

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 5 月 1 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16772

研究課題名（和文）CRISPRノックアウトライブラリーを用いた大腸癌転移機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of metastasis using CRISPR knockout library in colorectal cancer

研究代表者

石川 慧（Ishikawa, Satoshi）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90804021

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）：上皮間葉転換に関わる遺伝子の網羅的な解析手法として、当初CRISPRノックアウトライブラリーを用いたスクリーニングを試みたが、細胞株によるTGFβへの応答のばらつきのためこの系は十分に機能しなかった。そこで癌腺部と間質を分離して公開データベースの遺伝子発現データと併せて解析し、上皮間葉転換誘導遺伝子の網羅的な同定を行った。この中の一つであるARC遺伝子はin vitroにおいて大腸癌細胞の上皮間葉転換に関連し、また臨床検体においてその発現が大腸癌の再発と相関することを発見した。今後候補遺伝子の解析を進めることで上皮間葉転換の複雑なプログラムの理解および治療薬開発の一助となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮間葉転換は様々な癌種の転移プロセスに中心的な役割を果たすことが知られているが、関連する分子の全体像は明らかとなっていない。本研究では大腸癌細胞の上皮間葉転換に関連する遺伝子をバイオインフォマティクスの手法を用いて網羅的に同定することに成功した。個々の遺伝子についてはさらなる研究が必要であるが、上皮間葉転換の全体像を理解し、それを標的とする治療法開発につながる可能性があるという点で学術的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：As a comprehensive analysis of the genes involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), we initially attempted to screen the genes using a CRISPR knockout library. However, this system did not work well due to the variability in response to TGFβ among cell lines. Therefore, we isolated cancer epithelium and stroma and analyzed them with gene expression data from public databases to comprehensively identify EMT-inducing genes. One of these genes, ARC, was involved in EMT of colorectal cancer cells in vitro, and its expression was correlated with the recurrence of colorectal cancer in clinical samples. Further analysis of the candidate genes is expected to contribute to understanding the complex EMT program and the development of therapeutic agents targeting them.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：上皮間葉転換 大腸癌 バイオインフォマティクス

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition : EMT) とは、上皮細胞が細胞極性や細胞接着機能といった特性を失い間葉系細胞の特徴を得る形質変化で、真核生物の発生における器官形成の過程で重要な役割を果たす一方、種々の癌種において転移能の獲得のプロセスに深く関わり、予後の悪化に寄与することが知られている。EMT を制御することは転移再発の抑制や化学療法抵抗性の克服に向けた新たな治療標的として期待される。しかしながらこれまでに EMT に重要な役割を果たす分子の全体像は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

新規 EMT 関連遺伝子を同定し、大腸癌進展メカニズムにおいてその果たす機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 上皮間葉転換に関わる遺伝子の網羅的な解析手法として、当初 CRISPR ノックアウトライブラリーを用いて、大腸癌細胞株に TGF β を添加しノックアウトにより EMT が抑制される遺伝子のスクリーニングを試みた。しかし細胞株による TGF β への応答、EMT 誘導には大きなばらつきがあり、一定した結果を得ることができなかった。

(2) そこで、癌上皮と間質の独立した遺伝子発現プロファイルを用いて EMT 関連遺伝子を網羅的に同定することを試みた。Laser micro dissection によって得た癌上皮と間質の独立したデータ¹、公開データベースの癌部と間質の遺伝子発現が混在したデータを併せて in silico の解析を行い、癌細胞由来でありながら間質の遺伝子発現に強く関連する遺伝子を EMT 関連遺伝子候補として抽出した。この遺伝子群を大腸癌細胞株の遺伝子発現データベースを用いて解析した。抽出した EMT 関連遺伝子候補のうち、TCGA のデータベースにおいて大腸癌の病期や予後に関連する Activity-regulated cytoskeleton associated protein (ARC) に着目した。ARC は神経細胞に高発現する遺伝子であるが、これまで悪性腫瘍に関連した報告はない。同遺伝子の発現抑制株を作成し、EMT マーカーの変動、細胞機能の変化を in vitro において評価した。RNA-seq を行い、Gene Set Enrichment Analysis で関連するパスウェイを検討した。関連が示唆された TGF- β 誘導性の EMT への関与を解析した。また大腸癌臨床検体を用いて免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的因子や全生存期間、無再発生存期間との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) 上記手法により 90 の EMT 関連遺伝子候補を抽出した。大腸癌細胞株の遺伝子発現データベースにおいてこれらの遺伝子群は既知の間葉系マーカーと類似の細胞株で高発現していた。この中には EMT に関する既報がある遺伝子が複数含まれ、同抽出手法の妥当性が示唆された。

(2) 候補遺伝子の一つである ARC 遺伝子の発現抑制株を作成した。ARC のノックダウンにより上皮系マーカーである CDH1 の上昇、間葉系マーカーである ZEB1 の低下を認めた。

(3) ARC のノックダウンにより、大腸癌の主要な治療薬であるオキサリプラチンへの感受性の上昇を認めた。細胞遊走能の低下、浸潤能の低下を認めた。

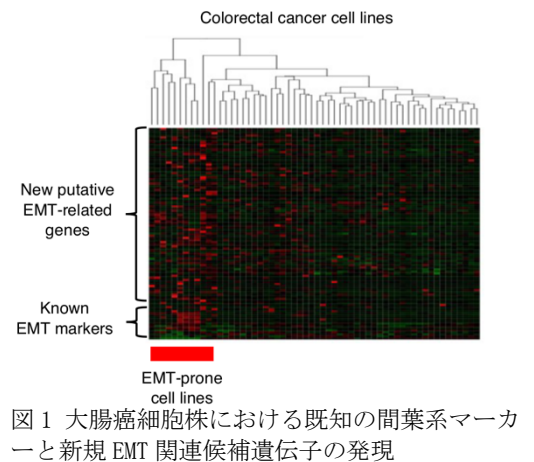


図1 大腸癌細胞株における既知の間葉系マーカーと新規 EMT 関連候補遺伝子の発現

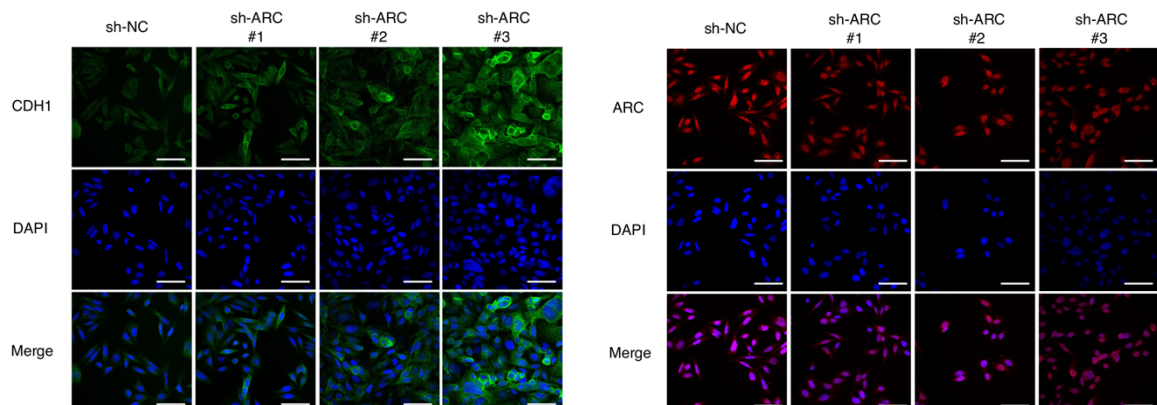


図2 ARC 発現抑制株における CDH1 の細胞蛍光免疫染色

(4) RNA-seq 結果の GSEA では TGF β 経路との関連が示唆された。TGF β 曝露により ARC 発現は増強し、ARC 発現抑制株では TGF β による EMT 誘導は減弱した。

(5) 免疫組織化学染色では ARC の発現はリンパ節転移、リンパ管侵襲と相関した。また ARC の発現は無再発生存期間との関連を認めた。

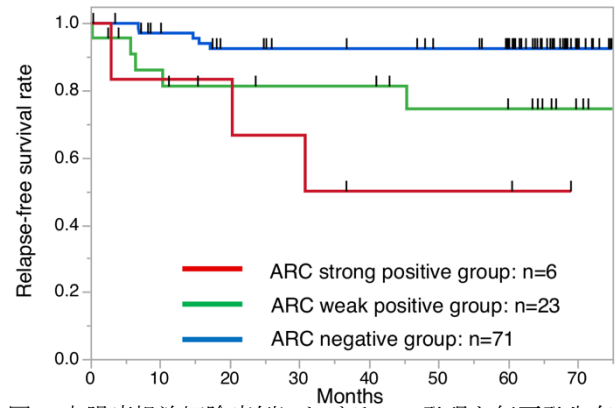


図1 大腸癌根治切除症例における ARC 発現と無再発生存期間の関連

1. Nishida, N. *et al.* Microarray Analysis of Colorectal Cancer Stromal Tissue Reveals Upregulation of Two Oncogenic miRNA Clusters. *Clinical Cancer Research* **18**, 3054-3070 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川 慧
2. 発表標題 癌腺部と間質の発現解析による新規上皮間葉転換（EMT）誘導遺伝子の同定
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 慧
2. 発表標題 新規上皮間葉転換関連遺伝子の同定とその大腸癌進展における意義の検討
3. 学会等名 日本外科学会第120回定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Ishikawa
2. 発表標題 dentification of novel epithelial-mesenchymal transition inducers and their clinical significance in colorectal cancer
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2020（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------