

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10577

研究課題名(和文) Lenti-CRISPR感染リンパ節転移モデルを用いた転移支配遺伝子の探索と制御

研究課題名(英文) Search of lymph node metastasis controlling genes using Lenti-CRISPR-infected cancer cell in mouse model

研究代表者

本山 悟 (Motoyama, Satoru)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60292372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス口腔由来の扁平上皮癌細胞株をマウス皮下へ移植し、In vivo passage法を用い、同じ細胞を親株としたリンパ節高転移細胞とリンパ節低転移細胞を確立した。両者の細胞株からRNAを抽出し、RNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析を行い、リンパ節転移制御候補因子Xを同定した。得られた候補因子Xについて食道癌患者を対象にリンパ節転移との相関を検討した。また、RNAメチル化のN6-メチルアデノシン(m6A)に着目し、m6A脱メチル化酵素のリンパ節転移に与える影響について解析した。m6A脱メチル化酵素は癌細胞の増殖を制御し、細胞周期の解析からG1からS期への進行に不可欠であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形癌リンパ節転移に対する新しい制御法の開発が社会から切望されている。そこで、我々は全ての遺伝子に対するガイドRNAがプールされたPooled lenti-CRISPR libraryを感染させることによってリンパ節転移に関わる遺伝子を探索した。同時に、移植リンパ節転移を繰り返すIn vivo passageによって今後の研究発展に不可欠なリンパ節転移動物モデルを確立した。さらにRNAメチル化のN6-メチルアデノシン(m6A)に着目し、m6A脱メチル化酵素のリンパ節転移に与える影響について研究した。これらの結果は今後のリンパ節転移研究において重要な知見を含んでおり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The parental NR-S1M murine oral squamous cell carcinoma cells were serially in vivo passaged. Then, highly lymph node-metastatic and non-metastatic cell lines were derived from the same parental cells, and a reliable animal model of lymph node metastasis was established. RNA was extracted from both cell lines, and comprehensive gene expression analysis by RNA-Seq was performed to identify candidate factor X for controlling lymph node metastasis. We examined the correlation between the obtained candidate factor X and lymph node metastasis in esophageal cancer patients. In addition, we focused on RNA methylation N6-methyladenosine (m6A) and analyzed the effect of m6A demethylase on lymph node metastasis. The m6A demethylase regulates the growth of cancer cells and cell cycle analysis revealed that it is essential for the progression from G1 to S phase.

研究分野：消化器外科学

キーワード：リンパ節転移モデル in vivo passage RNA-Seq RNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

リンパ節転移は固形癌患者の予後を決める最も重要な因子の一つである。我が国では従来、固形癌のリンパ節転移は「まだ根治治療の対象となる転移」として、精力的に研究が行われてきた。これまでの研究成果により、癌組織内でリンパ管新生が誘導され、新生されたリンパ管経路でリンパ節転移が生じることが判明した。そしてリンパ管新生に関わる遺伝子として、VEGF-Cとその受容体VEGFR-3、その他、PDGF-BB・FGF-2・Angiopoietin-1・HGFなどが研究成果として報告された。しかし、臨床導入できる画期的な固形癌リンパ節転移制御因子の発見には至っていない。

2. 研究の目的

画期的なリンパ節転移抑制・治療法を開発するためには、リンパ節転移に関わる最も強い因子を探し出し、この因子がリンパ節転移のどの段階でどの因子とどう関わっているかを包括的に捉える必要がある。本申請研究では、全ての遺伝子に対する gRNA がプールされた lenti-CRISPR library 感染癌細胞をマウスに移植し、この転移細胞を継代することで最もリンパ節を支配する遺伝子を探し出すことを目的とした。また、同時にリンパ節転移に深く関わる可能性のある RNA メチル化の N6-メチルアデノシン (m6A) に着目し、m6A 脱メチル化酵素のリンパ節転移に与える影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

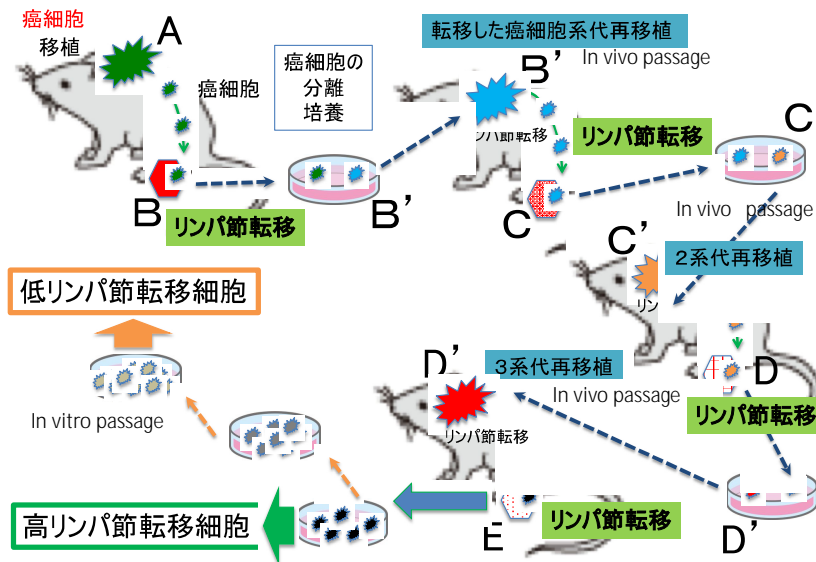
(1) in vivo passage マウスリンパ節転移モデルの確立

マウス口腔由来の扁平上皮癌培養細胞 (NR-S1M) を、C3H/HeN マウス (雌) 背部皮下に移植し、この癌細胞が鼠径リンパ節に転移するマウスリンパ節転移モデルを用いた。癌細胞をマウス背部へ移植し、鼠径部にリンパ節転移を引き起こした個体のリンパ節から癌細胞を再度分離し、これを培養して、再度次のマウスへ移植する in vivo passage 法によるリンパ節高転移モデルを確立した。一方で、in vitro passage を繰り返すことで継代が進んだ細胞をマウスへ移植してもほとんど転移しないことを確認し、これをリンパ節低転移モデルとした。以上より、同じ細胞を親株とした「リンパ節高転移細胞」と「リンパ節低転移細胞」を確立した。

(2) Pooled lenti-CRISPR library 感染細胞の作成

NR-S1M 細胞に、全ての遺伝子に対する gRNA がプールされた Pooled lenti-CRISPR library を感染させ、Pooled lenti-CRISPR library 感染 NR-S1M 細胞を作成した。マウス背部皮下に Pooled lenti-CRISPR library 感染 NR-S1M 細胞を移植し、5週間後、鼠径部の転移リンパ節を採取する。そして、リンパ節転移を引き起こした Pooled lenti-CRISPR library 感染 NR-S1M 細胞の継代再移植を行った。

「in vivo passage法」によるリンパ節転移モデル



(3) リンパ節転移に強く関わる遺伝子の検索

最初に移植したPooled lenti-CRISPR library 感染NR-S1M細胞と、リンパ節転移 移植を繰り返して3継代させた後の癌細胞で増幅されているgRNAの標的遺伝子をリスト化し、転移促進に最も関わる未知の遺伝子候補を検索した。

(4) RNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析

リンパ節高転移モデル細胞とリンパ節低転移モデル細胞から RNA を抽出して RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。

(5) m6A脱メチル化酵素のリンパ節転移に与える影響

RNA メチル化の N6-メチルアデノシン(m6A)に着目し、m6A 脱メチル化酵素のリンパ節転移に与える影響について RNA-Seq による m6A 脱メチル化酵素ノックダウン細胞の遺伝子発現解析を行った。また、m6A-RIP-qPCR によって m6A 脱メチル化酵素が候補因子 Y の RNA の m6A を脱メチル化するかを検討した。

4. 研究成果

(1) RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析

リンパ節高転移モデル細胞とリンパ節低転移モデル細胞から RNA を抽出して RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析を行い、リンパ節転移制御候補因子 X を同定した。候補因子 X について食道癌手術検体による組織マイクロアレイを用いて、免疫組織化学染色を行い、食道癌患者の予後やリンパ節転移の有無について検討した結果、リンパ節転移制御候補因子 X と食道癌リンパ節転移が相関した。

(2) リンパ節転移に強く関わる遺伝子の検索

最初に移植したPooled lenti-CRISPR library 感染NR-S1M細胞と、リンパ節転移 移植を繰り返して3継代させた後の癌細胞で増幅されているgRNAの標的遺伝子をリスト化し、転移促進に最も関わる未知の遺伝子候補については現在解析を進めている。

(3) m6A 脱メチル化酵素の癌進展に与える影響

m6A 脱メチル化酵素がヒト食道扁平上皮癌細胞の増殖を制御すること、細胞周期の解析からG1 から S 期への進行に不可欠であることが判明した。

(4) m6A脱メチル化酵素の標的遺伝子の同定

RNA-Seq による m6A 脱メチル化酵素ノックダウン細胞の遺伝子発現解析により、m6A 脱メチル化酵素の標的遺伝子候補 Y を同定することができた。また m6A-RIP-qPCR によって m6A 脱メチル化酵素が候補因子 Y の RNA の m6A を脱メチル化することで同 RNA を不安定化させ細胞周期が促進することで、ヒト食道扁平上皮癌細胞の増殖を制御していることを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minato T, Nirasawa S, Sato T, Yamaguchi T, Hoshizaki M, Inagaki T, Nakahara K, Yoshihashi T, Ozawa R, Yokota S, Natsui M, Koyota S, Yoshiya T, Yoshizawa-Kumagaye K, Motoyama S, Gotoh T, Nakaoka Y, Penninger JM, Watanabe H, Imai Y, Takahashi S, Kuba K.	4. 巻 11
2. 論文標題 B38-CAP is a bacteria-derived ACE2-like enzyme that suppresses hypertension and cardiac dysfunction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14867-z	査読の有無 無
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 Uno Y, Kanda M, Sato Y, Shimizu D, Umeda S, Hattori N, Hayashi M, Tanaka C, Kobayashi D, Yamada S, Nakayama G, Motoyama S, Koike M, Kodera Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Expression, Function, and Prognostic Value of MAGE-D4 Protein in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 6015-6023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13807	査読の有無 無
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 Motoyama S, Sato Y, Wakita A, Kawakita Y, Nagaki Y, Imai K, Minamiya Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Extensive lymph node dissection around the left laryngeal nerve achieved with robot-assisted thoracoscopic esophagectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 1337-1342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13246	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 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoru Motoyama
2. 発表標題 Lymph node dissection after neoadjuvant chemo-radiotherapy
3. 学会等名 Yonsei Workshop on Esophageal Cancer 2019. Quality Improvement in Esophageal Cancer Surgery. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Motoyama, Yusuke Sato, Akiyuki Wakita, Yuta Kawakita, Yushi Nagaki, Yoshihiro Minamiya
2. 発表標題 Metabolic response for chemoradiotherapy predicts prognosis of patients treated with neoadjuvant therapy plus esophagectomy for advanced esophageal cancer
3. 学会等名 16th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Motoyama, Yusuke Sato, Akiyuki Wakita Yuta Kawakita, Yushi Nagaki, Yuki Wada, Akira Anbai, Yoshihiro Minamiya
2. 発表標題 Chemoradiotherapy followed by surgery: our treatment strategy for locally advanced thoracic esophageal cancer
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japan Society of Clinical Oncology (招待講演)
4. 発表年 2018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	佐藤 雄亮 (SATO YUSUKE) (10431628)	秋田大学・医学系研究科・講師 (11401)	