

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

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: 悪性中皮腫はHippoシグナル伝達系に関わる遺伝子が高頻度に不活性化し、その結果、YAP1転写コアクチベーターが恒常的に活性化している。しかし、これまでに見出された遺伝子異常が悪性中皮腫の発症にどのように関わっているのかについての実験的な証明は未だない。本研究は、これらの遺伝子を不死化正常中皮細胞へ導入し、増殖能の変化や造腫瘍能を検討することで、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明らかにすることを目的とした。昨年度、当研究グループが作成した、ヒトパピローマウイルス E6/E7-hTERT 導入により樹立した正常不死化中皮細胞株 3 株を用いて解析を行った。これらの細胞株に YAP1 遺伝子を導入したところ *in vitro* での増殖促進効果を認めた。さらにヌードマウスへ移植することにより *in vivo* においても腫瘍を形成できることを確認した。また、悪性中皮腫細胞株の発現解析で YAP1 の knockdown にて CCND1、FOXM1 などの発現低下が強く認められたため、YAP1 の代わりにこれらの細胞周期を促進する遺伝子の導入を行いその効果を検討した。さらに、不死化していない初代培養の中皮細胞に YAP1 遺伝子を単独で導入し不死化の誘導について検討した。これらの実験では各種の細胞周期関連遺伝子の導入では中皮細胞の腫瘍形成能には不十分であること、また YAP1 単独では初代培養中皮細胞を不死化できないことが明らかとなった。以上の結果より中皮細胞において E6/E7-hTERT と YAP1 の協調作用が中皮腫の腫瘍形成に重要であることが明らかとなった。今回の一連の実験は、正常中皮細胞に対して特定の遺伝子導入により悪性中皮腫モデルを作成できることを意味し、今後、治療開発研究の基盤的ツールとなるものと考えられた。

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。これらの実験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、治療開発研究の基盤的ツールを作出することを目的とする。

B. 研究方法

当研究グループが作成した、ヒトパピローマウイルス E6/E7-hTERT によって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 293T 細胞を標的として、関連がん遺伝子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、中皮細胞株へ感染させた。導入遺伝子は、野生型 YAP1、活性型 YAP1(S127A)、細胞周期関連遺伝子(CCND1、SKP2、FOXM1、MYC)、RNA 干渉として NF2-shRNA、BAP1-shRNA であった。レポーター遺伝子として GFP、Kusabira Orange、hCD8 などを使用した。

細胞増殖の観察は 6 well 細胞培養プレートを用いた。4 日毎に継代し、継代時に FACS を行い GFP 陽性細胞の割合を 30 日間継時的に検討した。

2. ノードマウスへの移植方法

昨年度に引き続き、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、ノードマウスへ皮下移植した。対照群としてレポーター遺伝子である GFP のみ (Empty vector)を導入した不死化正常中皮細胞株を移植した。皮下移植の場合、1 匹につき Empty vector 導入正常中皮細胞を左背側の 2 か所に移植し、遺伝子導入正常中皮細胞を右背側の 2 か所に移植した(1 匹につき 4 か所移植)。

胸腔内移植の場合、1 匹につき 1 か所ずつ、それぞれのベクター導入正常中皮細胞を右側より胸腔内へ移植した。移植後 60 日目に解剖とした。

(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行った。

C. 研究結果

不死化正常中皮細胞株は上皮型 (HOMC-2 A-7 B-1)(以後:B-1)、中間型 (HOMC-2 A-7 D-4)(以後:D-4)と肉腫型(HOMC-3 A-4)(以後:A-4)を用いた(中西の項参照)。

1) 昨年度に続き、ノードマウスにおける造腫瘍性を検討した。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が活性型 YAP1(S127A)を導入した上皮型、中間型ともに腫瘍を形成した(図 1)。

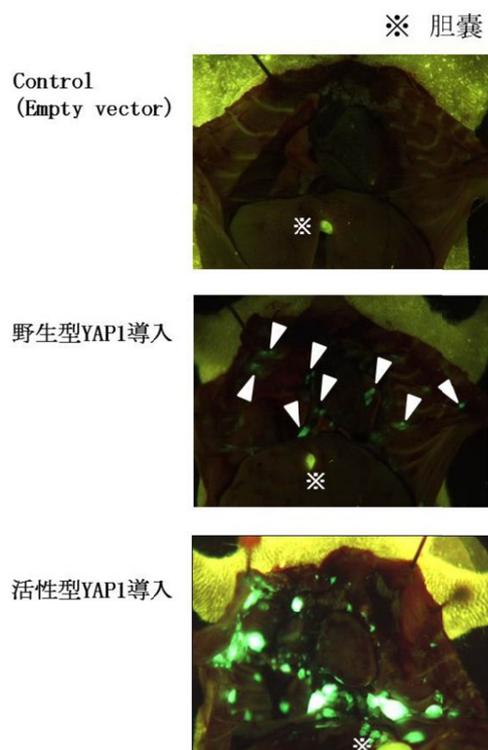


図 1 中皮細胞株の胸腔内移植像

表1

A. 皮下移植における腫瘍形成率

	上皮型	中間型	肉腫型
Control	0/8 (0.0%)	0/8 (0.0%)	0/8 (0.0%)
野生型YAP1	5/8 (62.5%)	8/8 (100%)	4/8 (50%)
活性型YAP1	4/8 (50.0%)	6/8 (75%)	6/8 (75%)

B. 胸腔内移植における腫瘍形成率

	上皮型	中間型	肉腫型
Control	1/2 (50%)	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)
野生型YAP1	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
活性型YAP1	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)

2) 中皮腫細胞株では YAP1 の knock down にて CCND1 などの発現低下が強く認められたため、細胞周期を促進する他の 4 遺伝子 (CCND1、SKP2、FOXM1、MYC) を導入することにより、それらの増殖促進効果の有無を検討した。その結果、MYC を除く 3 遺伝子では in vitro での増殖能の亢進を認めなかった(図 2)。しかし、MYC 導入によってもヌードマウスへの皮下移植による in vivo での造腫瘍能は認めなかった。

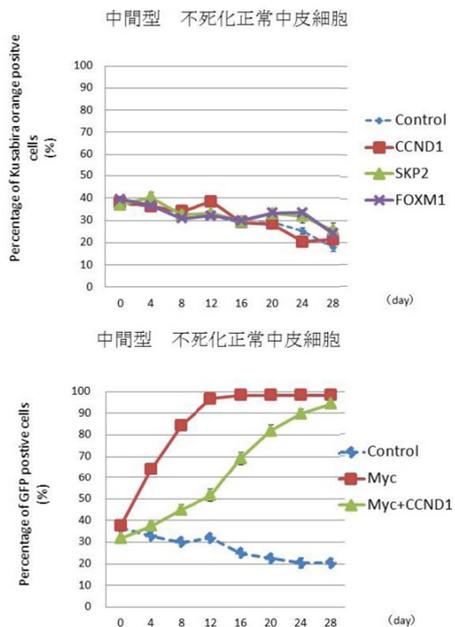


図 2 中間型細胞株 D-4 の増殖能の変化

YAP1 単独にて不死化・腫瘍化が可能かを検討するため、不死化していない初代培養中皮細胞

へ YAP1 遺伝子を導入した。しかし、YAP1 導入株は野生型および活性型ともに Control と同様に継代後、細胞増殖の停止を認めた(図 3)。

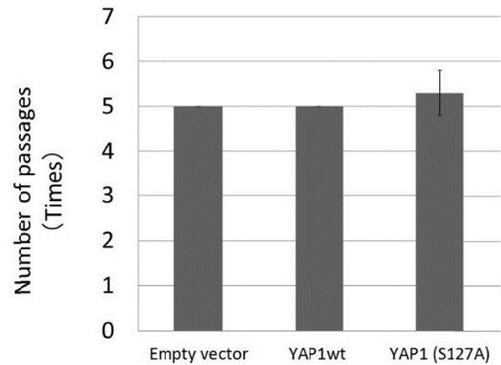


図 3 中皮初代培養細胞への遺伝子導入後の継代回数

3) 中皮腫では NF2 や BAP1 遺伝子の高頻度の不活性化変異が報告されている。RNA 干渉を用いて 2 つの遺伝子発現を knock down することにより、増殖能に及ぼす影響を検討した。その結果、NF2-shRNA では増殖能の促進を認めたが、BAP1-shRNA では増殖能の低下を認めた(図 4)。

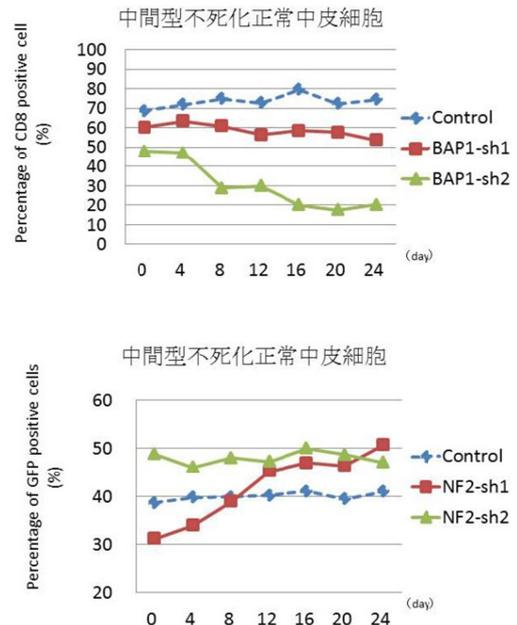


図 4 BAP1、NF2 ノックダウンによる細胞増殖能の変化

さらに in vivo 移植実験では、NF2-shRNA を導

入した中間型不死化中皮細胞株 D-4 で腫瘍形成を認めた(図 5)。

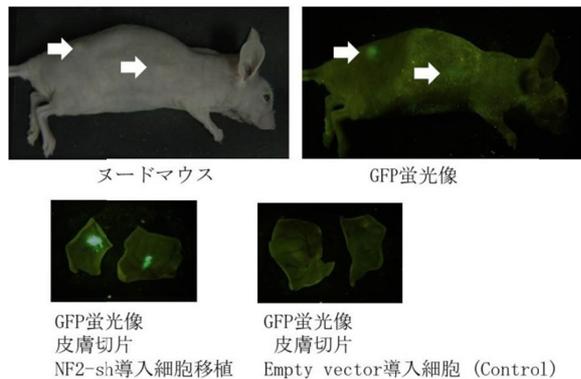


図 5 中間型細胞株への NF2-shRNA 導入

4) BAP1-shRNA 導入での不死化中皮細胞の増殖能の低下は、BAP1 の腫瘍抑制遺伝子として予想される機能と相反するため、YAP1 との協調にて効果が変化するのではないかと予想し、YAP1 を同時に導入して検討を行った。しかし BAP1-shRNA の導入は YAP1 導入による増殖能の亢進を減弱させることが明らかとなった(図 6)。

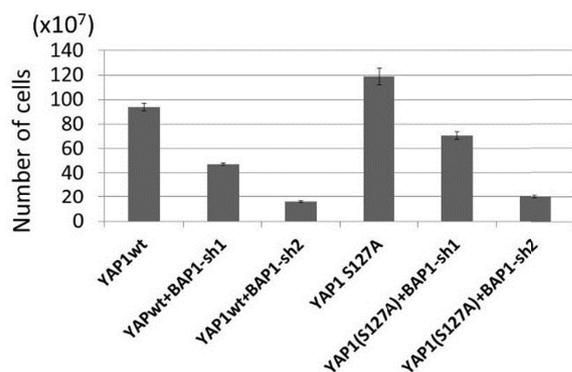


図 6 中間型中皮腫細胞株の細胞数 (Day 19)

D. 考察

1) 悪性中皮腫細胞株に細胞周期を促進する遺伝子 (CCND1、FOXM1 など) を YAP1 に代わり導入することで造腫瘍能を検討したが、それらの遺伝子導入では細胞増殖

能の亢進や造腫瘍能を誘導できなかった。細胞周期関連遺伝子の発現制御を司るマスター遺伝子である YAP1 の恒常的活性化が中皮細胞増殖や造腫瘍能にとって極めて重要であることが明らかとなった。

2) 不死化していない初代培養中皮細胞へ YAP1 遺伝子単独導入にて不死化できるか否かを検討したが、Control と同様に細胞の増殖能の停止を認めた。YAP1 単独では中皮細胞の不死化に不十分であることが明らかとなった。

3) BAP1 は中皮腫の新規がん抑制遺伝子として同定されたが、その増殖能に対する効果は議論が分かれている。不死化中皮細胞株における BAP1 ノックダウン等の検討により、本実験モデル系においては中皮細胞において BAP1 遺伝子の存在がむしろ増殖維持に機能していることが示唆された。

E. 結論

1. E6/E7-hTERT を用いて不死化した正常中皮細胞に対して造腫瘍能を付与するには細胞周期を促進する遺伝子の単独導入では十分ではなく、YAP1 の恒常的活性化が必須であることが明らかとなった。
2. 悪性中皮腫における代表的ながん抑制遺伝子である BAP1 は、肉腫型正常中皮細胞において増殖能への関連は乏しいが、中間型正常中皮細胞では逆に増殖能の維持に寄与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Umino A, Seto M: Array CGH Reveals Clonal

- Evolution of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Methods Mol Biol.* 973: 189-96. 2013.
2. Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Ohshima K, Seto M, Sawada K, Tagawa H: Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 33: 2191-203, 2014.
 3. Arita K, Maeda-Kasugai Y, Ohshima K, Tsuzuki S, Suguro-Katayama M, Karube K, Yoshida N, Sugiyama T, Seto M: Generation of mouse models of lymphoid neoplasm using retroviral gene transduction of in vitro-induced germinal center B and T cells. *Exp Hematol.* 41:731-41.e9. 2013.
 4. Yamamoto K, Tsuzuki S, Minami Y, Yamamoto Y, Abe A, Ohshima K, Seto M, Naoe T: Functionally Deregulated AML1/RUNX1 Cooperates with BCR-ABL to Induce a Blastic Phase-Like Phenotype of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice. *Plos One.* 8:e74864. 2013.
 5. Yoshida N, Oda M, Kuroda Y, Katayama Y, Okikawa Y, Masunari T, Fujiwara M, Nishisaka T, Sasaki N, Sadahira Y, Mihara K, Asaoku H, Matsui H, Seto M, Kimura A, Arihiro K, Sakai A: Clinical Significance of sIL-2R Levels in B-Cell Lymphomas. *PLoS One*;8:e78730 2013.
 6. Kimura H, Karube K, Ito Y, Hirano K, Suzuki M, Iwata S, Seto M: Rare occurrence of JAK3 mutations in natural killer cell neoplasms in Japan. *Leuk Lymphoma*, 55: 962-3, 2014.
 7. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M: Array CGH profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alteration. *Cancer Science* in press.
 8. Kato H, Karube K, Yamamoto K, Takizawa J, Tsuzuki S, Yatabe Y, Kanda T, Katayama M, Ozawa Y, Ishitsuka K, Okamoto M, Kinoshita T, Ohshima K, Nakamura S, Morishima Y, Seto M: Gene expression profiling of Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Science*, 105: 537-44, 2014.
 9. Chihara D, Kagami Y, Kato H, Yoshida N, Kiyono T, Kinoshita T, Seto M: IL2/IL-4, OX40L and FDC-like cell line support the in vitro tumor cell growth of Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia Res*, 38: 608-12, 2014.
2. 学会発表
 1. 吉田稚明, 加留部謙之輔, 宇都宮與, 塚崎邦弘, 今泉芳孝, 平良直也, 鵜池直邦, 海野啓, 在田幸太郎, 片山幸, 都築忍, 大島孝一, 瀬戸加大: Cell cycle 関連遺伝子の異常は慢性型 ATLL の急性転化に関与する. 第 53 回日本リンパ網内系学会総会, 2013, (京都) [口演]
 2. Seto M.: MEET THE PROFESSOR SESSIONS· XV. MALIGNANT LYMPHOMA AS A CONSEQUENCE OF CLONAL EVOLUTION. 第 12 回国際悪性リン

- パ学会議, 2013, (Switzerland) [口演]
3. 都築 忍, 瀬戸加大: インピトロで誘導したT細胞への遺伝子導入によるマウスリンパ腫モデル. 第72回日本癌学会学術総会. 2013, (横浜) (示説)
 4. 勝呂 幸, 田川博之, 竹内一郎, 吉田 稚明, 在田幸太郎, 都築 忍, 瀬戸 加大: リンパ腫を形成するクローン細胞の多様性は、臨床病態を反映する. 第72回日本癌学会学術総会, 2013, (横浜) (示説)
 5. 吉田稚明, 加留部謙之輔, 宇都宮與, 塚崎邦弘, 今泉芳孝, 平良直也, 鵜池直邦, 海野啓, 在田幸太郎, 片山幸, 都築忍, 大島孝一, 瀬戸加大: Cell cycle-related gene alterations are involved in transformation of chronic ATL. 第72回日本癌学会学術総会. 2013, (横浜) [口演]
 6. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M: New mouse model of B-cell lymphoma using retrovirally transduced normal mature B-cells. 第72回日本癌学会学術総会. 2013, (横浜) [口演]
 7. 瀬戸加大: 悪性リンパ腫発症の分子機構. 第72回日本癌学会学術総会. 2013, (横浜) [口演]
 8. 都築 忍, 瀬戸加大: TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) Initiates Self-renewing Fetal Pro-B Cells in mice. 第75回日本血液学会学術集会. 2013, (札幌) (示説)
 9. 吉田稚明, 加留部謙之輔, 宇都宮與, 塚崎邦弘, 今泉芳孝, 平良直也, 鵜池直邦, 海野啓, 在田幸太郎, 片山幸, 都築忍, 大島孝一, 瀬戸加大: Cell cycle-related gene alterations are involved in transformation of chronic ATL. 第75回日本血液学会学術集会. 2013, (札幌) [口演]
 10. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M: New mouse B-cell lymphoma model originated from germinal center. 第75回日本血液学会学術集会. 2013, (札幌) [口演]
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。