

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13026

研究課題名(和文) 癌転移能抑制に向けたヒトネスチン遺伝子高効率破壊ツールの開発

研究課題名(英文) Development of effective tool for human nestin gene knockout to inhibit cancer metastasis

研究代表者

山岸 彩奈 (Yamagishi, Ayana)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：00778293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中間径フィラメントネスチンは細胞を柔軟化する機能を有しており、その遺伝子破壊により癌細胞の浸潤性が低下する。そこで本研究では、ヒトネスチンの遺伝子破壊により細胞弾性率が上昇することを立証するとともに、癌転移の抑制に向けて高効率にネスチンをノックアウト可能なsgRNA配列とCas9タンパク質を包含する小胞を用いてネスチン遺伝子を破壊する手法の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞を用いて血管に侵入した癌細胞を標的としたゲノム編集技術によるネスチン遺伝子破壊が可能となれば、遠隔転移後に転移巣を形成する癌細胞の転移を抑制し、血中のリンパ球を含む免疫システムにより転移前の癌細胞を死滅させることができる。この手法が確立できれば、これまで副作用の影響が大きい化学療法でしか対処できなかった、血中循環腫瘍細胞を治療できる画期的な癌転移抑制方法に繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Intermediate filament nestin has a function to soften cell body, and its gene disruption reduces the invasiveness of cancer cells. In this study, we demonstrated that gene disruption of human nestin increases cellular stiffness. In addition, we established a method to disrupt the nestin gene by using vesicles containing Cas9 protein and sgRNA sequence that can knock out nestin gene highly efficiently toward suppression of cancer metastasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中間径フィラメント ネスチン 癌転移 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療では手術により原発巣を切除しても血管を介して血中循環腫瘍細胞(CTC)が全身に拡散し、辿り着いた場所で新たに転移巣を形成する。転移癌の治療法である化学療法は細胞増殖を抑制することから副作用が強く、わずかに生き残った癌細胞は再び転移増殖していく。したがって、CTCの転移能を抑制することが癌治療において重要となる。

細胞骨格タンパク質の一種である中間径フィラメントのネスチンは高転移性の癌細胞で高発現であることが分かっており(Cancer Sci, 101, 815, 2010, Curr Stem Cell Res Ther, 7, 415, 2012)、ネスチンの発現を抑制することで癌細胞の転移能が減少することが報告されている(Cancer Res, 67, 9199, 2007, Int J Clin Exp Pathol, 8, 6377, 2015)。ネスチン遺伝子を破壊したマウス個体は正常に発生することから(J Neurosci, 10, 11547, 2011)、ネスチンの遺伝子破壊は生体へ著しい影響を与えないものと推測し、癌転移を抑制する全く新しい治療標的にできると考えた。

これまでに、高転移性マウス乳癌細胞株を用いてネスチン遺伝子破壊株を作製し、ネスチンと癌細胞転移能の関係について解析した結果、ネスチン遺伝子破壊株では野生株と比較して細胞弾性率が上昇し、浮遊状態を模擬した細胞においても細胞体が固くなっていることを発見した。通常、接着性の高い細胞ほど細胞の弾性率は高くなるが、ネスチンをはじめとする中間径フィラメントは接着とは関係なく細胞弾性に寄与していると考えられる。癌転移において癌細胞は組織や細胞間の間隙を通過する必要があるため、ネスチンには細胞体に柔軟性を付与することで浸潤能を高める機能があると推定し、ヒトネスチン遺伝子破壊により血中で浮遊状態にあるCTCの細胞弾性を上昇させ、転移能を抑制させることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト癌細胞においてもネスチン遺伝子破壊が癌転移能の抑制に有効であることを明らかにし、ゲノム編集技術を用いてCTCで発現するネスチン遺伝子を高効率に破壊することでヒト癌細胞の転移能を抑制する新規治療法を開発する。

ネスチン遺伝子の破壊はゲノム編集技術の一種である、CRISPR/Cas9を用いて行う。標的遺伝子に存在するPAM配列に隣接した配列をガイドRNA(gRNA)が認識すると、Cas9ヌクレアーゼがDNA二本鎖を切断し、この修復過程で変異が入ることを利用した遺伝子破壊方法である。CTCで発現するネスチン遺伝子を破壊するためには、gRNA-Cas9タンパク質複合体を血中に投与する必要がある。そこで細胞外分泌小胞を利用してgRNA-Cas9を保護しながら血中を流れるCTCまで運搬することでネスチンを破壊する手法の確立を目指し、gRNA-Csa9複合体を含む小胞を利用したネスチン遺伝子破壊を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒトネスチン遺伝子破壊株の細胞弾性率測定

ヒト神経膠芽腫細胞KG-1-Cに対してCRISPR/Cas9システムによるネスチン遺伝子のノックアウト(KO)を行った。中間径フィラメントはロッドドメインで束化構造を取ることから、gRNA設計ツールであるBenchling(<https://benchling.com/crispr>)を用いてヒトネスチンのロッドドメインに位置するgRNA配列を選択し、高効率ゲノム編集用ベクターpGedit(PLASMID, 98, 37-44, 2018)を用いてネスチンKOベクターを作成した。リポフェクションによりKG-1-C細胞にプラスミドを導入して24時間後、プラストサイジン添加培地に交換し2日間培養を行うことでプラスミド導入細胞の選抜を行った。プラストサイジン不含培地で6日間培養した後、細胞に対して抗ネスチン抗体を用いた免疫染色を行い、蛍光顕微鏡でネスチンKOの評価を行った。獲得したネスチンKO株は元株と比較して細胞形態が細長く、基板への接着力が弱いことが示唆された。そこで原子間力顕微鏡AFMを用いた細胞弾性率測定時には、細胞膜修飾剤BAMを用いて細胞を基板に係留し、細胞接着能の影響がない状態で弾性率の評価を行った。直径約3µm、長さ6µmの円柱型AFM探針を核から離れた位置で細胞に圧入することで弾性率測定を行った。横軸に圧入距離、縦軸にカンチレバーにかかる力をプロットしたフォースカーブを円柱圧入のHertzモデルの式でフィッティングし、弾性率を算出した。

(2) 高効率ネスチン遺伝子破壊用のgRNA配列の探索

マウスネスチン遺伝子のロッドドメインをコードする領域を標的とし、Benchlingを用いてオンターゲットスコアの高いsgRNAを4つ設計した(表1)。これらのsgRNAをコードしたpGeditプラスミドを用いて上記と同様の手法で高転移性マウス乳癌細胞FP10SC2に対してネスチンKOを行った。得られたKO細胞に対して抗ネスチン抗体を用いた免疫染色を行い、既に取得されているネスチンKO株の平均蛍光強度+3SDを閾値としてこれを下回る蛍光強度を示す細胞をネスチンKO細胞として判定した。ネスチンKO効率は、全細胞に対するネスチンKO細胞の割合として算出した。

表1 設計したネスチンKO用sgRNAの配列

配列	配列(5' 3')	オンターゲットスコア	Tm
	GCGCGCGCACCTGAACGCC	63.0	86.50
	GGCCAGCTCCTCGACTTCAG	62.3	78.62
	GCGCTGGAACAGAGATTGGA	60.9	74.49
	GCGGGCTGGCTGAGCACCC	58.4	87.68

(3) Cas9-sgRNA 複合体を包含する小胞を用いたネスチン遺伝子破壊

同定したネスチン遺伝子高効率破壊 sgRNA 配列と Cas9 タンパク質を含む小胞は、Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System (TAKARA)を用いて作成した。ネスチン KO 用 gRNA 発現ベクター及び Cas9 発現ベクターを導入した HEK293T 細胞を 72 時間培養後、回収した培地上清を用いて超遠心を行うことで目的小胞を取得した。得られた小胞を FP10SC2 細胞に添加し、72 時間後に抗ネスチン抗体を用いて免疫染色を行うことでネスチン KO の確認を行った。

4. 研究成果

(1) ヒトネスチンが細胞弾性率に与える影響の評価

KG-1-C 細胞が広く足を伸ばして基板に接着しているのに対し、KG-1-C 細胞を用いて作成したネスチン KO 株では丸、あるいは細長い形態の細胞が観察された(図1)。この形状の違いから、より足を伸ばしている KG-1-C 細胞の方が基板上に強く接着していることが示唆された。細胞は、基質に対してインテグリンを介して接着し、接着斑を形成する。接着斑は細胞内のアクチンと結合し、その収縮により運動するが、このときアクチン細胞骨格とそれに連結する細胞膜に張力の変化が生じる。基質に対する接着性の高い細胞は多くの接着斑を形成し、これにより細胞膜がより牽引された状態となり結果として細胞弾性率が增加するのではないかと考えた。そこで細胞膜修飾剤 BAM を用いて細胞接着能の影響がない状態で弾性率の評価を行った。BAM はオレイル基、PEG、NHS 基によって構成されており、細胞の接着を阻害するタンパク質として、ウシ血清アルブミン BSA をディッシュにコーティングし、BAM を結合する足場として使用した(Langmuir, 29, 6429-33, 2013)。これに対し細胞を播種すると BAM のオレイル基が細胞膜に挿入され、細胞が物理的に繋留されることから、足場非依存的な弾性率を測定できると考えた。BAM-BSA 基板に播種した細胞は、元株・KO 株ともに足を伸ばさずに基板に係留された。この状態の細胞を円柱型 AFM 探針で圧入し、弾性率を測定した結果、元株と比較して KO 株では有意に弾性率が増加していることが示された(図2)。以上のことから、ヒトネスチンもマウスネスチンと同様に細胞弾性率の低下に寄与しており、その遺伝子破壊により癌細胞の転移能を低下させることが可能であると示唆された。また、ネスチンによる細胞柔軟化機能は細胞種に依存しない機構であることが考えられた。

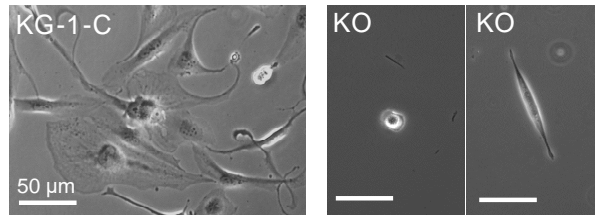


図1 KG-1-C 及びネスチン KO 株の細胞形状

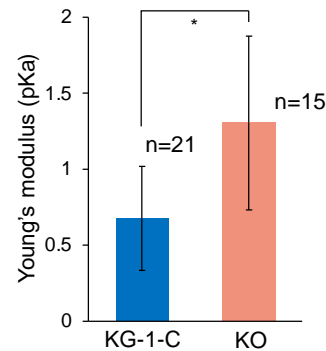


図2 BAM-BSA 基板に播種した KG-1-C 及びネスチン KO 細胞の弾性率評価 * p<0.01

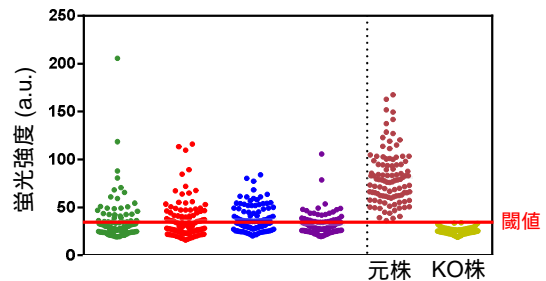


図3 各 sgRNA を用いてネスチン KO を行った細胞におけるネスチン蛍光強度の値

(2) 高効率ネスチン遺伝子破壊 gRNA 配列の同定

図3に各細胞におけるネスチン蛍光強度の値をプロットしたグラフを示す。この結果から、既に取得しているネスチン KO 株の最も蛍光強度の高い値を上回り、元株の最も低い値を下回る値である、KO 株の平均蛍光強度+3SD の値を閾値として設定した。閾値を下回る細胞数を全体の細胞数で割った値を KO 効率とし、各 sgRNA を用いた時のノックアウト効率と Benchling より得られたオンターゲットスコアを比較した(表2)。その結果、標的配列を用いた場合ノックアウト効率が75%と最も高く、オンターゲットスコアは58.4と最も低い値であることから、ネスチン KO 効率とオンターゲットスコアの相関は低いことが明らかとなった。これらの結果は現存する sgRNA 設計ツールに依存した最適標的配列の選択は未だ困難であり、細胞レベルのスクリーニングが必要であることを示唆している。

表2 各 sgRNA を用いたネスチン KO 効率、及び sgRNA 設計ツールで算出したオンターゲットスコア

KO 効率	Tm (°C)	Benchling	CHOP CHOP	CRISPR REGN Tools	GPP Web Portal
72%	86.5	63.0	0.68	63.9	0.48
47%	78.6	62.3	0.56	65.9	0.45
51%	74.5	60.9	0.57	62.4	0.60
75%	87.7	58.4	0.63	73.4	0.57
KO効率との相関係数	0.93	-0.36	0.90	0.56	0.096

(3) Cas9-sgRNA 複合体を包含する小胞によるネスチン遺伝子破壊の効率評価

Cas9-sgRNA 複合体を含有する小胞を培地上清から回収しウェスタンブロットを行った結果、回収した小胞が Cas9 を含有していることが確認できた。そこでこの小胞をネスチン高発現の FP10SC2 細胞に対して添加し、免疫染色によりネスチンの発現を確認した。ネスチン KO 株の平均蛍光強度+SD の値を閾値としてネスチン KO 効率を算出したところ、約 16%の効率でネスチンが消失した KO 細胞を獲得することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

A. Nagasaki, Y.Kato, K Meguro, A. Yamagishi, C. Nakamura, T. Q. P. Uyeda, A genome editing vector that enables easy selection and identification of knockout cells, *PLASMID*, 査読有, 98, 37-44, 2018, doi: 10.1016/j.plasmid.2018.08.005.

A. Yamagishi, D. Matsumoto, Y. Kato, Y. Honda, M. Morikawa, F. Iwata, T. Kobayashi, C. Nakamura, Direct delivery of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins into cells using a nanoneedle array, *Applied Sciences-Basel*, 査読有, 9(5), 965, 2019, doi:10.3390/app9050965

〔学会発表〕(計10件)

A. Yamagishi, M. Susaki, T. Okada, C. Nakamura, Measurement of cancer cell stiffness governed by intermediate filament nestin for non-adherent mimicking cells, 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9), ANA Crowne Plaza Kanazawa, Kanazawa, Ishikawa, Japan, June 26, 2017

M. Susaki, A. Yamagishi, Y. Takano, M. Mishima, M. Imaizumi, M. Iijima, S. Kuroda, Y. Onomura, T. Okada, C. Nakamura, Relationship between stiffness of cancer cell and mechanical property of intermediate filament, 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9), ANA Crowne Plaza Kanazawa, Kanazawa, Ishikawa, Japan, June 26, 2017

山岸 彩奈、高野 勇太、須崎 萌、岡田 知子、中村 史、高転移性マウス乳癌細胞の転移機構に関わる中間径フィラメントネスチンにおけるテール領域の機能解析、第11回バイオ関連化学シンポジウム、東京大学弥生キャンパス、東京都文京区、2017年9月7日

須崎 萌、山岸 彩奈、飯田 圭介、金 賢徹、中村 史、Effect of nestin and (-)-epigallocatechin gallate on cell elasticity、第55回日本生物物理学会年会、熊本大学 黒髪北地区、熊本県熊本市、2017年9月20日

A. Yamagishi, M. Susaki, Y. Takano, M. Iijima, S. Kuroda, T. Okada, A. Nagasaki, C. Nakamura, Evaluation of mechanical property of intermediate filament related with stiffness of breast cancer cell by use of nanoneedle and AFM, MRS fall meeting 2017, Boston, USA, November 27, 2017

須崎 萌、高野 勇太、金山 慶大、山岸 彩奈、岡田 知子、中村 史、中間径フィラメントが高転移性マウス乳癌細胞株の弾性率に与える影響、第65回応用物理学会春季学術講演会、早稲田大学西早稲田キャンパス、東京都新宿区、2018年3月18日

長崎 晃、加藤 義雄、目黒 慶一、山岸 彩奈、中村 史、上田 太郎、高効率で簡便なゲノム編集のための新規ベクターの開発、日本ゲノム編集学会、広島国際会議場、広島県広島市、2018年6月20日

水澤 愛衣、須崎 萌、山岸 彩奈、中村 史、マウス乳癌細胞の転移性と細胞弾性に関与するネスチンのテール領域の機能解析、第70回日本生物工学会大会、関西大学千里山キャンパス、大阪府吹田市、2018年9月6日

山岸 彩奈、須崎 萌、水澤 愛衣、中村 史、中間径フィラメントネスチンが癌細胞の弾性率に与える影響、第12回バイオ関連化学シンポジウム、大阪大学吹田キャンパス、大阪府吹田市、2018年9月11日

須崎 萌、水澤 愛衣、山岸 彩奈、中村 史、Functional analysis of nestin tail domain in elastic modulus of highly metastatic mouse breast cancer cell、第56回日本生物物理学会年会、岡山大学津島キャンパス、岡山市北区、2018年9月17日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-cme/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名：山岸 彩奈

ローマ字氏名：(YAMAGISHI, Ayana)

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：バイオメディカル研究部門

職名：研究員

研究者番号 (8 桁) : 00778293

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。