

課題番号 2

SRC 経路を介するがん幹細胞性を制御する新規分子の解析

[1] 組織

代表者：藤盛 春奈
(宮城県立がんセンター研究所がん幹細胞研究部)
対応者：安井 明、菅野 新一郎
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：玉井 恵一
(宮城県立がんセンター研究所がん幹細胞研究部)

研究費：物品費 13 万円

[2] 研究経過

【背景と目的】

癌組織は様々な性質の細胞が集まった不均一な細胞集団である。たとえば腫瘍形成の元となるような、幹細胞様の性質を持つがん細胞も存在し、これらはがん幹細胞とも呼ばれ、転移・再発の原因となる。

なかでも肝内胆管癌は有効な治療標的に乏しい難治癌であり、新たな治療標的の開発が望まれる。そこで申請者らは、肝内胆管癌における新規がん幹細胞関連遺伝子を探索し、新たな治療標的の開拓を目指した。

【研究の概要】

実際の腫瘍組織の不均一性を再現するため、まずはヒトの癌微小環境に近い免疫不全マウス皮下へ、胆管癌 PDX を移植した。マウス皮下での継代を繰り返すことで、腫瘍形成能が高い、すなわちがん幹細胞が濃縮された胆管癌 PDX を得た。ここで高発現する遺伝子を、新規がん幹細胞関連遺伝子の候補とし、胆管癌培養細胞を用いてスクリーニングを行った。その結果、マウス皮下での腫瘍形成を制御する遺伝子 X を同定した。遺伝子 X は、がんについてはもとより、哺乳類細胞における機能について全く報告がない。そこで遺伝子 X がどのような分子機序で腫瘍形成を制御するか調べると、遺伝子 X は、チロシンキナーゼである活性化型 SRC のリン酸化に必要な分子であることがわかった。SRC は代表的な癌原遺伝子であり、癌の悪性度を亢進させる分子として知られている。

さらに、共同研究により、遺伝子 X と直接会合する分子を探索したところ、いくつかのがん種で悪性化因子として報告された遺伝子 Y が同定された。遺伝子 Y は、24 残基目のチロシンが SRC によってリン酸化され、機能が制御されることも報告されている。

そこで遺伝子 X、SRC、遺伝子 Y の 3 分子が、物理的に結合し複合体を形成するか、HEK293T 細胞にて共免疫沈降法で調べた。その結果、SRC、遺伝子 Y いずれの分子も、遺伝子 X と共沈降した。さらに、胆管癌細胞株において、遺伝子 X は、会合する遺伝子 Y のチロシンリン酸化にも必要な分子であることも確認できた。以上の結果から、遺伝子 X は、遺伝子 Y、SRC と複合体を形成し、リン酸化を制御し、造腫瘍能の亢進に寄与していることが予想された(図 1)。

なお共同研究では、会合分子の探索を菅野新一郎講師に依頼した。実験の依頼は、安井明教授と菅野新一郎講師と、東北大学加齢医学研究所にて対面で打ち合わせた。依頼後に代表者から細胞検体を送付し、会合分子の同定の一連の実験を依頼した。得られた結果についてメールにて議論し、この結果をもとに、引き続き代表者で実験を行った。また、遺伝子 X の細胞内局在についてもメールで議論し、プラスミドや抗体など実験に必要な物品を郵送にてやり取りした。なお、一連の研究成果は日本分子生物学会でポスター発表し、要旨とポスター原稿について対応者である菅野新一郎講師に助言を頂き、内容を共有した。

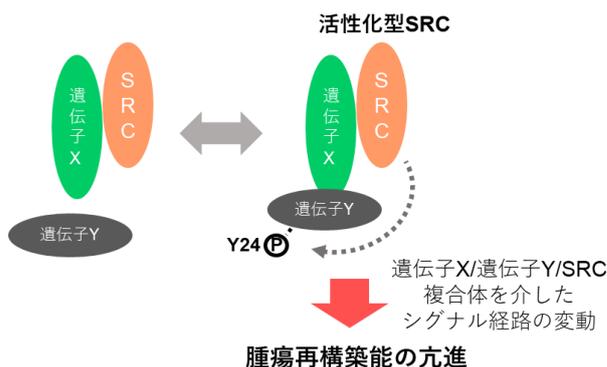


図1. 本研究から予想される遺伝子Xの分子機能

[3] 成果

(3-1) 研究成果

これまで代表者らは、胆管癌において、腫瘍形成能を制御する遺伝子 X を同定し、癌原遺伝子である SRC のリン酸化に必要な分子であることを見出していた。治療標的としての可能性を探るため、まずは遺伝子 X の細胞内での挙動を明らかにすることを試みた。

(3-1-1) 遺伝子 X と会合する分子の探索

SRC はチロシンキナーゼであるため、遺伝子 X の他にリン酸化される分子が物理的に結合している可能性が考えられた。そこで遺伝子 X と会合する分子を探索した。

まずは、FLAG タグが融合した遺伝子 X を過剰発現する、胆管癌細胞株を樹立した。この細胞株について、対応者である菅野新一郎講師に解析を依頼した。細胞溶解液の調整、FLAG-M2 ビーズによる免疫沈降、銀染色による有意なバンドの選定、MS 解析など一連の実験を依頼した。その結果、遺伝子 Y が同定された。遺伝子 Y は、24 残基目のチロシンが SRC によってリン酸化され、また乳がんや肝がんなどいくつかの癌種で悪性化に寄与することも報告されている。遺伝子 X は、活性型 SRC へのリン酸化に必要な分子であることから、この 3 分子は会合し、リン酸化を介して腫瘍形成を亢進している可能性が考えられた。

(3-1-2) 遺伝子 X、SRC、遺伝子 Y 複合体の検出

次に、3 分子が物理的に会合するか調べた。

HEK293T 細胞に SRC、遺伝子 Y、FLAG タグ融合遺伝子 X の発現ベクターを形質導入し、一過的に発現させた。細胞溶解液を調製し、FLAG-M2 ビーズを用いて遺伝子 X を免疫沈降させ、SRC および遺伝子 Y が共沈降するか Western Blot 法にて調べた。

その結果、SRC および遺伝子 Y は共沈降し、3 分子は物理的に複合体を形成することが分かった。

(3-1-3) 遺伝子 X による遺伝子 Y リン酸化制御の評価

3 分子は複合体を形成し、遺伝子 X は活性型 SRC のリン酸化に必要な分子であることから、遺伝子 Y のリン酸化も制御されると予想した。そこで胆管癌細胞株において、遺伝子 X をノックダウンし、遺伝子 Y のチロシンリン酸化を Western Blot 解析で評価した。その結果、遺伝子 X をノックダウンした胆管癌細胞株では、遺伝子 Y のリン酸化が減弱することがわかった。このことから、遺伝子 X は、SRC による遺伝子 Y リン酸化に必要な分子であることが示唆された。

(3-1-4) 遺伝子 X の細胞内の局在

遺伝子 X は細胞内の局在も不明であった。対応者で

ある菅野新一郎講師に、GFP 融合の遺伝子 X 発現ベクターの作製を依頼し、U2OS 細胞にて細胞内の局在解析を実施していただいた。その結果、遺伝子 X は核膜および細胞質内にパッチ上に観察された。遺伝子 X は膜貫通ドメインが予測されたことから、細胞内のオルガネラの膜に局在し機能していることが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究で見つかった遺伝子 X は、これまで哺乳類では機能について全く報告がなかった。共同研究により、遺伝子 X が相互作用する分子としてがん悪性化因子遺伝子 Y が検出され、腫瘍形成に重要な新規遺伝子の同定、およびシグナル経路の解明に貢献できる。

今後は遺伝子 X が形成する複合体を解除することで、胆管癌における腫瘍形成が抑制されるか検証する。

以上のように本研究では、がん生物学的にも新規な知見と、新たな治療標的の可能性を提示できると考える。

[4] 成果資料

藤盛春奈、高橋 渋谷莉恵、菅野新一郎、望月麻衣、進藤軌久、山口壹範、安田純、玉井恵一「胆管癌を進展させる新規遺伝子 X の同定」、第 45 回日本分子生物学会年会、幕張メッセ、2022 年 11 月 (ポスター発表)