

研究報告書

平成30年度：A課題

令和2年3月31日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

住所 岡山県岡山市北区鹿田町 2-5-1

研究者氏名 小阪 美津子



(研究課題)

ヒトがん細胞に発現する OCT4 アイソフォーム蛋白質の機能解明

平成31年3月1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

がん転移の予測、超早期診断の鍵となる分子は未だ特定されていない。最近我々は OCT4 (Octamer binding factor4)発現細胞が、ヒトがん細胞集団の悪性度に深く関与し、OCT4 がその候補分子となる可能性を先行研究で見出した (*Stem Cells*, 36(9), 2018)。

ヒト OCT4 遺伝子には多種類の偽遺伝子やバリエーションも存在することから、特異的検出が困難であり真偽不明な情報も未だに多く存在する。我々はすべての偽陽性を排除できる特異的プライマーセットを用いた RT-PCR 法を用いて、転写産物の網羅的同定を行った結果、OCT4A 以外に OCT4B バリエーションが多種類存在することを明らかとなった。さらに、それらの mRNA から OCT4A タンパク質以外に OCT4B(B265), OCT4B164(OCT4C)の2種類のアイソフォーム蛋白質が産生されることが判明した(図1)。しかしながら、これらの蛋白質のヒトがん細胞内での機能は未だ不明な点が多い。本研究ではヒト OCT4 の機能解明を目指して以下の解析を実施した。

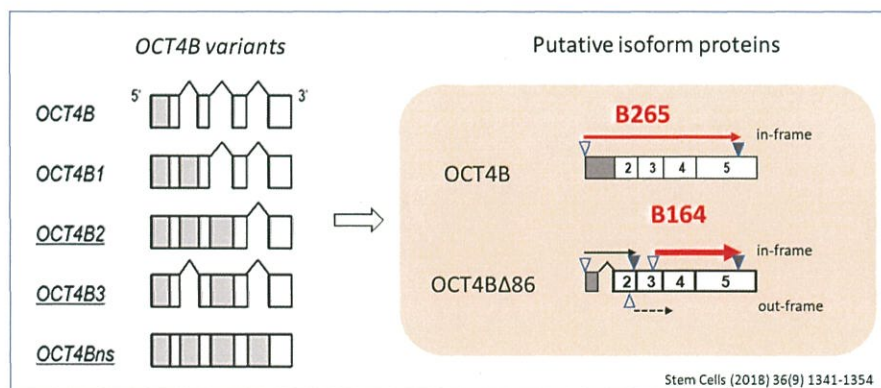


図1 がん細胞で発現するヒトOCT4B variantsとその翻訳産物の推定

1) ヒトがん細胞における内在性 OCT4 蛋白質アイソフォームの同定

OCT4 発現の認められたヒトがん細胞株を用いて CRISPR-Cas9 系によるゲノム編集を行い (図 2)、OCT4 遺伝子に FLAG タグをノックインした細胞を作製し内在性タンパク質の同定を試みた。その結果、ヒトがん細胞には OCT4A と OCT4B164 (OCT4C と名付けた) タンパク質が主に存在することを初めて確認した (図 3)。

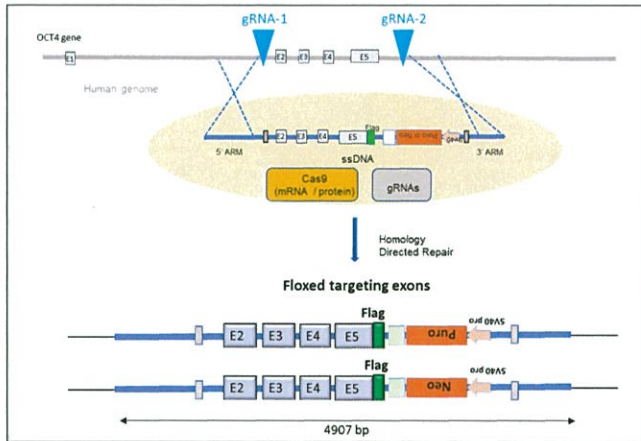


図2 CRISPR-Cas9によるOCT4ゲノム編集

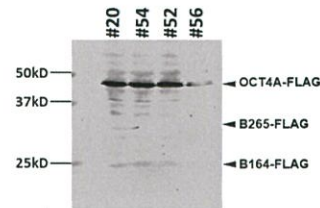
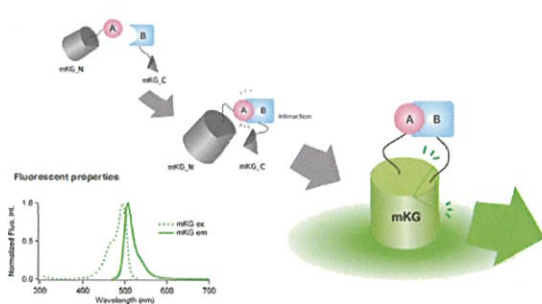


図3 ノックインされたヒトがん細胞株 (#20, #54, #52, #56) における OCT4 内在性タンパク質の検出
抗 FLAG 抗体を用いて Western blot 法にて解析した

2) B265(OCT4B)および B164(OCT4C)の転写調節活性の調査

OCT4A が転写調節活性を示す reporter 配列を用いて dual luciferase 法にて OCT4B, OCT4C の活性の有無を明らかにした。さらに共存下で OCT4A の活性に影響をおよぼす効果を調査した結果、OCT4B と OCT4C は異なる作用を示すことを確認した。

3) OCT4A, OCT4B, OCT4C の細胞内局在と相互作用の調査



(図は MBL 製品サイトから転載)

局在を変化させる可能性があることを確認した。以上の結果から、OCT4B および OCT4C は OCT4A と相互作用し OCT4A の活性を修飾する役割をもつことが示唆された。

CoralHue® Fluo-chase 系 (右図 MBL, No.AM-110 0M)を用いて OCT4A, -B, -C の 3 種類のアイソフォームタンパク質の相互作用の有無と細胞内局在を調査した。

まず、各種 DNA コンストラクトを作成し、ヒト乳がん細胞株 MCF7 に導入し、ヘテロ複合体の形成を蛍光の有無により確認した。その結果、各アイソフォームタンパク質は細胞内でヘテロダイマーを形成することが明らかとなった。さらに OCT4C は OCT4A の細胞内

4) ヒト腫瘍検体を用いた発現解析

ヒトのがんの発生・進展における OCT4 の関与を調査するために、初期 (stage I) の肺腺がん腫瘍組織を用いて、OCT4A および OCT4B-variants の発現解析を行った。OCT4A は 58 検体中 42 例、OCT4B-variant は 58 検体中 49 例に発現していた。またいずれの発現もなかった 16 検体においては、病理所見においても微小浸潤は認められず再発した例も無かった。一方、OCT4A および OCT4B variant いずれも高発現の検体には再発患者の全例 (n=3) が含まれていた。この結果から、OCT4 遺伝子産物は、ヒトがんの進展に深く関与する可能性が得られた (*BMC cancer*, 掲載予定)。

(4の研究は岡山大学倫理委員会承認 (No. K1612-023) を得て岡山大学病院呼吸器外科との共同で実施した。)