

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650627

研究課題名(和文) マウス生体を用いたがん転移抑制因子スクリーニング系の確立

研究課題名(英文) Development of in vivo screening systems for cancer metastasis suppressors

研究代表者

青木 正博 (AOKI, MASAHIRO)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・部長

研究者番号：60362464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移は複雑な過程であり、その分子機構の詳細は不明である。本研究では、転移抑制因子を生体レベルでスクリーニングする手法を開発した。マウス大腸がん細胞株CMT93にレンチウイルスshRNAライブラリーを感染させ、同系マウスの直腸粘膜下に接種した。約10週後に転移巣からゲノムDNAを抽出、PCR増幅したベクター内フラグメントの塩基配列から標的遺伝子の候補を同定した。得られた11個の転移抑制因子候補の中で、まず選択的スプライシングへの関与が示唆されるHnrp11に着目して転移抑制能の検証を進めており、Hnrp11のノックダウンによりCMT93の増殖能が有意に亢進する結果を得ている。

研究成果の概要(英文)：Cancer metastasis is a complex process whose molecular mechanism is not fully understood. To identify targets for prevention and/or therapy of cancer metastasis, we developed a genome-wide shRNA library screen for colon cancer metastasis suppressor genes using an orthotopic transplantation mouse model. CMT93 cells, a murine colon cancer cell line with poor metastasizing activity, were transduced with lentiviral shRNA library and transplanted into the rectum of syngeneic C57/BL6 mice. The sequences encoding shRNA were retrieved from genomic DNA of the metastatic lesions by PCR for sequencing, followed by identification of the candidate genes targeted by the shRNA. Among 11 candidate genes identified so far, we focused on Hnrp11 encoding an RNA-binding protein involved in pre-mRNA splicing, because the shRNA targeting the gene was identified from two metastatic lesions found in different transplanted mice. Knockdown of Hnrp11 in CMT93 cells resulted in accelerated proliferation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：転移 大腸がん shRNA

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍による死因の約 9 割が浸潤・転移によるものであるとされる。浸潤転移は、生体内で(1)局所浸潤、(2)脈管侵入、(3)脈管内輸送、(4)管外遊出、(5)微小転移巣形成、(6)転移増殖の 6 つの連続した生物学的プロセスを経る。この浸潤転移プロセスの進行は、転移促進因子と転移抑制因子が複雑に相互作用することにより制御されると考えられている。また、腫瘍細胞の浸潤転移には、腫瘍細胞内での遺伝子変化やエピジェネティックな変化だけでなく、非腫瘍細胞、すなわち間質細胞との相互作用も大きな影響を与えていることも明らかとなっている。転移促進因子は、既に数多く同定され、臨床応用も目指した研究も行われているが、転移抑制因子は、同定された因子の数自体が少ないのが現状であった。

shRNA ライブラリーを用いた、転移抑制因子の機能によるスクリーニングについては、まず *in vitro* で細胞の運動能や細胞外基質への浸潤能を指標にスクリーニングを行って得られた候補についてマウスでの転移能を調べたものがほとんどであり、直接生体での転移を指標にスクリーニングを行った研究はほとんど行われていなかった。浸潤転移は上記のように間質細胞との相互作用の絡んだ極めてダイナミックなプロセスであり、*in vitro* の運動能亢進や細胞外基質への浸潤能だけを指標に捉えられるものではないため、生体でのスクリーニング系の確立が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究計画では、レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いたマウス生体での順行遺伝学的スクリーニング方法を樹立して、大腸がんおよび肺がんの新規転移抑制因子を同定することを目指した。以下の 2 つの具体的な目的を設定した。

(1) ①レンチウイルス shRNA ライブラリーを *in vitro* で感染させたマウス大腸がん細胞株をマウス腸管に同所移植する系、② 同ライブラリーを *in vitro* で感染させたマウス初代培養大腸腺がん細胞をマウス腸管に同所移植する系、③肺がんマウスモデルを用いて同ライブラリーを経気道的に、*in vivo* で肺がん細胞に感染させる系の 3 つのスクリーニング系を樹立する。

(2) 樹立したスクリーニング系を用いて新規転移抑制因子候補を同定し、それらの役割について機能・発現の側面から初期的な検証を行うことでスクリーニング系の有用性を実証する。

3. 研究の方法

マウス大腸がん細胞株 CMT93 の細胞膜上に Venus 蛍光タンパクを恒常的に発現させた CMT93-Venus 細胞に、レンチウイルスマウス shRNA ライブラリー (Sigma MISSION

shRNA Lentiplex pooled libraries) を予備実験によって決定した至適 MOI で感染させた後、puromycin によりレンチウイルスベクター感染細胞を選択し、それらを C57BL/6 マウスの直腸粘膜下に接種した。約 10 週間後にマウスを安楽死させ、蛍光実体顕微鏡を用いて肝臓、肺、腸間膜リンパ節内の転移巣を検索した。得られた転移巣からゲノム DNA を抽出し、レンチウイルスベクター内の配列を用いて PCR で増幅したフラグメントの塩基配列を決定した。得られた塩基配列から、Lentiplex shRNA sequence search database を用いてノックダウンされているはずの標的遺伝子を同定した。これら候補遺伝子候補が大腸がんの遠隔転移に關与する可能性について、文献による検索や Oncomine などのデータベースを用いたデータマイニングにより検討した。

可能性が高いと判断された Hnrpl1 遺伝子について shRNA を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、安定的にノックダウンした変異株を作製し、細胞増殖・浸潤能などへの影響を調べた。また、Hnrpl1 と結合する RNA を同定するため、FLAG-Hnrpl1 を CMT93 細胞に強制発現して抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈した RNA を逆転写してその塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いた大腸がん転移抑制因子のスクリーニング

「研究の方法」に述べた手法を用いて、Venus 蛍光タンパクを発現させた、低転移性の C57BL/6 マウス由来大腸がん細胞株 CMT93 にレンチウイルス shRNA ライブラリーを感染させ、同系の C57BL/6 マウスの直腸に同所移植した (図 1)。

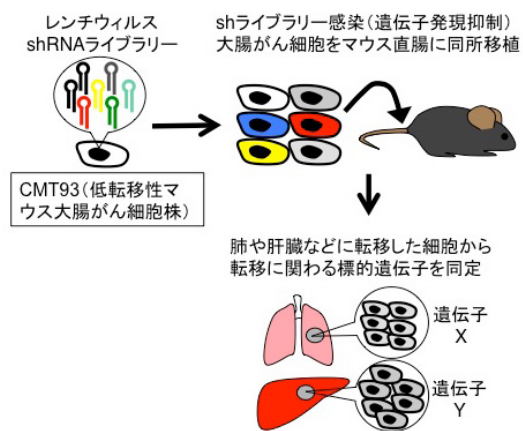


図 1. レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングの概略図

移植後約 10 週間で同マウスの肺・腸間膜リンパ節に生じた転移巣の写真 (図 2) および組織像 (図 3) を示す。

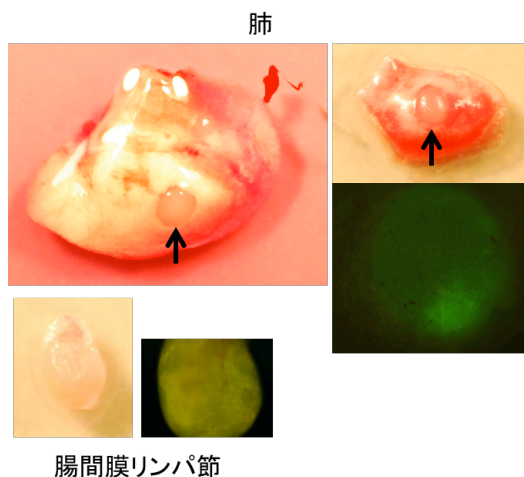


図 2. 肺、腸間膜リンパ節に生じた転移巣。肺の右下図および腸間膜リンパ節の右図は CMT93 細胞表面に発現させた Venus 蛍光タンパクを蛍光実体顕微鏡で観察した画像。

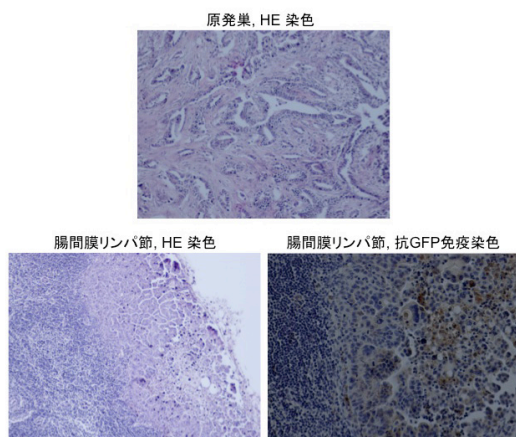


図 3. 原発巣 (上) と腸間膜リンパ節転移巣 (下左) のヘマトキシリン・エオジン染色像、および腸間膜リンパ節転移巣の抗 GFP 抗体 (Venus を認識) を用いた免疫染色像 (下右)。

得られた転移巣のゲノム DNA の解析から、それぞれの転移巣の CMT93 細胞に組み込まれていた shRNA をコードする配列を決定し、データベースを検索することにより、11 個の標的遺伝子候補を同定することができた (表 1)。得られた 11 個の転移抑制因子候補の中で、まず 2 個の転移巣から別個に同定された、選択的スプライシングへの関与が示唆される *Hnrpll* に着目して転移抑制能の検証を進めている。

Official Symbol	転移臓器	Human Ortholog
<i>Hnrpll</i>	肺、肝臓	HNRPLL
<i>Prph2</i>	肺	PRPH2
<i>Dusp27</i>	肺	DUSP27
<i>Olf935</i>	肺	
<i>Zkscan8</i>	腸間膜リンパ節	ZKSCAN8
<i>Mrpl43</i>	腸間膜リンパ節	MRPL43
<i>Nnt</i>	肺	
<i>Usp6nl</i>	腸間膜リンパ節	USP6NL
<i>Pepd</i>	肺	PEPD
<i>Slc4a10</i>	肺	SLC4A10
<i>Tenm4</i>	肺	TENM4

表 1. 同定された転移抑制遺伝子候補

### (2) 大腸がん転移抑制因子候補 *Hnrpll* の解析

*Hnrpll* の大腸がん転移における役割を調べる第一歩として、CMT93 細胞で *Hnrpll* を複数のレンチウイルス shRNA ベクターを用いてノックダウンした安定株を樹立した (図 4)。

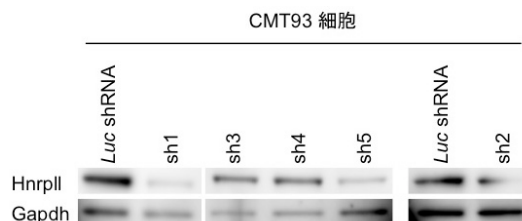


図 4. *Hnrpll* に対する shRNA (sh1-sh5) および対照 shRNA (Luc shRNA) を発現させた CMT93 細胞における *Hnrpll* の発現のウェスタンブロット解析。

最もノックダウン効率が高かった sh1 および sh5 を用いて *Hnrpll* の発現低下が大腸がん細胞の増殖におよぼす影響を調べた。図 5 の増殖局線に示すとおり、sh1、sh5 のいずれにおいても対照 (Luc shRNA) と比較して、有意に増殖速度が亢進していた。

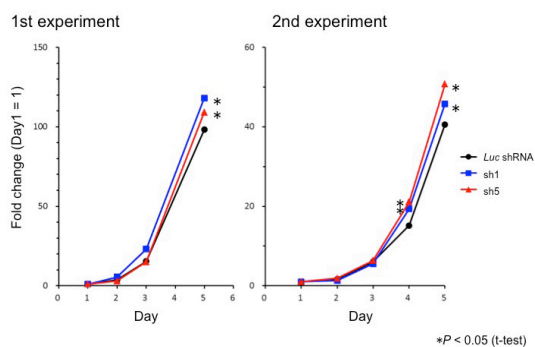


図 5. *Hnrpll* をノックダウンした CMT93 細胞 (sh1, sh5) および対照細胞 (Luc shRNA) の増殖曲線。

一方、*in vitro*での運動能、マトリゲル浸潤能については、*Hnrpl1*をノックダウンしても変化が認められなかった。*Hnrpl1*のノックダウンが*in vivo*での転移能に与える影響について現在解析中である。

また、*Hnrpl1*は、先行研究にて選択的スプライシングへの関与が示唆されているRNA結合タンパクであることから、*Hnrpl1*と結合するRNAの同定を試みた。FLAG-*Hnrpl1*をCMT93細胞に強制発現し、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降を行い、*Hnrpl1*と共沈したRNAをサブクローニングしてDNAシーケンシングで配列を決定し、BLAST検索によって遺伝子名を同定した。現在、同定した各遺伝子について、*Hnrpl1*のノックダウンによるスプライシングバリエーションの発現変化を検証している。

以上のように、本研究ではレンチウイルスshRNAライブラリーを用いたマウス生体での順行遺伝学的スクリーニング方法を樹立することができた。今後、さらに転移抑制因子候補の数を増やすとともに、同定された候補因子の転移における役割について明らかにしていきたい。

#### 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3件)

① Sakuma K, Chen GY, Aoki M, Kannagi R: Induction of 6-sulfated glycans with cell adhesion activity via T-bet and GATA-3 in human helper T cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1820:841-848, 2012. (査読有)

② Sakuma K, Aoki M, Kannagi R: Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109:7776-7781, 2012. (査読有)

③ Sakuma K, Aoki M, Kannagi R: Sialic acid cyclization of human Th homing receptor glycan associated with recurrent exacerbations of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 68:187-93, 2012. (査読有)

[学会発表] (計8件)

① 藤下晃章、武藤誠、青木正博、mTORキナーゼ阻害薬は大腸がんモデルマウスの腺がん形成を強力に抑制する、第36回日本分子生物学会、平成25年12月5日(神戸)

② 青木正博、藤下晃章、武藤誠、CDX転写因子の標的分子PLEKHG1の発現低下は大腸腫瘍形成を促進する、第72回日本癌学会学術総会、平成25年10月3日(横浜)

③ 藤下晃章、武藤誠、青木正博、mTORキナーゼ阻害薬は大腸がんモデルマウスの大腸腺がん形成を抑制する、第72回日本癌学会学術総会、平成25年10月4日(横浜)

④ 小島康、松尾恵太郎、伊藤秀美、細野覚代、田中英夫、青木正博、日本人胃がん患者の体組成変化、第72回日本癌学会学術総会、平成25年10月5日(横浜)

⑤ 佐久間圭一郎、神奈木玲児、青木正博、大腸がん細胞においてシアリルルイス糖鎖の発現とEMTは関連する、第65回日本細胞生物学会大会、平成25年6月20日(名古屋)

⑥ 青木正博、後藤嘉子、武藤誠、CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of PLEKHG1 in Intestinal Epithelium. 第35回日本分子生物学会年会、平成24年12月14日(博多)

⑦ 青木正博、武藤誠、CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of PLEKHG1 in Intestinal Epithelium. 第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19日(札幌)

⑧ 佐久間圭一郎、神奈木玲児、青木正博、c-MycとCDX2はEMTを起こした大腸がん細胞におけるE-セレクトインリガンド糖鎖の発現を媒介する、第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19日(札幌)

[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

青木 正博 (AOKI MASAHIRO)  
愛知県がんセンター (研究所)・分子病態  
学部・部長  
研究者番号：60362464

(2)研究分担者

佐久間 圭一郎 (SAKUMA KEIICHIRO)  
愛知県がんセンター (研究所)・分子病態  
学部・主任研究員  
研究者番号：90402891

(3)連携研究者

小島 康 (KOJIMA YASUSHI)  
愛知県がんセンター (研究所)・分子病態  
学部・主任研究員  
研究者番号：30464217