

癌転移における新規メチル基転移酵素の機能解析

原 敏文
(医療生命薬学研究ユニット)

研究の背景と目的

1981年以降、日本人の死因第一位は癌である。しかし、癌の検出や治療技術の向上、および新しい癌治療薬の登場により一部の癌では予後が改善され、癌患者の生存年数は伸びる傾向にある。一方で、転移を起こした癌患者の予後は依然として悪い。その原因は、癌転移の全貌が未だ解明されておらず、転移を標的とした有効な癌治療薬が開発されていないためである。これまでに本研究グループでは、スキルス胃癌の腹膜転移細胞モデルを構築し、癌転移の分子機構解明を進めてきた。そのなかで、網羅的遺伝子発現解析の結果からメチル基転移酵素(METTL)遺伝子群が転移能獲得に伴って発現変動することを新たに見出した。本研究では、転移能獲得に伴って発現変動するMETTL遺伝子を同定するとともに、これら遺伝子が癌で果たす役割の解明を目指す。また、METTL遺伝子が癌予後のマーカーとしての有効性や癌治療の標的となる可能性について探る。

実験材料・方法

スキルス胃癌の腹膜転移細胞モデルとして、スキルス胃癌の患者より独自に樹立した細胞株 HSC-44PE および HSC-58 を親株として用いた。また、これら細胞をヌードマウス胃に同所移植することを繰り返し、新たに樹立された 44As3 および 58As9 を腹膜転移好発株とし、これらの親株と腹膜転移好発株をペアとした。

各細胞株からの RNA は、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて抽出した。ヒト正常胃の Total RNA は、Takara Bio より購入した。遺伝子発現レベルは、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR(qPCR)法により調べた。

METTL 遺伝子に対応する shRNA 発現ベクターをトランスフェクションにより細胞株に導入した。shRNA 導入細胞株の生存選択のため、Puromycin 存在下で細胞を培養し、さらに、セルソーター-SH-800 (Sony) を用いて、shRNA 発現ベクターが発する蛍光タンパク質の発現強度の高い細胞集団を分取し、shRNA 高発現導入株を分取した。

細胞増殖能および遊走能は、WST-8 法および Wound-healing アッセイにより調べた。

結果

1. METTL 遺伝子の発現解析

これまでの研究成果で得ていたマイクロアレイ解析の結果から、一部の METTL 遺伝子群が転移能獲得に伴って発現変動することが示唆された。そこで、より詳細な METTL 遺伝子群の発現プロファイルを明らかにするため、次世代シーケンサーのデータ解析を行った。その結果、一部の METTL 遺伝子の発現変動は、次世代シーケンサーの解析データでも再現されることが分かった。興味深いことに、マイクロアレイ解析ではカバーしていない METTL 遺伝子の発現変動も新たに明らかとなった。加えて、未だ細胞内機能の分かっていない METTL 遺伝子が複数存在することも判明した。

そこで、それぞれの METTL 遺伝子に対応するプライマーを設計し、qPCR 法により個別に METTL 遺伝子の発現レベルを検証した。その際に、遺伝子発現量の対象として正常のヒト胃組織から抽出された RNA を用いた。その結果、複数の METTL 遺伝子が正常の

胃組織に比べて有意に発現変動することが明らかとなった。

癌における METTL 遺伝子の重要性について検討するため、胃癌における METTL 遺伝子群の異常頻度および癌患者の予後について公共データベースを用いて解析した。その結果、癌患者における METTL 遺伝子群の異常が一定頻度で起こること、また METTL 遺伝子のうち、METTL7A、METTL9、METTL27 の発現増加は、それぞれ胃癌患者の予後低下と相関することが明らかとなった。

2. METTL 遺伝子ノックダウン細胞株の樹立

METTL 遺伝子が細胞機能に及ぼす影響を明らかにするため、shRNA 発現ベクターを用いた METTL 遺伝子のノックダウン細胞株の樹立を行った。また高いノックダウン効果を得るために、shRNA 発現ベクターからコードされる緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現強度の高い細胞集団を選択分取した。

METTL 遺伝子のノックダウンレベルを調べるため、shRNA 発現ベクター導入株における METTL 遺伝子の発現レベルを調べたところ、METTL7A、METTL9、METTL27 ともに、shRNA 発現ベクター導入株で標的とする METTL 遺伝子の発現が有意に低下していることが分かった。そのため、これら細胞株を METTL 遺伝子のノックダウン細胞株とした。

3. METTL 遺伝子ノックダウン細胞株の機能解析

細胞機能として、まず METTL 遺伝子のノックダウン細胞株(44As3、58As9)の細胞増殖能を検討した。その結果、各 METTL 遺伝子のノックダウン細胞は 44As3、58As9 共に、コントロールに比べて有意な細胞増殖能の変化は見られなかった。

次に、長期細胞生存および単一細胞の腫瘍造成能を調べるため、クロノジェニックアッセイを行った。その結果、METTL9 および METTL27 のノックダウン細胞において、44As3、58As9 細胞共に、長期細胞生存および腫瘍造成能が低下していることが明らかとなった。

最後に、44As3 細胞を用いて細胞遊走能に与える影響を調べたところ、METTL7A では細胞遊走能の変化は見られなかった一方で、METTL9 および METTL27 ノックダウン細胞株は有意な細胞遊走能の低下を示すことが明らかとなった。

考察

本研究では、転移能に獲得に伴って発現変動する METTL 遺伝子が複数見出されると共に、正常の胃組織に比べて顕著な発現変動を示す METTL 遺伝子が見出された。特に、これまで論文報告が無い、もしくは少ない METTL 遺伝子が多く見出されたが、これら METTL 遺伝子の機能を推定することは難しかった。しかし、癌患者の公共データベースの検索により、これら遺伝子の異常は我々が用いる腹膜転移細胞モデルだけでなく、癌患者全体で見つかると共に、一部の METTL 遺伝子の発現が患者の予後とも相関することが明らかとなった。つまり、これら結果は、METTL 遺伝子の発現異常が細胞の癌化や悪性化にとって一般的に重要であることを示唆する。少なくとも、METTL9 および METTL27 のノックダウン細胞が腫瘍造成能や細胞遊走能の低下を示したことから、これら METTL 遺伝子がスキルス胃がんの悪性化において重要な役割を果たす可能性は高いと考えられる。本研究では、METTL9 および METTL27 の基質となる分子の同定には至っておらず、METTL 遺伝子が関与する細胞内分子および関連シグナルは不明であり、その解明が今後の重要な検討課題である。