

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「iPS／アニマルモデル」(細胞初期化技術を応用した革新的治療戦略の確立)
2. 研究開発代表者：国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授 山田泰広
3. 研究開発の成果

本研究では、がん細胞の運命転換を指標とした抗がん剤のスクリーニングプラットフォーム開発を試みた。まず、がん細胞運命転換を反映する最適な遺伝子マーカーを検討するために、明細胞肉腫に認められる EWS/ATF1 融合遺伝子を発現させ誘発したマウス肉腫から樹立した肉腫細胞株の運命転換モデルを使用した。EWS/ATF1 融合遺伝子関連肉腫では、EWS/ATF1 融合遺伝子発現ががん細胞の運命転換を強く抑制することが分かった。がん細胞運命転換を反映する最適な遺伝子マーカーを検討するために、まずは EWS/ATF1 融合遺伝子の発現によるがん細胞の初期化抵抗性メカニズムを検証した。マウス肉腫細胞を用いて EWS/ATF1 融合遺伝子の発現により変動する遺伝子発現変化及びエピジェネティック修飾変化をマイクロアレイ及び次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。その結果、EWS/ATF1 融合遺伝子の発現により、DNA メチル化状態には変化がないものの、ヒストン修飾状態が大きく変動することが明らかとなった。EWS/ATF1 融合遺伝子関連肉腫において EWS/ATF1 融合遺伝子が、抑制性のヒストン修飾による遺伝子応答抑制を介してがん細胞の運命転換を抑制していることが示唆された。がん細胞においても正常体細胞と同様に初期化早期に Nanog 遺伝子が応答すること、MyoD 強制発現による筋分化誘導では Myog 遺伝子が応答することを確認し、それぞれが細胞運命転換を反映する遺伝子マーカーとして使用可能であることを同定した。

さらにヒトがん細胞を用いたスクリーニングプラットフォーム作製の可能性を検証するために、EGFR 遺伝子変異を持つヒト肺がん細胞株、HER2 遺伝子増幅を示すヒト乳がん細胞株に、薬剤誘導性細胞初期化 4 因子を導入した。さらに細胞初期化の早期マーカー遺伝子とし NANOG 遺伝子のプロモーター領域下流に蛍光タンパク遺伝子を導入した BAC (bacterial artificial chromosome) を作製した。作製した BAC を用いてがん細胞への導入を試みたが、遺伝子導入効率が低く安定的な細胞株は得られなかった。そのため、レンチウイルスを用いてレポーター遺伝子を導入した。レポーター導入細胞株を用いて、分子標的薬を陽性コントロールとし、初期化レポーターの反応性を検証したところ、レポーター遺伝子の十分な発現量が得られないことが分かった。最終的に qRT-PCR によるスクリーニング方法に切り替え、スクリーニングプラットフォームとしての有用性を検討した。その結果、陽性コントロール存在下において、NANOG 遺伝子発現を指標とした手法により Z' 値が 0.5 以上を示し、細胞初期化技術が抗がん剤スクリーニングに応用可能であることが確認できた。