

正常中皮細胞に対する遺伝子導入による悪性化の検討

研究分担者 瀬戸加大 愛知県がんセンター研究所 副所長兼遺伝子医療研究部 部長

研究要旨：悪性中皮腫の発症機構として様々なゲノム異常が報告されており、その中でも NF2、LATS2、YAP1 遺伝子異常によるシグナル伝達系が悪性中皮腫の腫瘍化に主要な役割を担っていることが証明されてきた。これらは主として患者検体と細胞株を用いて明らかにされてきたが、悪性中皮腫に認められるゲノム異常は個々の患者検体により様々に異なっていることを我々はこれまでのアレイ CGH の解析により明らかにしてきた。しかしこれまでに見出された遺伝子異常が悪性中皮腫にどのように関わっているのかについての実証実験はない。このためこれらの中皮腫の増殖、腫瘍化に重要と思われる遺伝子を不死化正常中皮細胞へ導入し増殖能の変化や形態変化、腫瘍化能を検討することは、正常中皮細胞から悪性中皮腫へと形質転換する分子機構をより明瞭化することができる可能性を示唆する。今回、当研究グループが作成してきたヒトパピローマウイルス E6/E7-hTERT により不死化した正常中皮細胞株 3 株に代表的な中皮腫がん関連遺伝子 YAP1 を導入することで *in vitro* にて増殖促進効果が認められることを確認した。さらに YAP1 遺伝子を導入した正常中皮細胞株をヌードマウスへ移植した結果、*in vivo* においても腫瘍を形成できることを確認した。このことは特定の遺伝子導入により悪性中皮腫モデルを作成できたことを意味し、治療実験や他の遺伝子導入による効果などの検定のための基盤とすることができる。

A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス E6/E7-hTERT により不死化した正常中皮細胞株に悪性中皮腫関連がん遺伝子を導入し、増殖様式や形態変化を検討する。さらにマウスへの移植実験により造腫瘍性を検討する。これらにより悪性中皮腫の腫瘍化に関わる分子機構を解明するとともに、治療標的分子の探索の基盤とすることを目的とする。

B. 研究方法

これまでに当研究グループが作成してきたヒトパピローマウイルス E6/E7-hTERT により不死化した正常中皮細胞株に悪性中皮腫関連がん遺伝子を導入し、増殖様式や形態変化を検討する。また、マウスでの造腫瘍性を検討する。

1. *In vitro* 増殖様式の検討方法

リン酸カルシウム法を用いて 293T を標的として、悪性中皮腫関連がん遺伝子である野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1(S127A)を組み込んだプラスミドを用いてウイルス産生(レトロウイルスベクター)させ、標的細胞(正常中皮細胞)

胞株)へ感染させた。YAP1 のレポーター遺伝子として GFP を使用した。

感染させた標的細胞の細胞増殖の観察を Corning 6 well 細胞培養プレートを用いて培養した。4 日毎に継代し、継代時に FACS を行い GFP 陽性細胞の割合を 40 日間継時的に調べた。

2. ノードマウスへの移植方法

上記と同様の方法にて野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1(S127A)を導入した不死化正常中皮細胞を $7.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個/1 か所まで増やし、ノードマウスへ接種。対照群としてレポーター遺伝子である GFP のみを導入した (Empty vector) 正常中皮細胞を接種した。

皮下接種の場合、1 匹につき Empty vector 導入正常中皮細胞を左背側の 2 か所に接種し、野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1(S127A) 導入正常中皮細胞を右背側の 2 か所に接種 (1 匹につき 4 か所接種)。胸腔内へは 1 匹につき 1 か所ずつ、Empty vector・野生型 YAP1・活性型 YAP1(S127A) 導入正常中皮細胞を接種した。

(倫理面への配慮)

本研究は愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得ている。動物実験は愛知県がんセンター動物委員会の許可を得た上でやっている。

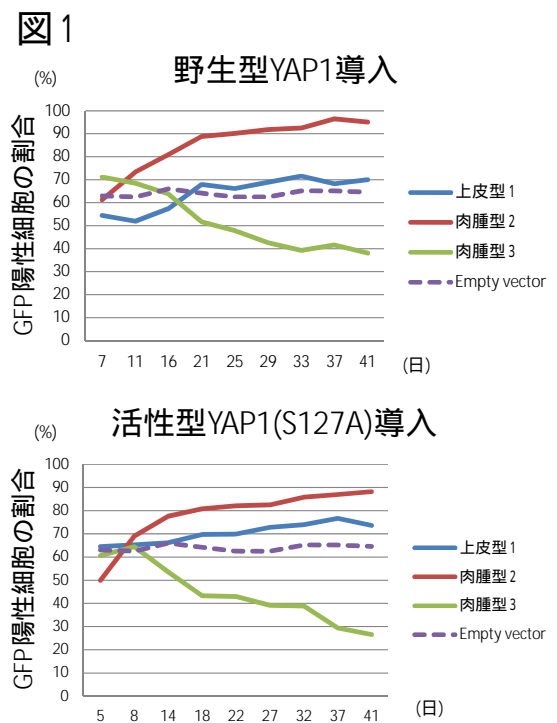
C. 研究結果

同一個体から由来する不死化正常中皮細胞株をクローニングすることにより形態の異なる細胞株をこれまで樹立してきた。それらは、形態学的に上皮型 (HOMC-2 A-7 B-1) (以後: 上皮型 1) と、肉腫型 (HOMC-2 A-7

D-4) (以後: 肉腫型 2) と肉腫型 (HOMC-3 A-4) (以後: 肉腫型 3) に分けられる。まず、上皮型 1、肉腫型 2、肉腫型 3 を対象に、野生型 YAP1 あるいは活性型 YAP1(S127A) 遺伝子を導入し、細胞増殖能における役割を検討した。その結果、

1) in vitro での増殖効果を検討したところ上皮型 1 では増殖促進効果は明確に認められなかったものの、肉腫型 2 では明確に増殖促進効果が認められた。一方、肉腫型 3 では、遺伝子導入のない元の細胞株と比較し増殖能の低下が認められた。

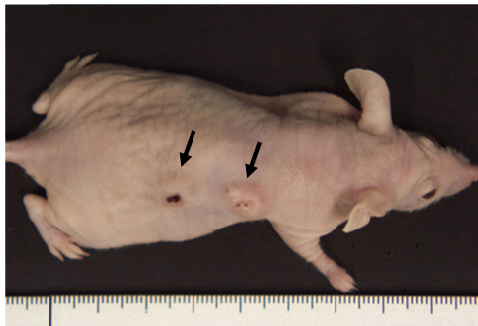
(図 1)



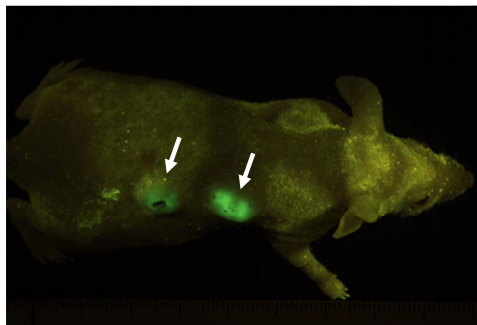
2) 遺伝子導入のない元の細胞株もしくはレポーター遺伝子 GFP のみ導入した細胞株ではノードマウスへの皮下接種にて腫瘍は作らなかったものの、活性型 YAP1(S127A) を導入した上皮型 1、肉腫型 2 とともに腫瘍を形成した (図 2)。

図2

肉腫型2 - 活性型YAP1(S127A)



ヌードマウス



GFP蛍光像

また野生型 YAP1 導入の細胞株においても腫瘍形成を認めている(表1)

表1. ヌードマウスへの腫瘍形成

野生型YAP1導入の細胞株を移植

系統	皮下腫瘍(%)	胸腔内腫瘍(%)
上皮型1	1/4(25%)	—
肉腫型2	4/4(100%)	—
肉腫型3	4/4(100%)	—

活性型YAP1(S127A)導入の細胞株を移植

系統	皮下腫瘍(%)	胸腔内腫瘍(%)
上皮型1	6/8(75%)	2/2(100%)
肉腫型2	6/8(75%)	2/2(100%)
肉腫型3	8/8(100%)	2/2(100%)

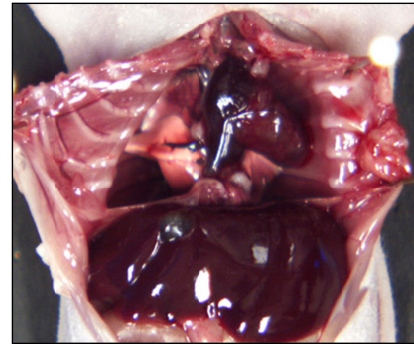
7.5-10x10⁶個の細胞を皮下や胸腔内へ接種。接種後30日目に腫瘍形成を判定。

3) 活性型 YAP1(S127A)を導入した上皮型 1、肉腫型 2、肉腫型 3 を胸腔内接種にしてい

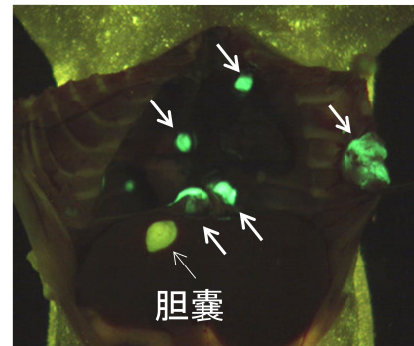
ずれの細胞株でも胸腔内に腫瘍形成を認めた(図3: 太い矢印)

図3

肉腫型3 - 活性型YAP1(S127A)



ヌードマウス(胸腔)



GFP蛍光像

D. 考察

- 1) E6/E7-hTERT により不死化した正常中皮腫細胞株を用いて悪性中皮腫に關与する主要なシグナル伝達系の構成遺伝子である YAP1 を導入することで、in vitro での増殖促進効果が認められ、ヌードマウスで腫瘍を形成したことは、正常中皮細胞から中皮腫を作成できたことを意味する。すなわち、特定の遺伝子導入による悪性中皮腫モデルを作成できたことを意味し、治療実験や他の遺伝子導入による効果などの検定のための基盤ができた。
- 2) 上皮型 1 では in vitro で増殖促進効果が低く、肉腫型 3 では増殖能の低下が認め

られたにもかかわらず、ヌードマウスで腫瘍を形成した。おそらく、in vivoでの腫瘍を取り巻く微小環境が造腫瘍性にかかわっている可能性が示唆される。

今後の方向性：

- 1) 正常中皮細胞を腫瘍化することに成功した。野生型 YAP1 遺伝子と活性型 YAP1(S127A)遺伝子を導入した上皮型 1 と肉腫型 2 は in vitro にて増殖傾向を示しているが、肉腫型 3 は増殖能の低下が見られた。この違いについて検討していく。YAP1 と TEAD4 が複合体を形成すると細胞増殖を誘導するが、YAP1 と p73 の複合体はアポトーシスを誘導する。遺伝子導入した細胞株で p73 や TEAD4 の発現をウエスタンブロット法で発現量を調べ、必要があれば免疫沈降を行う。また内因性 YAP1 と外因性 YAP1 の分布を、免疫染色を行うことで明確にする。遺伝子導入をしていない細胞株と遺伝子導入後の細胞株を比較する(核に多く認められるのか、もしくは細胞質に多く存在するのか)。
- 2) 肉腫型 3 においては in vitro と in vivo において増殖能では対照的な結果が得られた。腫瘍化における YAP1 遺伝子の役割を確認する上で、遺伝子導入していない正常中皮細胞と YAP1 遺伝子導入の正常中皮細胞との間における発現解析だけでなく、in vitro での細胞と in vivo において形成した腫瘍を発現解析で比較することで悪性の因子を明確化する。
- 3) 今後 YAP1 以外の腫瘍関連遺伝子について、今回用いた実験系で評価できるかを検討する。具体的には悪性中皮腫細胞株

の発現解析で発現上昇が強く認められた (CCND1, FOXM1 など) についても、造腫瘍能について検討を始める。

- 4) 今回の研究成果で得られた正常中皮細胞から樹立した悪性腫瘍細胞株は治療実験や腫瘍化の発症機構解明の良い実験モデルとして用いていく。

E. 結論

- 1) 正常中皮細胞を E6/E7-hTERT を用いて不死化した細胞をクローニングすることにより形態の異なる 3 種類の不死化正常中皮細胞株 3 株 上皮型 (HOMC-2 A-7 B-1) と肉腫型 (HOMC-2 A-7 D-4) と肉腫型 (HOMC-3 A-4) を樹立した。
- 2) in vitro において上皮型 (HOMC-2 A-7 B-1) は野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1(S127A) 遺伝子導入による細胞増殖効果は認めなかったが、肉腫型 (HOMC-2 A-7 D-4) は明確な増殖促進効果が認められた。一方、肉腫型 (HOMC-3 A-4) は増殖能の低下を認めた。
- 3) 上皮型 (HOMC-2 A-7 B-1)、肉腫型 (HOMC-2 A-7 D-4)、肉腫型 (HOMC-3 A-4) のいずれでもヌードマウスにおいて腫瘍を形成した。マウスでの微小環境が増殖を支えていると考えられる。
- 4) 今後 YAP1 以外の腫瘍関連遺伝子についても評価可能であることが示唆される実験系を確立できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato H, Yamamoto K, Oki Y, Ine S, Taji H, Chihara D, Kagami Y, Seto M, Morishima

- Y.: Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia*, 26: 166-9, 2012.
2. Chihara D, Matsuo K, Kanda J, Hosono S, Ito H, Nakamura S, Seto M, Morishima Y, Tajima K, Tanaka H.: Inverse association between soy intake and non-Hodgkin lymphoma risk among women: a case-control study in Japan. *Ann Oncol*, 23: 1061-6, 2012.
 3. Liu F, Karube K, Kato H, Arita K, Yoshida N, Yamamoto K, Tsuzuki S, Kim W, Ko Y-H, Seto M.: Mutation analysis of NF- κ B signal pathway-related genes in ocular MALT lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 5: 436-41, 2012.
 4. Yoshida N, Umino A, Liu F, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M.: Identification of multiple subclones in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified with genomic aberrations. *Cancer Medicine*, 1: 289-94, 2012.
 5. Liu F, Yoshida N, Suguro M, Kato H, Karube K, Arita K, Yamamoto K, Tsuzuki S, Oshima K, Seto M.: Clonal heterogeneity of mantle cell lymphoma revealed by array comparative genomic hybridization. *The European Journal of Haematology*, 90: 51-58, 2012.
 6. Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T, Nguyen LT, Tsukamoto Y, Nakada C, Hijiya N, Narimatsu T, Nomura T, Sato F, Nagashima Y, Kashima K, Hatakeyama S, Ohyama C, Numakura K, Habuchi T, Nakagawa M, Seto M, Mimata H, Moriyama M.: Genomic profiling of renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease. *Cancer Sci*, 103:569-76, 2012.
 7. Tsuzuki S, Seto M.: Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, 119: 727-35, 2012.
 8. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Liu F, Kondo E, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. *Exp Hematol*, 40: 1005-15, 2012.
 9. Tsuzuki S, Seto M.: TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) initiates self-renewing fetal pro-B cells in association with a transcriptional program shared with embryonic stem cells in mice. *Stem Cells*, 31: 236-47. 2013.
 10. Umino A, Seto M.: Array CGH reveals clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Methods Mol Biol*, 973: 189-96. 2013.
 11. Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M.: Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One*, 8:

- e56165. 2013.
12. Seto M.: Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Blood*, 121: 1249-50. 2013.
 13. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko Y-H, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Comprehensive gene expression profiles of NK cell neoplasms identify vorinostat as an effective drug candidate. *Cancer Letter*, 2013 in press
 14. Yoshida N, Nishikori M, Izumi T, Imaizumi Y, Sawayama Y, Niino D, Tashima M, Hoshi S, Ohshima K, Shimoyama M, Seto M., Tsukasaki K.: Primary peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified of the thyroid with autoimmune thyroiditis. *Br J Haematol.* 161:214-23, 2013
 15. Taguchi O, Tsujimura K, Kontani K, Harada Y, Nomura S, Ikeda H, Morita A, Sugiura H, Hayashi N, Yatabe Y, Seto M., Tatematsu M, Takahashi T, Fukushima A.: Behavior of Bone Marrow-Derived Cells Following in Vivo Transplantation: Differentiation into Stromal Cells with Roles in Organ Maintenance. *Am J Pathol.* 2013 in press.
2. 学会発表
1. 瀬戸 加大: Genomic alterations in malignant lymphoma and its implication in cancer treatment. The 38th Annual Meeting of Korean Cancer Association. 招請口演. 2012, (COEX Seoul, Korea)
 2. 吉田 稚明, 海野 啓, Liu Fang, 在田幸太郎, 加留部謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性 PTCL, NOS におけるサブクロンの存在. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012, (福島) [口演]
 3. 吉田 稚明, 海野 啓, Liu Fang, 在田幸太郎, 加留部謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性 PTCL, NOS におけるサブクロンの存在. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012, (福島) [ポスター (示説)]
 4. 瀬戸 加大: NK 細胞性腫瘍の機能特異的ながん抑制遺伝子としての FOXP3. 第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2012, (北九州市) [ワークショップ]
 5. 岸本 渉, 錦織 桃子, 田嶋 政治, 山本 玲, 坂井 智美, 都築 忍, 瀬戸 加大, 高折 晃史: マントル細胞リンパ腫のマウスモデルの作製. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌) [ポスター (示説)]
 6. 加留部 謙之輔, 都築 忍, 中村 栄男, 瀬戸 加大: NK 細胞性腫瘍に特異的ながん抑制遺伝子である FOXP3. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌) [ポスター (示説)]
 7. 都築 忍, 瀬戸 加大: CML-BC における AML1/RUNX1 変異と BCR-ABL の協調作用. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌) [ポスター (示説)]
 8. 吉田 稚明, 海野 啓, 劉 芳, 在田 幸太郎, 加留部 謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性の末梢性 T 細胞性リンパ腫、非特異型におけるサブクロンの存在. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌) [口演]
 9. 加留部 謙之輔, 大島 孝一, 瀬戸 加大: 悪性リンパ腫の臨床病理および分子病態の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012,

(札幌) [口演]

10. 都築 忍, 瀬戸 加大: Expansion of mouse hematopoietic stem/progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. 第74回日本血液学会総会, 2012, (京都) [ポスター(示説)]
11. 瀬戸 加大: Molecular characterization of T/NK cell malignancies Masao Seto. 第74回日本血液学会総会, 2012, (京都) [シンポジウム(口演)]
12. Noriaki Yoshida, Akira Umino, Fang Liu, MD, Kotaro Arita, Kennosuke Karube, MD, Shinobu Tsuzuki, Koichi Ohshima, and Masao Seto.: Identification of Multiple Subclones in Peripheral T-Cell Lymphoma, Not Otherwise Specified with Genomic Aberrations. 第54回米国血液学会総会, 2012, アトランタ(米国) [口演]
13. Kotaro Arita and Masao Seto.: New mouse models of B-cell lymphoma using in vitro retroviral transduction system. 第9回日本癌学会・AACR 合同会議, 2013, ラハイナ(米国) [ポスター]

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし