

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15691

研究課題名(和文)細胞間コミュニケーションを介するがん抑制メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism underlying anti-cancer effect by cell-cell communication via gap junction

研究代表者

中浜 健一 (NAKAHAMA, Ken-ichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60281515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物において細胞間コミュニケーションは組織や臓器を構築し、その恒常性を維持するために必須である。多くのがんではコネクシンの発現低下によるがんの悪性化が報告されている。そこで本研究では明らかにするためにがん細胞と正常細胞の間にコミュニケーションを確立させた場合のmiRNAの細胞間移動に着目した。正常細胞とがん細胞を共培養しコミュニケーションを確立させる前後の各細胞でのmiRNAの変化をマイクロアレイ法にて調べたところ、ギャップジャンクション依存的に数種類のmiRNAにおいて細胞間の移動が観察された。現在はそれらのmiRNAが細胞の形質変化に及ぼす影響を調べている。

研究成果の概要(英文)：In multicellular organisms, cell-cell communication is essential to maintain organ and tissue homeostasis. It was reported that cell-cell communication via gap junction was attenuated in many types of cancer. To make clear the role of gap junction in anti-cancer effect, we focused on miRNA movement between normal cells and cancer cells via gap junction in this study. We compared miRNA quantities in normal or in cancer cells before/after their communication was established using miRNA microarray method. Some of miRNA were thought to move between normal cells and cancer cells via gap junction. The roles of these miRNA in cell phenotype are under investigation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ギャップジャンクション

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において細胞間コミュニケーションは組織や臓器を構築し、その恒常性を維持するために必須である。組織や臓器はある一定の大きさになると集団としての増殖を止め、メンテナンスのために細胞死により欠失した部分に必要なだけ細胞が増殖する。これが正常な組織のリモデリングであり、細胞間コミュニケーションが深く関わっていると考えられている。とりわけ、多くのがんではギャップジャンクションの発現低下が報告されており、その構成タンパクであるコネキシンの細胞増殖抑制作用は広く研究されてきた。しかしながら、“ギャップジャンクションが細胞間の低分子物質を自由に通過させることを可能にしている”という機能に着目した研究は我々の知る限りほとんどない。

2. 研究の目的

本研究は体内に最も広く分布しているコネキシン43で構成されるギャップジャンクションに着目し、**「がん細胞と正常細胞の間にコミュニケーションを確立させた場合にがん細胞の形質に変化が現れるのではないか」**という仮説を証明し、がん化のメカニズムの一端を解明し、新たながん治療戦略を提示することを目的としている。

3. 研究の方法

レトロウイルス法を用いた遺伝子導入による細胞株の樹立。
がん細胞株は C6 グリオーマ細胞、正常細胞にはアストロサイトを使用した。アストロサイトは Cx43 floxed マウスから単離培養し、Cre recombinase を発現させることにより、Cx43KO アストロサイトを得た。C6 グリオーマ細胞は蛍光顕微鏡下での検出を可能にするため赤色蛍光タンパク (DsRed または tdTomato) を発現させた (C6red)。さらに、C6 グリオーマ細胞にコネキシン 43 を発現させた細胞株 (C6redCx43) を樹立した。

がん細胞と正常細胞間でのコミュニケーションの確立。

C6 グリオーマ細胞と正常アストロサイト間でのギャップジャンクションによるコミュニケーションについて、FACS 法とパラシュート法を用いて確認した。

がん細胞と正常細胞間コミュニケーションによる miRNA 変化の網羅的解析。

C6 グリオーマ細胞または C6Cx43 細胞を正常アストロサイトと 24 時間共培養後、FACS により C6 グリオーマ細胞と正常細胞を分離し、それぞれの細胞から総 RNA を抽出し miRNA 発現の網羅的解析をおこなった。

4. 研究成果

レトロウイルス法を用いた遺伝子導入による細胞株の樹立。レトロウイルス発現ベクター pQCXIP, pQCXIH に DsR, tdTomato, Cx43 cDNA を挿入し発現ベクターを構築、pCL10A1 と共に 293FT 細胞にトランスフェクションし、得られたウイルス含有培養上清を用いて C6 グリオーマ細胞に遺伝子導入をおこなった。ピューロマイシン、ハイグロマイシンで薬剤耐性細胞を得た。

Cx43KO 細胞の樹立

Cx43 floxed マウス由来培養アストロサイトに核移行シグナルを付加した Cre recombinase (NLS-Cre) をレトロウイルス法によりアストロサイトに感染させた。Cx43 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量した (図 1)。図に示されるように効率良くノックアウトされていることが確認できた。

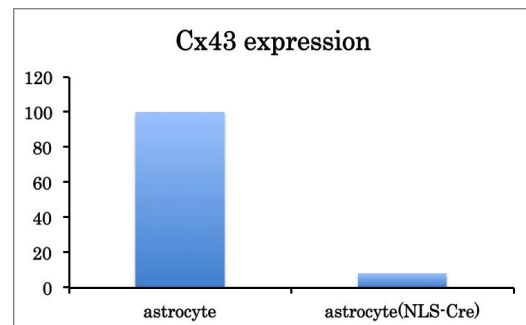


図 1

がん細胞と正常細胞間でのコミュニケーションの確立。

パラシュート法にて細胞間コミュニケーションの有無を確認した。赤色蛍光タンパクで標識された C6redCx43 (印) にカルセインを取り込ませた後、正常アストロサイトまたは Cx43KO アストロサイトが播種されている培養皿に添加した (下図参照)。本実験結果により C6 グリオーマ細胞に Cx43 を遺伝子導入することにより、正常アストロサイトとギャップジャンクションを介したコミュニケーションが確立されることが示された。

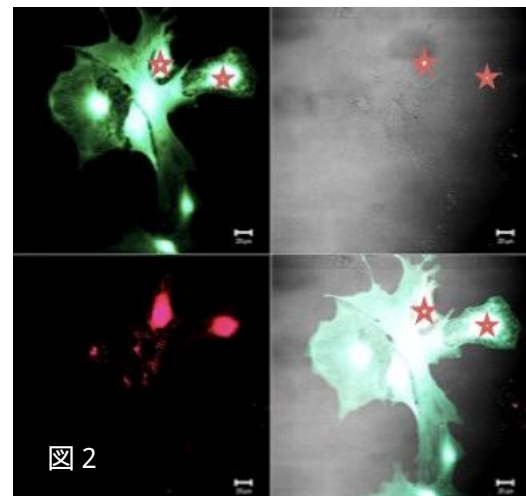
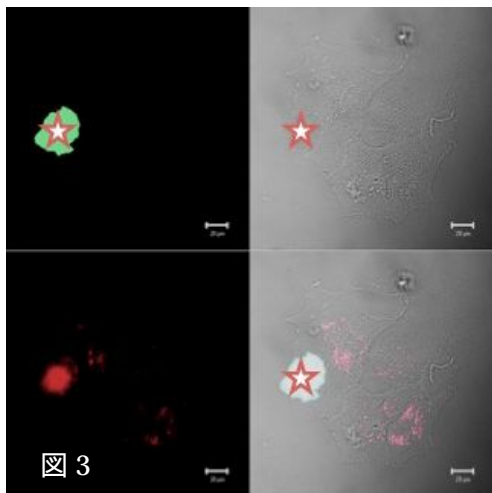


図 2

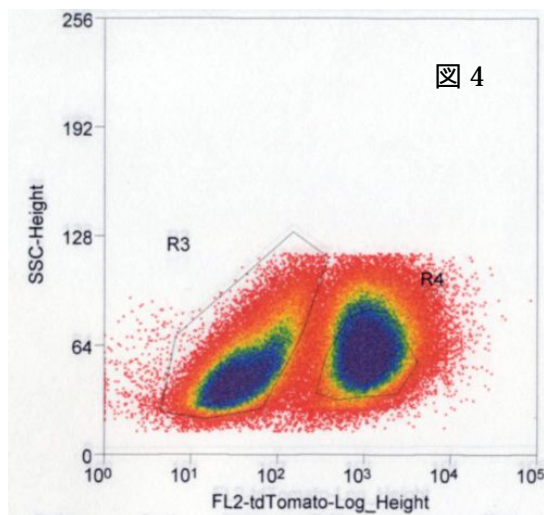
C6redCx43 (印) を正常アストロサイトに添加すると C6redCx43 からアストロサイトへのカルセインの移動が確認された (図 2)。



C6redCx43 (印) を Cx43KO アストロサイトに添加しても C6redCx43 からアストロサイトへのカルセインの移動は認められなかった (図 3)。

がん細胞と正常細胞間コミュニケーションによる miRNA 変化の網羅的解析。

C6red と正常アストロサイトを同数共培養したのち 24 時間後に培養皿から剥がし FACS により C6red とアストロサイトを分離した。図 4 はソーティングのゲートを示している。R3 が tdTomato 陰性のアストロサイトであり、R4 が tdTomato 陽性の C6red である。R3, R4 の集団を分離したのち、下記の各群から総 RNA を抽出し、miRNA 発現についてマイクロアレイ法を用いて解析した。



(1) 正常アストロサイトから C6 細胞へ移動したと考えられた miRNA を図 5 に示す。カラムの説明：青は C6red 単培養、赤色は C6redCx43 単培養、緑色は C6red (アストロ

サイトとの共培養後) 紫色は C6redCx43 (アストロサイトとの共培養後) から抽出した miRNA の量 (相対的) を示している。アストロサイトでギャップジャンクション依存的に miRNA の増加があったと考えられた。

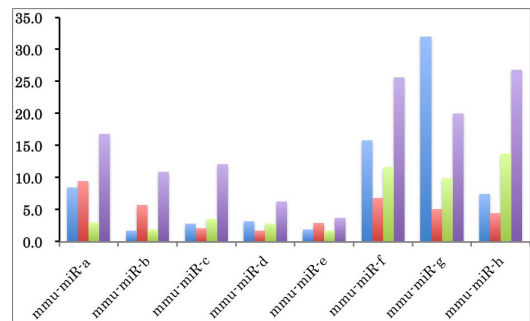
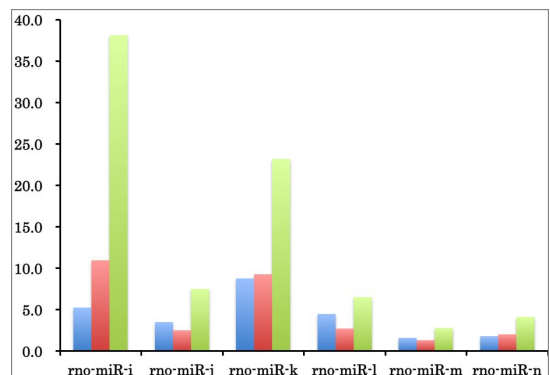


図 5

(2) C6 細胞からアストロサイトへ移動したと考えられた miRNA を図 6 に示す。カラムの説明：青はアストロサイト、赤色は C6red と 24 時間共培養後のアストロサイト、緑色は C6redCx43 と 24 時間共培養後のアストロサイトから抽出した miRNA の量 (相対的) を示している。

図 6



以上の結果から、正常アストロサイトと C6 グリオーマ細胞間にギャップジャンクションを形成させることにより、双方からの miRNA の移動が起こっていると考えられた。今後はこれらマイクロアレイ法でえられた候補 miRNA の変化をリアルタイム PCR 法により確認したい。miRNA は約 20 塩基の 1 本鎖 RNA であるため、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit を用いて cDNA を作成することとする。リアルタイム PCR によりその変動が確認された miRNA については pmR-ZsGreen1 Vector (Takara) に miRNA 前駆体を挿入することにより発現ベクターを構築する予定である。さらに、miRNA を強発現させた細胞の形質について詳細に検討する。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中浜 健一 (NAKAHAMA, Ken-ichi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授

研究者番号：60281515

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

福田 修平 (FUKUDA, Syuhei)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・大学院生