOUNOVITCH,
Tatiana)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号： 30423643

光武 範吏 (MITSUTAKE, Norisato)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授
研究者番号： 50404215