OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	インターフェロン誘導性遺伝子 GBP の発癌機構・癌細胞浸潤機構における役割の解明
Author(s)	山本, 雅裕
Citation	癌と人. 2014, 41, p. 53-56
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36340
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

インターフェロン誘導性遺伝子 GBP の発癌機構・癌細胞浸潤機構における役割の解明

山 本　　雅 裕*

【はじめに】

IFN γ は約 2000 種類に及ぶ IFN γ 誘導性遺伝子群の発現を誘導する。この中にグアニレート結合タンパク質（GBP）と呼ばれるタンパク質群をコードする遺伝子群が含まれている。GBP と癌との関係について、ヒトの GBP 1 がインテグリン α4 の発現に関与することで血管新生抑制を引き起こし、癌細胞の浸潤・転移に対して負に制御するという報告がある（文献5）。またGBP5が皮膚T細胞性リンパ腫(CTCL)において強く発現していることが報告されており、その機能については不明である。大腸癌と乳癌においては GBP1 が強く発現しており、培養細胞を用いた研究から GBP 1 を癌細胞由来細胞株に過剰発現させることにより増殖が抑制され、血管新生を引き起こす VEGF-A の発現を減らすことにより癌細胞周辺の血管新生が抑制されるとの IFN γ 依存的な抗癌作用に GBP 1 が機能を有することが示唆されている。一方で GBP 1 は多発性神経こう芽種（GBM）において非常に発現していることが報告され、そのメカニズムとしては EGF 受容体のシグナルによるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP1）の発現を誘導することでグリオブラストーマの成長を促進し浸潤を助長しているという癌促進作用があるということが報告されている。さらに卵巣癌、乳癌、非小細胞性肺癌や胃癌などに効果がある抗癌剤であるパクリタキセルによる細胞障害活性に癌細胞が耐性を獲得するのに GBP が役割を果たしているという報告もあることから、癌をむしろ促進させる機能を有するとも考えられている。以上のように、GBP と癌を取り巻く状況については非常に混沌としており、癌細胞での役割については、不明な点が多いのが現状である。

そこで受領者は GBP の癌細胞における役割を検討する目的で、人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 システムを使用して、GBP 欠損癌細胞の作製を試みた。

【結果】

① CRISPR/Cas9 を用いた ATG16L1- 欠損

HAP1 の作製

オートファジー必須分子である ATG16L1 は GBP を発揮するのに重要であることがマウスの細胞で判明していた（未発表データ）。従って、ヒトの癌細胞においても ATG16L1 が GBP の機能に重要であるかどうかを検討する目的で、ATG16L1 欠損 HAP1 癌細胞株を人工ヌクレアーゼ Cas9/CRISPR システムを用いて作製することを試みた。この CRISPR/Cas9 システムを用いることで、まず受領者は ATG16L1 遺伝子のコード領域中で最もセントロメア側に位置する DNA 配列を標的とする gRNA1 と最も遠位に位置する DNA 配列を標的とする gRNA2 を設計した。gRNA1 と gRNA2 を Cas9 発現ベクターとともに HAP1 癌細胞株に遺伝子導入し、クローン化した（図 1 A）。その内 ATG16L1 KO#5 と KO#12 について解析した結果、通常であれば 43kb 離れているために走らないはずの PCR が、gRNA1/gRNA2/Cas9 を導入したクローンでのみ 0.4kb のバンドを生じることから ATG16L1 遺伝子座の gRNA1 と gRNA2 で標的とした部分の欠失が考えられた（図 1 B）。この＃５と＃１２で生じた 0.4kb の PCR 産物の塩基配列を解析したところ、＃５と＃１２ともに gRNA1 の標的配列と gRNA2 の標的配列の中で切断され、結合していること

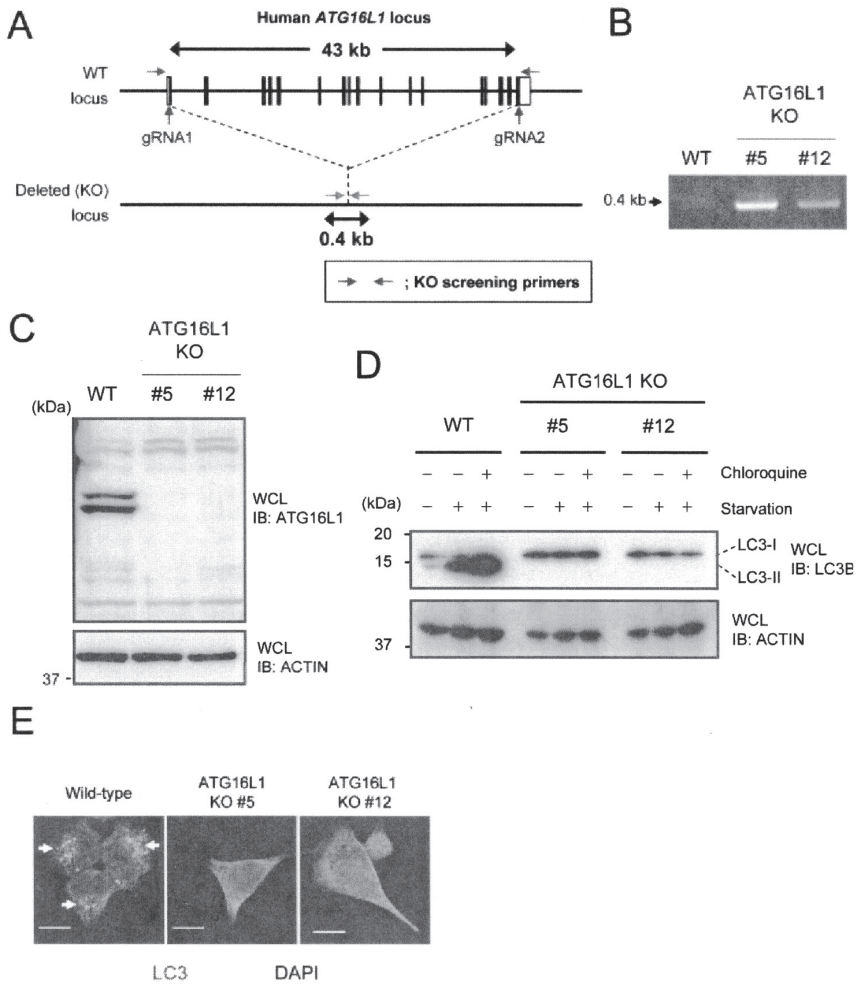

図 1　ATG16L1 欠損 HAP1 癌細胞株の作成と解析

が判明した（図１C）。次に、ATG16L1 のタンパク質が欠失しているかどうかをウェスタンブロット法で検討した（図１D）その結果、＃５と＃１２においては ATG16L1 タンパク質が検出されなかったことから、ATG16L1 欠損細胞であることが確認された。ATG16L1 はオートファジーに必須の分子である。癌細胞株においてもオートファジーに重要であるかどうかを培養液中の血清を抜いた栄養飢餓を引き起こすことにより生じる LC3 の修飾及び LC3 の凝集体の形成を指標に検討した（図１E）。まず野生型細胞では栄養飢餓により LC3-II が生じているが、ATG16L1 欠損 HAP １癌細胞株では＃５と＃１２のどちらのクローンにおいても LC3-II は全く検出されなかった（図１E）。このことから、栄養飢餓による LC3 の修飾反応が ATG16L1 欠損 HAP1 癌細胞株では完全に消失していることが判明した。さらに栄養飢餓による LC3 の凝集体の形成が野生型細胞では検出されるのに対して、ATG16L1 欠損 HAP1 癌細胞株では＃５と＃１２のどちらのクローンにおいても検出されなかったことから、HAP1 癌細胞株においても栄養飢餓による LC3 の凝集体の形成に ATG16L1 が必須の役割を果たしていることが示唆された。HAP1 癌細胞株は ATG16L1 の欠損により増殖性は変わらないことから、癌細胞の増殖能維持に ATG16L1 は関与しないことが示唆された（未発表データ）。

② HAP １癌細胞株における GBP の役割の検討

次にヒト癌細胞における GBP の役割の発揮に ATG16L1 が重要な役割を果たしているかどうかを検討した。マウスの細胞では IFNγ 刺激により GBP が誘導されトキソプラズマ原虫の周囲に蓄積する。ヒトの癌細胞株においても IFNγ 刺激依存的に GBP が原虫の周囲に蓄積することを見出した（図２A）。この GBP の動態に ATG16L1 が関与しているのかどうかを検討する目的で、ATG16L1 欠損 HAP １癌細胞株に原虫を感染させた。その結果、野生型細胞では GBP の蓄積が認められるのに対して、ATG16L1 欠損細胞株ではその蓄積が顕著に減少していた（図２B、２C）。このことから、マウス細胞と同様にヒトの癌細胞株においても ATG16L1 は GBP の動態に重要な役割を果たしていることが示唆された。次に HAP1 癌細胞株における役割を解明する目的で CRISPR/Cas9 システムによる GBP 欠損 HAP1 癌細胞株の作製を試みた（図２D）。ヒトの GBP 遺伝子座は

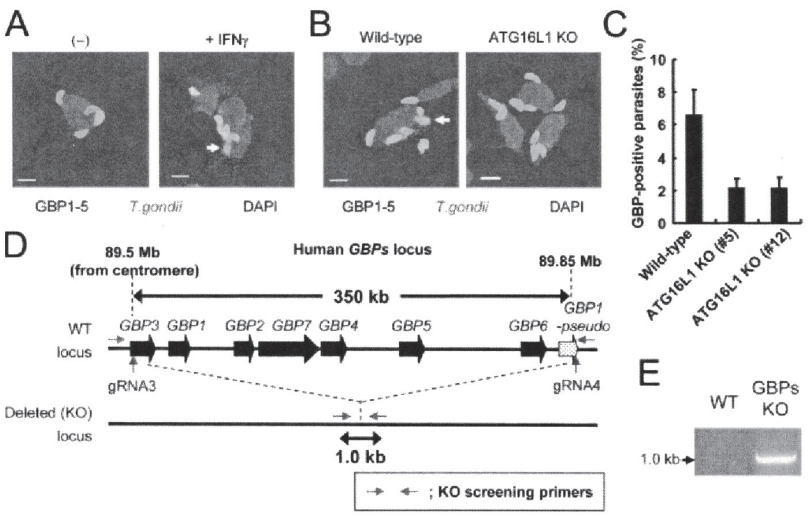

図２　GBP 欠損 HAP1 癌細胞株の作成と解析

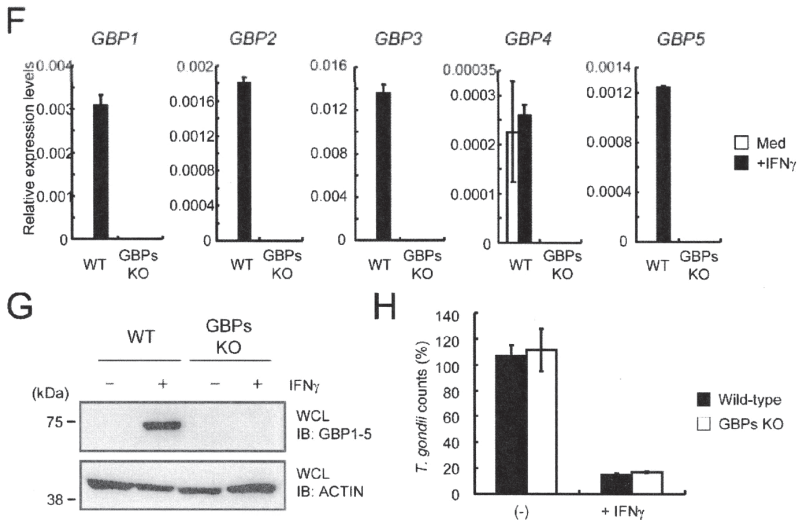

図 2　GBP 欠損 HAP1 癌細胞株の作成と解析

7 個の機能的な GBP と 1 個の偽遺伝子がタンデムに並んでいるクラスターを形成している。セントロメアから近位に存在する GBP3 の特異的な DNA 配列を標的とする gRNA3 を設計、また最も遠位に存在している GBP1 の偽遺伝子座（GBP1-pseudo）の中の特異的な DNA 配列を標的とする gRNA4 を設計し、Cas9 発現ベクターとともに HAP1 癌細胞株に遺伝子導入した。その結果、通常野生型細胞では 350kb 離れているために走らない PCR 反応が、クローン化した細胞において 1.0kb のバンドを生じた（図 2E）。またこの PCR 産物の塩基配列を検討した結果、gRNA3 と gRNA4 により標的とされた DNA 配列のそれぞれの断片が結合された配列を有することが判明した。次に野生型および GBP 欠損 HAP1 癌細胞株を IFN γ で刺激し、RNA から cDNA を調整し、GBP1, GBP2, GBP3, GBP4 そして GBP5 の発現を定量的 RT-PCR で検討した（図 2F）。その結果、GBP 欠損 HAP1 癌細胞株において全ての GBP の mRNA の発現が見られないことを確認した。さらに GBP に対する特異的な抗体を使用してタンパク質レベルで GBP の発現を検討したところ、野生型細胞では IFN γ 刺激により GBP の発現が強く誘導されるのに対して、GBP 欠損 HAP1 癌細胞株においては GBP の発現が全く認められなかった（図 2G）。このことから、HAP1 癌細胞株において GBP を欠損させることができた。作成した GBP 欠損 HAP1 癌細胞株は野生型細胞株と同様の増殖性を有することから、癌細胞の増殖に GBP が関与することはないと考えられる（未発表データ）。さらに野生型細胞と同程度に、GBP 欠損 HAP1 癌細胞株においても IFN γ 刺激による原虫の増殖が阻害されることから、癌細胞株におけるある種の IFN γ 応答は正常に起きることが示唆された（図 2H）。

【謝辞】

本研究は、公益財団法人大阪癌研究会のご支援の下に行われた研究である。

＊大阪大学大学微生物病研究所
平成 24 年度一般学術研究助成金交付者