

論文内容の要旨

論文題目：癌幹細胞の造腫瘍性に関わる因子の探索とその機能解析
(Identification and characterization of factors involved in the tumorigenicity of cancer stem cells)

氏名： 平岡 巧士

序論

近年、癌組織には様々な性質を持つ癌細胞が存在することが示され、その中には、幹細胞様の性質を持ち高い造腫瘍性を示す癌幹細胞とよばれる細胞集団がいることが明らかとなった。癌幹細胞は自己複製能、多分化能、造腫瘍能といった性質を持ち、癌幹細胞を標的とした研究や治療には、癌幹細胞を同定しその性質を評価することができる癌幹細胞マーカーが重要な役割を持つ。癌幹細胞は今までの研究で多くの癌種に存在することが示されており、また共通の癌幹細胞の性質を持つことから、様々な癌種の癌幹細胞を同じように評価し研究することで癌幹細胞の更なる理解へとつながることが期待されている。しかし、種々の癌腫で共通して発現し、癌幹細胞を同定し評価できる癌幹細胞マーカーについての報告はほとんどない。共通の癌幹細胞マーカーの一つである CD133 でも多くの論文で癌幹細胞の単離や評価に用いられる一方、CD133 陰性の癌細胞でも同様の癌幹細胞としての性質が報告され、実際に多くの研究で CD133 が癌幹細胞と非幹細胞の両方で発現していることが証明されている。

本研究では近年の研究で癌幹細胞マーカーとして注目されてきた LGR5 を指標とし、複数の癌種で癌幹細胞の解析を行った。

LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) は、近年の研究に

より、リガンドの R-spondins と複合体を形成することで Wnt シグナルを活性化することが明らかとなっている。さらに、LGR5 は Wnt シグナルが重要な役割を持つ幹細胞の自己複製能に必須であり、幹細胞を同定するためのマーカーとしても使われている。

CD133 が癌幹細胞マーカーとして論争的になるのは CD133 の機能が未だに完全に解明されていないことが原因の一つとして考えられているため、機能が明らかとなっており、同時にその機能が癌幹細胞の維持に重要であることが示されている LGR5 は複数の癌種の癌幹細胞で癌幹細胞マーカーとしての役割を担うことが期待できる。

本研究では前述の通り、LGR5 が Wnt シグナルを昂進するため、Wnt シグナルが癌幹細胞の維持に重要な役割を果たしているグリオブラストーマと大腸癌において共通のマーカーとして評価できると考え、LGR5 を指標としたスクリーニングによりグリオブラストーマと大腸癌における癌幹細胞の造腫瘍性に関わる遺伝子を探索し、その機能を解析することを目的とした。

グリオブラストーマ幹細胞の造腫瘍性に関わる遺伝子の探索とその機能解析

当研究室では癌幹細胞の解析のため、ヒトグリオブラストーマ検体から癌幹細胞株 GB2 細胞を樹立している。まず、LGR5 がグリオブラストーマ幹細胞の増殖能及び造腫瘍性に必要であることを確認するため、GB2 細胞に LGR5 を標的とした shRNA を発現するレンチウイルスを感染させた。その結果、LGR5 の発現抑制により GB2 細胞の増殖能が低減することが分かった。さらに、GB2 細胞を免疫不全マウスに移植し生存期間を測定した結果、LGR5 が GB2 細胞の造腫瘍性に貢献していることが見出された。

次に、LGR5 を指標として GB2 細胞の造腫瘍性に寄与する遺伝子を同定するため LGR5 の転写活性を正に制御する因子に注目した。戦略としてまず、LGR5 のプロモーター領域に着目し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性のある転写開始点から上流 300 bp を特定した。さらに、TRANSFAC を用いたモチーフ解析によりこの領域に結合する可能性のある転写因子を候補因子として同定した。これらの候補因子に対して RNAi スクリーニングを行った結果、LGR5 の発現に影響する転写因子として SOX9 (Sry-related high-mobility group (HMG) box 9) を同定することに成功した。さらに、ルシフェラーゼアッセイと ChIP アッセイにより SOX9 が LGR5 のプロモーター領域に直接結合し LGR5 の転写活性を制御していることが示されたため、次にこの SOX9 が GB2 細胞の造腫瘍性に寄与する遺伝子であるかを調べた。

LGR5 と同様に GB2 細胞に SOX9 を標的とし shRNA を発現するレンチウイルスを感染

させた。その結果、SOX9の発現抑制によりGB2細胞の増殖及びスフィア形成能が低減することが分かり、免疫不全マウスを用いた実験からSOX9がGB2細胞の造腫瘍性にも貢献していることが見出された。

以上の結果により、LGR5を指標としたスクリーニングによりグリオブラストーマにおいてLGR5の転写を制御し造腫瘍性に関わる遺伝子を同定することに成功した。

大腸癌幹細胞の造腫瘍性に関わる遺伝子の探索とその機能解析

次に、Wntシグナルが重要な役割を担うもう一つの癌種である大腸癌の癌幹細胞に対してLGR5を指標としたスクリーニングにより造腫瘍因子を同定することを目指した。現在、多くの研究で大腸癌幹細胞の造腫瘍因子が同定され、その機能が明らかになっているが、タンパク質をコードしないnon-coding RNA (ncRNA)の領域では未だ大腸癌幹細胞の重要な遺伝子は報告されていない。ncRNAはシーケンサーの発達により膨大な種類が存在し、通常のタンパク質をコードする遺伝子と比べて組織特異性が高い発現を示すことから細胞の性質に大きく影響している可能性が示唆されている。そのため、大腸癌幹細胞においてLGR5の発現に影響するncRNAの探索により大腸癌幹細胞の造腫瘍性に関わるncRNAを同定できることが期待できた。

まず、検体由来のヒト大腸癌組織から抗CD133抗体と抗CD44抗体を用いたFACSにより癌幹細胞を単離した。この大腸癌幹細胞で発現が昂進しているncRNAを同定し、次に、これらの候補遺伝子の中から癌幹細胞の造腫瘍性に関わる遺伝子を絞り込むことを目的としたLGR5を指標としたスクリーニングを行った。その結果、大腸癌幹細胞を用いて候補となるncRNAへのRNAiスクリーニングにより、大腸癌幹細胞においてLGR5の発現の維持と高い増殖能に寄与する6つのncRNAを同定することに成功した。

そこで、次に、この6つのncRNAからncRNA-Xを選択しその機能を解析した。現在多くのncRNAで結合タンパク質を介した機能が報告されているため、ncRNA-Xの機能解析を目的とした結合タンパク質の同定を試みた。まず、ncRNA-Xが局在する核分画タンパク質の抽出液を用いncRNA-XをベイトとしたRNA-pulldownアッセイを行い、ncRNA-Xに結合するタンパク質の抽出液を得た。次に、この抽出液からncRNA-Xに特異的に結合するタンパク質を選別するため銀染色を用いてncRNA-Xで特異的にみられるバンドを識別し、このバンドに含まれるタンパク質をMS解析を用いて検出した。その結果、ncRNA-Xの結合タンパク質として癌遺伝子のSRSF1 (Serine/arginine-rich Splicing Factor 1)を同定した。SRSF1は主に選択的スプライシングによってターゲットとなるmRNAの特定のエキ

ソンをスキップし増殖促進やアンチアポトーシスに働くバリエントを生成することで癌細胞に寄与していることが知られている。そこで、ncRNA-X と SRSF1 の発現をそれぞれ抑制した大腸癌細胞で SRSF1 のターゲットとなる mRNA のバリエントの生成の変化を検証した結果、ターゲットの一つである BIM のバリエントの一つでアポトーシスの促進に関わる BIM long form の増加が見られた。そのため、大腸癌細胞の造腫瘍性を ncRNA-X と SRSF1 の複合体が維持する機構はこの BIM long form の増加を抑えることが影響している可能性が考えられる。また、SRSF1 は選択的スプライシング以外にも mRNA の翻訳を促進することで癌細胞に貢献することが報告されている。そこで、ncRNA-X と SRSF1 をそれぞれノックダウンした大腸癌細胞で翻訳開始に関わるタンパク質 p70 S6K を検出したところ、それぞれにおいて p70 の減少が見られ、実際に標的の一つである VEGF のタンパク質量が減少していた。以上の結果から LGR5 を指標とした大腸癌幹細胞のスクリーニングにより造腫瘍性に関わる ncRNA-X を同定することに成功し、またこの ncRNA-X は SRSF1 のスプライシングと翻訳制御の両方に影響することで大腸癌の造腫瘍性に関わっている可能性が示唆された。

結論

以上の結果から、Wnt シグナルが重要な役割を担う癌幹細胞での造腫瘍性に関わる遺伝子の探索において、LGR5 を指標としたスクリーニングは非常に重要な手法の一つである可能性が示唆された。また、LGR5 を指標としたスクリーニングによりグリオブラストーマ幹細胞での LGR5 の転写を制御し造腫瘍性に関わる因子として SOX9 を同定した。そして、大腸癌幹細胞では ncRNA の LOC332 を同定することに成功し、その機能解析により SRSF1 との相互作用が示唆された。これらの遺伝子の更なる解析により新たな癌幹細胞の治療薬の標的となる可能性が期待できる。