

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16521

研究課題名（和文）エピゲノム編集法による癌細胞の浸潤、転移抑制技術の開発

研究課題名（英文）Development of control technology for metastatic ability and invasion activity in human cancer cells by epigenome editing

研究代表者

細羽 康介（Hosoba, Kosuke）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：20781264

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）：創傷治癒アッセイの結果から、TREEシステムを導入した癌細胞は遊走能の低下が認められた。さらに細胞浸潤アッセイを行ったところ、TREEシステムを導入した細胞ではポアを通過した細胞の割合が低下していた。これらのことからTREEシステムの導入によるCDH1遺伝子の発現上昇により癌細胞の浸潤能及び転移能が抑制されたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりエピゲノム編集法の固形癌由来細胞株における効果を実証出来た。所属研究室で開発された新規エピゲノム編集ツールを用いてCDH1遺伝子の発現量をコントロールすることで癌細胞の浸潤能及び転移能が抑制出来ることが示唆された。本研究で得られた成果は基礎生物学的な領域だけでなく、今後の抗癌剤開発などを含む癌治療戦略に新たな知見を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The result of wound healing assay revealed that migration activities of TREE system-induced cancer cells were reduced. Next, cell invasion assay was performed. The rate of cells that enter the micro pores was decreased in TREE system-induced cells. These result suggested that increase of CDH1 gene expression by TREE system suppressed metastatic ability and migration activity of human cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピゲノム編集 CDH1遺伝子 固形癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集ツールの一つである CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins) システムは DNA の二本鎖切断 (Double Strand Breaks=DSB) を介して、ゲノム上の任意の場所に塩基の挿入、欠失、置換を生じさせる技術である。この技術の登場により遺伝子改変が容易になり、現在までに哺乳類細胞だけでなく、カエル、ゼブラフィッシュなどの広範な生物種においても用いられている。現在この CRISPR/Cas9 システムは第3世代のゲノム編集ツールとして世界中の研究者に活用されている。近年 Cas9 のヌクレアーゼ活性を欠失させた変異体 (dCas9) を用いたエピゲノム編集技術が注目されている。この技術を用いることで DNA 切断を伴わず、標的遺伝子の転写レベルや DNA のメチル化、アセチル化といった修飾状態を制御することが出来る。まず第1世代の「直接融合型」と呼ばれるシステムが報告された。これは dCas9 に転写活性化ドメイン (VP64 や VP160) もしくは転写抑制ドメイン (KRAB や SID) を融合させたタンパク質を発現させ、標的の転写レベルを制御するというものである。次に第2世代として「集積型」と呼ばれるシステムが登場した。この系では dCas9 と各種エフェクターを共発現させ、それらが複合体を形成する。この複合体が標的とするゲノム領域に集積し、効率的に転写レベルを制御するというものである。このエピゲノム編集技術を活用し、癌や各種疾患の治療に応用しようという試みは既に始まっているが報告例は少ない。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、マウス個体内に固形癌を誘発させ、所属研究室で開発された効率的なエピゲノム編集技術である TREE (three-component repurposed technology for enhanced expression) システムの効果を検証することを想定していた。TREE システムはエフェクター分子とそれを認識するアダプタータグを共発現させることで、より高効率に標的配列周辺にエフェクターを集積させることが出来る。このシステムを用いた場合、従来法と比べて数倍の遺伝子発現を誘発することが期待出来る。本研究では細胞接着を制御する分子である E-カドヘリン をコードする *CDH1* 遺伝子に注目した。この遺伝子は癌細胞で発現が低下することが知られている。癌細胞ではこの遺伝子が機能不全になることで、細胞接着能力が失われることが分かっている。この細胞接着能の低下により、癌細胞は高い運動能と浸潤能を獲得すると考えられる。そこで本研究では *CDH1* 遺伝子を標的とした TREE システムの各コンポーネントを固形癌誘発したマウスに導入し、*CDH1* 遺伝子の発現量を上昇させることで、その有効性を実証したいと考えた。具体的にはシステムを構成するコンポーネントを構築し、AAV ベクターによりマウスに導入するというものである。しかしながらウイルス関連の実験環境の整備が大幅に遅れたため、まずはヒト由来の培養細胞を用いて、浸潤能、転移能といった癌細胞特有の悪性度に対する効果を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

標的とする遺伝子は癌細胞で発現が低下することが知られている E-カドヘリン (*CDH1*) 遺伝子とした。この遺伝子の機能不全により、細胞接着能力が失われ、転移能、遊走能といった癌細胞特有の性質を獲得する。この遺伝子を標的とする TREE システムを構築し、発現量を上昇させれば、高い運動能や浸潤能を抑制出来、癌細胞の悪性度の制御が可能になると考えた。具体的に

は以下の実験を行った。

(1) TREE システムのヒト固形癌由来細胞株への導入

まず TREE システムを構成する各因子を発現するベクターを構築した。各因子の標的領域への集積に必要な gRNA は *CDH1* 遺伝子にアクセスするように設計した。構築した各発現ベクターをヒト膵臓癌由来細胞株である MIA-PaCa-2 細胞とヒト肝臓癌由来細胞株である HepG2 細胞にリポフェクション法及びエレクトロポレーション 法により導入した。

(2) 転移能に対する TREE システムの効果の検証

トランスフェクション後の細胞を回収し、カバースリップを入れたプレートに均一になるように展開し、培養した。次に、癌細胞が均一に分布するカバースリップの表面をピペットマンチップの先端で削り取った。その後細胞の動きを顕微鏡下で継続的に観察する創傷治癒アッセイを行った。本実験項目では細胞の遊走能を指標にすることで、TREE システムの導入による *CDH1* 遺伝子の発現上昇が癌細胞の転移能に与える効果を検討した。

(3) 転移能に対する TREE システムの効果の検証

浸潤能は三次元培養法を用いた細胞浸潤アッセイで評価した。TREE システムを構成する因子をトランスフェクションした癌細胞を孔径数 μm のポアサイズの膜を有するチャンバー内で一定時間培養を行った。この時最適な細胞密度を予め検討した。遊走能が高い細胞はポアを通過するが、*CDH1* 遺伝子の発現上昇により遊走能が低下した細胞はチャンバー内に留まると考えられた。一定時間培養後、ポアを通過した細胞とチャンバー内に留まっている細胞の比率を算出することで浸潤能の指標とした。

4 . 研究成果

(1) TREE システムの導入による転移能の抑制

コントロールと TREE システムを導入した細胞をカバースリップ上に展開し、均一に培養した細胞の一部を削り取り、その後の細胞の動きを創傷治癒アッセイにより評価した。その結果、TREE システムを導入し、*CDH1* 遺伝子の発現量が上昇した細胞では動きが抑制傾向にあった。このことから *CDH1* 遺伝子発現量の上昇により、癌細胞の転移能が抑制されることが示唆された。

(2) TREE システムの導入による浸潤能の抑制

コントロール及び TREE システムを導入した細胞を孔径数 μm のポアサイズの膜を有するチャンバー内で培養を行った。その結果、TREE システムを導入した細胞ではポアを通過する割合がコントロールと比較して低下していた。この結果から、*CDH1* 遺伝子発現の上昇により癌細胞特有の浸潤能が抑制されることが示唆された。

(3) 今後の展望

創傷治癒アッセイの結果から、TREE システムを導入した癌細胞は遊走能の低下が認められた。さらに細胞浸潤アッセイを行ったところ、TREE システムを導入した細胞ではポアを通過した細胞の割合が低下していた。これらのことから TREE システムの導入による *CDH1* 遺伝子の発現上昇により癌細胞の浸潤能及び転移能が抑制されたことが示唆され、癌細胞特有の悪性度を減少させる効果が認められた。

現在の計画としてはLenti ウイルスベクターを用いて TREE システムを導入した癌細胞をマウスに移植し、腫瘍形成の程度を評価する。また、培養細胞で効果の検証が出来たため、TREE システムの固形癌誘発マウスにおける効果を実証したい。エピゲノム編集技術はゲノム編集技術と異なり、DNA 切断を伴わないためより安全な技術と言える。本研究をさらに遂行することは、個体レベルでの固形癌の悪性を抑制する技術の開発にも繋がり、基礎生物学的な知見だけでなく、医療技術への応用も期待出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyamoto T, Hosoba K, Itabashi T, Iwane AH, Akutsu SN, Ochiai H, Saito Y, Yamamoto T, Matsuura S.	4. 巻 39(12)
2. 論文標題 Insufficiency of ciliary cholesterol in hereditary Zellweger syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019103499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 宮本 達雄、細羽 康介	4. 巻 93
2. 論文標題 コレステロール欠乏による繊毛病の発症機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Miyamoto T, Hosoba K, Akutsu SN, Matsuura S	4. 巻 -
2. 論文標題 Imaging of the ciliary cholesterol underling the sonic hedgehog signal transduction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Miyamoto T, Hosoba K, Itabashi T, Iwane AH, Akutsu SN, Ochiai H, Saito Y, Yamamoto T, Matsuura S	4. 巻 -
2. 論文標題 Insufficiency of ciliary cholesterol in hereditary Zellweger syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019103499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------