

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670156

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9法を用いた多能性維持遺伝子破壊による癌幹細胞形成能の検証

研究課題名(英文) Investigation of roles of pluripotency-related genes on cancer stem cells using CRISPR-Cas9 genome editing

研究代表者

金田 安史 (Kaneda, Yasufumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10177537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9を用いて、去勢抵抗性のヒト前立腺癌細胞DU145で発現しているNANOG1、NANOGP8を完全にノックアウトした。NANOG1とNANOGP8のノックアウト細胞は、いずれもスフェア形成、足場非依存性増殖、浸潤能、抗癌剤(Docetaxel)耐性能がいずれも低下し、2つの遺伝子間での差はなかった。SCIDマウスの皮内に腫瘍を形成すると、いずれの遺伝子欠損株でも、腫瘍形成が抑制された。これらの形質変化は、それぞれの欠損遺伝子の強発現で回復した。

研究成果の概要(英文)：NANOG expression in prostate cancer is highly correlated with cancer stem cell characteristics and resistance to chemotherapy. However, it is not clear whether NANOG or its pseudogenes contribute to the malignant potential of cancer. We established NANOG- and NANOGP8-knockout DU145 prostate cancer cell lines using the CRISPR/Cas9 system. Knockouts of NANOG and NANOGP8 significantly attenuated malignant potential, including sphere formation, anchorage-independent growth, migration capability, and drug resistance, compared to parental DU145 cells. NANOG and NANOGP8 knockout did not inhibit in vitro cell proliferation, but in vivo tumorigenic potential decreased significantly. These phenotypes were recovered in NANOG- and NANOGP8-rescued cell lines. These results indicate that NANOG and NANOGP8 proteins are expressed in prostate cancer cell lines, and NANOG and NANOGP8 equally contribute to the high malignant potential of prostate cancer.

研究分野：病態医科学

キーワード：癌幹細胞 多能性維持因子 ゲノム編集

1. 研究開発当初の背景

抗癌剤等による治療後も多くの癌は再発しさらに増悪することが知られているが、この原因として癌幹細胞の関与が示唆されてきた。実際に、抗癌剤の投与後に癌幹細胞としてその表面抗原が同定されている集団が増加すること、癌幹細胞が多く含まれるスフェアの形成能が高まることが報告されている。この癌幹細胞集団を排除することが癌の再発抑制につながることを期待されてきた(文献1)。しかし癌幹細胞集団を除いた癌細胞集団において、抗癌剤を投与していると癌幹細胞としてのマーカーを有する集団が出現し、スフェア形成を促す環境下におくと頻度が低くてもスフェア形成がおこる。このことは、どの癌細胞にも癌幹細胞を形成できるポテンシャルがあり、何らかの遺伝子発現の変化によって制御されていることが示唆される。一方、抗癌剤の Docetaxel を前立腺癌細胞 DU145 に作用させ24時間後の遺伝子発現を microarray で網羅的に解析したところ、ES細胞の多能性維持に必要とされる *NANOG*, *Sox2*, *Oct4* といった遺伝子の発現が Docetaxel 投与により急速に増加し、その後次第に低下することがわかった。このような遺伝子発現の変動は正常細胞では見られず、癌細胞に特有の現象である、ことも見出された。さらにスフェア形成時にこのような多能性維持因子の遺伝子発現が極めて高くなりスフェア形成を解除すると次第に低下していくことも明らかになった。以上のことから、多能性維持遺伝子の一過性の発現が癌幹細胞を形成する、という仮説を導きだすことができる。それは裏を返せば、多能性維持遺伝子の発現を完全になくせば、癌幹細胞を形成できない癌細胞集団を作ることができ、抗癌剤治療後の再発を完全に防ぐことができ

ることを示唆している。

前立腺癌細胞に多能性維持因子の1つである *NANOG* (実際には *NANOG paralog* の *NANOGP8*) の shRNA を導入したところ腫瘍形成能が著明に低下したとの報告があり、我々の上記仮説を支持している(文献2)。しかしその報告では腫瘍形成能が低下しても小さい腫瘍はやはり形成される。これは *NANOG* 以外の遺伝子も関わっている可能性と shRNA 技術では完全に *NANOG* 遺伝子発現を抑制できず、少しでも *NANOG* を発現した癌細胞が腫瘍を形成した可能性が考えられる。別の多能性維持因子 *Oct4* の shRNA を共導入しても同様な結果であり、おそらく後者の原因(完全に遺伝子発現を抑制できない)が考えられる。

2. 研究の目的

癌細胞集団から癌幹細胞を消失させれば、抗癌剤耐性という特質を喪失させ癌の再発を抑制できることが期待される。研究代表者は、抗癌剤などの様々なストレスに癌細胞が暴露されることにより、一部の癌細胞が治療抵抗性の遺伝子発現を誘導することを見出した。その際、多能性維持因子のうち *NANOG* の発現が一過性に特に増強する。さらに癌幹細胞集団と考えられるスフェア形成時には、これら多能性維持因子の発現が急激に増強するが、スフェア形成を解除すると発現しなくなる。このことは、多能性維持因子が癌幹細胞形成に必須であることを示唆している。そこで、まず代表的な多能性維持因子の *NANOG* 遺伝子を完全にノックアウトした癌細胞を CRISPR/Cas9 法により作成し、それぞれの癌細胞の腫瘍形成能、抗癌剤耐性を評価し、癌幹細胞を決定づける遺伝子の同定を目指す。

3. 研究の方法

- 1) *NANOG* のノックアウトを試みる。
NANOG には完全長の蛋白をコードする 3 つの遺伝子が存在する。*NANOG1*, *NANOG2*, *NANOGP8* であり、論文では *NANOG1* と *NANOGP8* が多くの癌細胞では発現している、特に *NANOGP8* の発現が高い (文献 3)。しかし研究代表者のデータではスフェア形成時に最も大きく変動するのは *NANOG1* であった。そこで *NANOG1* のための標的配列を決定し、その guide RNA とその相補鎖を設計する。それを開発者の Feng Zhang のラボより提供してもらった CRISPR-Cas9 plasmid に組み込んで、Cas9 expression vector (System Biosciences) を作成する。そのプラスミドを DU14 細胞に導入し、pGK-Puro のベクターと一緒にトランスフェクションして、Puromycin で短期間セクションしてコロニー形成させてクローニングを行い、その中で標的遺伝子のホモ変異体株を PCR を行って選別する。それぞれの遺伝子のノックアウト株を DU145 細胞で 2 株以上分離し、目的の遺伝子発現がないことを RT-PCR, Western blot で確認する。
- 2) 特定の遺伝子のノックアウトした際に、他の遺伝子座にも影響を及ぼしている (off-target effect) ことは頻度は低くとも完全に否定できない。これを調べるには次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンシングが 1 つの方法であるが、機能的な面からは、標的遺伝子を導入して形質が回復するかどうかを検証することが重要である。そのために *NANOG*,

NANOGP8 遺伝子の強発現プラスミドを欠損株に導入して発現させる。導入遺伝子を内在性の遺伝子と区別するためにそれぞれ GFP を付加する。

- 3) それぞれの癌細胞株の増殖能を MTS assay で評価する。また種々の濃度の Docetaxel を作用させたときの増殖能を動揺に評価する。さらに 10^3 /well 程度の濃度で低吸着培養プレートで無血清の特殊培地でスフェア形成を行わせ、その形成数を野生株と比較する。また足場非依存性の増殖能の評価として、Soft agar colony formation を行わせ、CyQuant GRDye で染色後、プレートリーダー (480/520 nm filter) で測定する。これらのアッセイは既に我々が報告している論文 (文献 4) の方法に準じて行う。
- 4) 抗癌剤 Docetaxel をそれぞれの変異細胞株や野生株に濃度を変えて投与し、そのときの生存率を MTS assay で評価する。また遺伝子発現を microarray を用いて網羅的に解析し、抗癌剤の耐性と関連する遺伝子群を推定する。
- 5) それぞれの変異癌細胞株及び野生型の癌細胞株を細胞数を変えて (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6)、免疫不全の NOD-SCID マウスの皮内に移植し、腫瘍形成を経日的にサイズ測定を行って評価する。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 を用いて、去勢抵抗性のヒト前立腺癌細胞 DU145 で発現している *NANOG1*, *NANOGP8* を完全にノックアウトし、スフェア形成、腫瘍形成、抗癌剤耐性に及ぼす影響について検証した。*NANOG1* と *NANOGP8* のノックアウト

細胞は、いずれもスフェア形成（図1）、足場非依存性増殖、浸潤能、抗癌剤（Docetaxel）抵抗性（図2）がいずれも低下し、2つの遺伝子間での差はなかった。

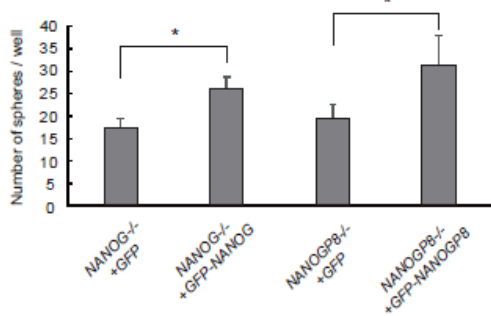


図1：NANOGL, NANOGP8 ノックアウト DU145 前立腺癌のスフェア形成能。GFP-NANOG あるいは GFP-NANOGP8 遺伝子導入により低下したスフェア形成が回復。

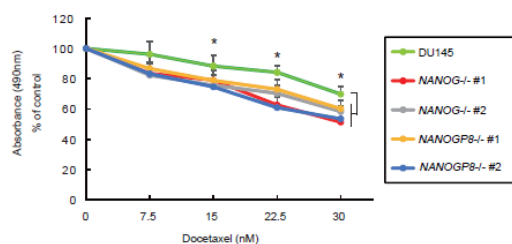


図2：NANOGL, NANOGP8 ノックアウト DU145 前立腺癌細胞の抗癌剤 Docetaxel 抵抗性の低下。

しかしいずれも正常培地での増殖には影響がなかった。SCID マウスの皮内に腫瘍を形成させたところ、いずれの遺伝子欠損株でも、きわめて小さい腫瘍形成が見られた。これらの形質変化は、それぞれの欠損遺伝子の強発現で回復した（図3）。

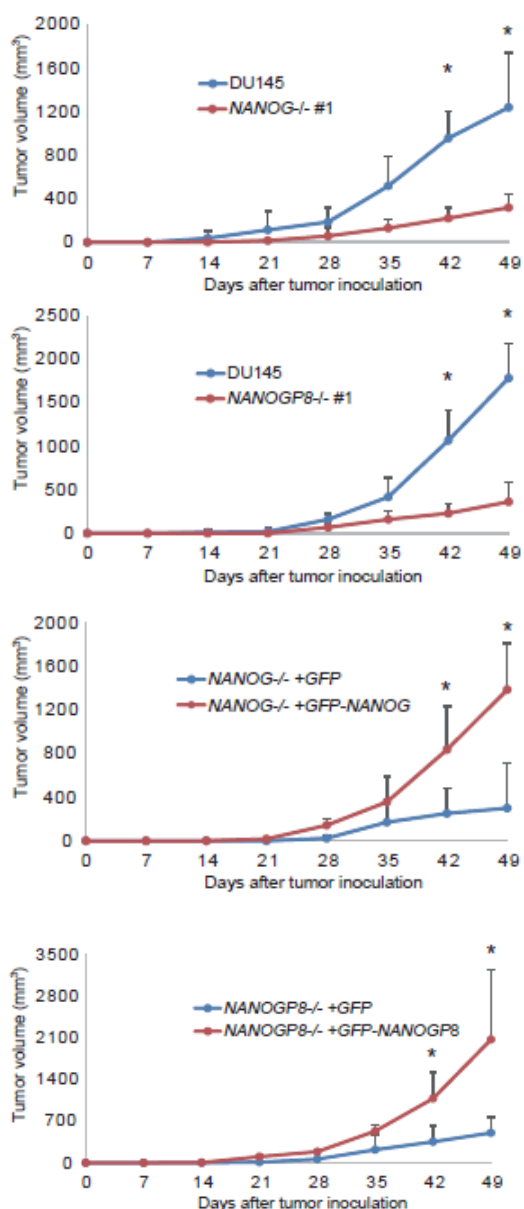


図3：NANOGL, NANOGP8 ノックアウト DU145 前立腺癌細胞のマウスでの腫瘍形成能（上段2つのグラフ）。GFP-NANOG, GFP-NANOGP8 遺伝子を導入した細胞の腫瘍形成能（下段2つのグラフ）。

従来、ヒト前立腺癌細胞では腫瘍形成や抗癌剤耐性については NANOGP8 の関与のほうが大きい報告されてきたが、2つの遺伝子は癌幹細胞の示す形質に対して

同等に機能していることが明らかになった。次に、*NANOGL*, *NANOGP8* のダブルノックアウト細胞の分離を試みたが、300以上のコロニーを検索したが、いずれもダブル欠損株ではなかった。NANOG 蛋白の発現は細胞の生存に必須であり、特にこの遺伝子が強く発現している癌幹細胞の維持にはきわめて重要な因子であることが示唆された。

<引用文献>

1. Visvader JE, Lindeman GJ.. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Rev. Cancer* 8, 755-768, 2008
2. Jeter CR, Badeaux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C, Calhoun-Davis T, Zaehres H, Daley GQ, Tang DG. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. *Stem Cells* 27, 993-1005, 2009.
3. Palla AR, Piazzolla D, Abad M, Li H, Dominguez O, Schonthaler HB, Wagner EF, Serrano M. Reprogramming activity of NANOGP8, a NANOG family member widely expressed in cancer. *Oncogene*. 33(19):2513-9, 2014.
4. Hatano, K., Yamaguchi, S., Nimura, K., Murakami, K., Nagahara, A., Fujita, K., Uemura, M., Nakai, Y., Tsuchiya, M., Nakayama, M., Nonomura, N., and Kaneda, Y. Residual prostate cancer cells after docetaxel therapy increase the tumorigenic potential via constitutive CXCR4, ERK1/2 and c-Myc signalling loop activation. *Mol. Cancer Res.*, 11:1088-100. 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kawamura N, Nimura K., Nagano H, Yamaguchi S, Nonomura, N, Kaneda, Y. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG1 and NANOGP8 leads to low malignant potential in prostate cancer. *Oncotarget*, Sep 8;6(26):22361-74, 2015.Liu,

[学会発表] (計2件)

- ① Kawamura K, Nonomura N, Kaneda Y. 第74回日本癌学会学術総会 CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. 2015/10/10 Nagoya (Japan).
- ② Kawamura K, Nimura K, Nagano H, Yamaguchi S, Nonomura N, Kaneda Y. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. 2015/7/24 Osaka (Japan).

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 安史 (KANEDA, Yasufumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10177537

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし