

エピジェネティックな可塑性とがん

自然科学研究機構・基礎生物学研究所・幹細胞生物学研究室

坪内 知美

1. 背景と目的

がんは、様々な要因で生じる DNA 上の傷によって生じると考えられてきた。実際に、がん細胞では、一般的に遺伝子変異や染色体異常が見られることが多く、一部のがんにおいては発がんの直接の引き金となっている。しかし、検出される個々の遺伝子変異と発がんの因果関係は、殆どの場合は不明である。また、同種のがん細胞であっても、特定の遺伝子（群）に変異が見られるわけではない。近年の解析から、遺伝子の DNA 配列そのものの変化に加えて、遺伝子発現をつかさどるエピジェネティック制御の乱れが発がんの要因として指摘されている。エピジェネティック制御の乱れは、正常細胞に本来のアイデンティティを失わせ、制御できない細胞増殖を許容する。また、抗がん剤投与などの外的刺激により、容易に細胞形質を変化させる要因となっている可能性もある。本研究では、このようなエピジェネティック制御の乱れとがん細胞の性質の関係を明らかにするために、細胞融合を用い、様々な特質を持つがん細胞の可塑性（細胞アイデンティティのゆらぎやすさ）を評価することを目的としている。特に、血液のがん細胞は、血液の様々な分化段階を反映したものが多数樹立されている。進行性、含まれる遺伝子変異の数、再発性に関しても大きなばらつきがあるがその要因に関しては明らかではない。これらを踏まえ、本研究では血球がんに着目して解析を行った。

細胞融合の実験系では、融合した異なる二種類の細胞のうち、優勢な核の転写プログラムが、もう一方の核に数日以内に誘導される。細胞種によってもその誘導の程度が異なることから細胞内の性質の違いにより特定されていると考えられる。細胞融合後数日間は、二つの核が共有する細胞質内に別々に存在する状態が続く。正常 B リンパ球から樹立されたセルライン（以下、WT-hB と呼ぶ）とマウス ES 細胞（以下、mES）を用いると、この間に血球細胞特異的な遺伝子発現が抑制され、ES 細胞特異的遺伝子の発現上昇が起こる。マウスとヒトの ES 細胞は微妙に転写ネットワークが異なるが、これまでの解析から、ヒト B リンパ球はヒトの ES 細胞の転写ネットワークを獲得していくことがわかっている。ただし、融合後数日以内に検出される発現レベルは、ヒトの ES 細胞と比較すると数桁低く、しかも全ての核に認められるわけではない。また一度発現が認められた核でも、それが維持されるわけではない。従って、この時期の発現は転写ネットワークのゆらぎを検出していると言える。私は、この性質を利用して細胞の可塑性を定量し、がん細胞を評価するパラメーターの一つとして用いることはできないかと考えた。また、将来的に、がんの進行性、ゲノム不安定性、再発性などの情報と関連づけることで、がん診断に貢献できないかと期待している。

2. 方法

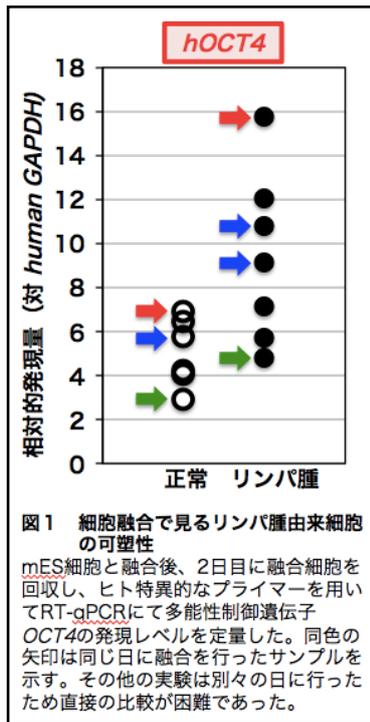
がん細胞アイデンティティの揺らぎやすさを評価するために、国内のセルバンクから、白血病、リンパ腫由来の樹立株を探索し、理研バイオリソースセンターより、TL-1（10歳日本人男児パーキットリンパ腫由来、染色体8番と14番に転座、Epstein Barr Virus非感染）とDAUDI（16歳黒人男性パーキットリンパ腫由来、Epstein Barr Virus感染）の二つのセルラインを購入した。申請段階で使用を予定していた共同研究者の白血病由来セルラインはマイコプラズマ感染が見つかったため使用できなかった。

可塑性の評価には融合には細胞融合の系を用いた(Tsubouchi et. al., Cell 2013)。簡潔に説明すると、それぞれ $0.5-1.5 \times 10^7$ 程度のmES (E14tg2A) と血球がん細胞 (TL-1, DAUDI) またはWT-hBを、ポリエチレングリコール (PEG) により1 : 1の比率で融合した。融合後48時間後に細胞を回収し、RNA抽出を行い、ヒト特異的プライマーを用いてES細胞特異的遺伝子の発現レベルをRT-qPCRを用いて定量し ($\Delta\Delta Ct$ 法)、可塑性の指標とした。本研究では比較的発現レベルの高い*Oct4*, *Nanog*, *Cripto*の3遺伝子をマーカーとして使用した。

3. 結果 研究成果

WT-hB、リンパ腫由来セルラインを融合し、2日後、血球細胞の核からの多能性因子 *OCT4* の mRNA 発現レベルを RT-qPCR を用いて定量した (図1)。融合前のリンパ球での *OCT4* 発現レベルは、検出限界以下であることを確認した。リンパ腫由来セルラインに関しては、DAUDI を5回、TL-1 を2回融合したが、その

両者には現段階では顕著な差はなかったため (TL-1 の相対的 *OCT4* 発現レベルは 12.1 と 10.8) 合わせてプロットした。全体的にばらつきが大きい、リンパ腫由来細胞の可塑性が高い傾向にある。



助成期間中には系の改良に着手した。これまでに融合効率、融合細胞の濃縮のそれぞれに関して成果をあげつつある。

4. 考察 まとめ

本助成期間には、細胞融合を用いた可塑性の評価系の立ち上げとして、リンパ腫由来のセルラインを用いて、多能性誘導効率を調べた。iPS 細胞の樹立効率の低さから、がん細胞は全般的に可塑性が低いとも言われてきた。しかし、細胞融合を用いた今回の結果から、少なくともリンパ腫由来セルラインに関しては、正常リンパ球由来のものよりも高い可塑性を持つことが示唆された。

今回の報告ではリンパ腫由来のセルラインを用いた実験であったこと、また、そのセルラインも二種類に限定されたことから、リンパ腫全体としての一般的な結論を導き出すことはできないが、将来的には、実際の検体から可塑性を評価し、より大きいサンプル数を扱うことで、可塑性ががんの進行性や再発性とのリンクを検証していきたい。

以上の点から、本助成期間中にその基盤を築けたことは私たちにとって大きな前進であると考えている。

5. 発表論文、参考文献

Tsubouchi, T., Soza-Ried, J., Brown, K., Piccolo, F.M., Cantone, I., Landeira, D., Bagci, H., Hochegger, H., Merckenschlager, M. and Fisher A.G. (2013) DNA Synthesis Is Required for Reprogramming Mediated by Stem Cell Fusion. *Cell* 152, 873-883.

Tsubouchi, T. and Fisher A.G. (2013). Reprogramming and the Pluripotent Stem Cell Cycle. *Curr. Top. Dev. Biol.* 104, 223-241.

貴財団の研究助成によりこれまで実行に移せなかったアイデアを遂に実践に移すことができました。また、このことは研究グループの立ち上げにあたり大きな励みとなりました。厚く御礼申し上げます。

ばらつきを抑え、より正確な評価を行うには、多能性を誘導する mES 側の状態を均一に保つ必要がある。PEG を用いた融合実験では、最大同時に 2 セットしか処理できないため、当初は実験当日にコンディションのいい細胞を順次融合していた。しかし、可塑性の指標となる多能性誘導効率は ES 細胞のコンディションにも左右されるため、同じセルラインに関して、異なる日に行った実験では得られる数値が異なった。図 1 中で、同日に行われた実験を、それぞれ赤、青、緑で示した (それ以外の実験は単独、あるいは他のセルラインとの比較で行われた)。同じ色で示される数値を比較することで、WT-hB の値が低い時にはリンパ腫の値も低く、逆に WT-hB の値が高い時はリンパ腫の値も高いが、相対的には常にリンパ腫の値が大きいとわかる。

また、*OCT4* の発現することが、*OCT4* 特異的な現象であるのかどうかを検証するために、リンパ球では発現のない *hNANOG*, *hCRIP1* を合わせて定量し比較すると、*hOCT4* と同じ傾向を示すことがわかった (図 2)。以上より、少なくとも今回扱ったリンパ腫由来のセルラインに関しては、正常細胞と比較して可塑性が高いのではないかとと思われる。

リンパ腫の可塑性が高い分子的背景を理解するには、融合直後から多能性因子の発現に至るまでの核内動態を、詳細に解析する必要がある。また、細胞融合の系を実際に医療の現場で生かしていくためには、より少ない細胞数で評価していく必要がある。これらの点を念頭に置き、

