

研究報告書
令和3年度：A課題

R5年 4月 28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 熊本大学国際先端医学研究機構

住 所 熊本県熊本市中央区 2-2-1

研究者氏名 千場 隆

(研究課題)

網羅的オープンクロマチン領域解析に基づくLY6Dを介した肺がん進展機構の解明

令和4年 2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。

【研究の背景と目的】

がん幹細胞は、高い腫瘍形成能や浸潤・転移能、および薬剤に対する抵抗性を有し、がんの進展や再発に関わっていることが知られている。Ly6 ファミリー分子は、その多くが GPI アンカー型膜タンパクとして主に血球系の細胞表面に発現しているが、これまで Ly6 ファミリー分子のがんにおける意義は不明であった。しかし近年の研究から、Ly6 ファミリー分子はがんの進行に関わることが明らかとなってきた。申請者らは原発性肺癌手術検体において、Ly6 ファミリーの一員である LY6D の発現を免疫組織学的に評価した結果、LY6D の発現が肺がんの術後再発予後不良因子であることを見出している。さらに、LY6D 遺伝子をノックダウンすることで肺がん細胞の 3 次元培養下におけるコロニー形成能が著明に阻害されることを明らかにしている (Semba et al., *Cancers* 2020)。これらの知見は、LY6D が非小細胞肺癌におけるがん幹細胞マーカーである可能性を示唆する。しかし LY6D が、がん細胞の幹細胞性を維持するメカニズムは全く不明である。よって本研究は、LY6D が制御する細胞内シグナルを明らかにし、LY6D を介した肺がんの進展機構を解明することを目的として行なった。

【方法と結果】

1. ヒト肺癌組織における LY6D の発現

LY6D の発現細胞を詳細に確認するべく、原発性肺癌手術検体のパラフィン切片を用いて蛍光多重免疫染色を行なった。その結果、p63 陽性の癌細胞に特に LY6D が発現していることを見出した。

2. p63-lineage tracing mouse の導入

上述の結果をふまえ、我々は優れた細胞特異性をもつ Dre-Rox-Stop-Rox システムを用いた p63 lineage tracing マウスモデルを構築した (Rosa26-RSR-tdTomato-2A-DTR:Trp63-DreERT2)。本マウスはタモキシフェン誘導性に p63 陽性細胞でのみ tdTomato を発現するようになり、以降は細胞分裂や分化を繰り返してもその系譜を追跡できるため、p63 陽性細胞の増殖・分化の様子を観察するのに極めて有効なモデルである。

3. Ly6d-EGFP mouse の作製

LY6D の生体における機能や役割を詳細に研究するために、LY6D を発現している細胞が EGFP によって標識され、任意のタイミングで LY6D をノックアウトすることができる遺伝子改変マウス Ly6d-EGFP を CRISPR-Cas9 技術を用いて作製した。マウスの作製は東京女子医科大学実験動物研究所の本田浩章教授との共同研究のもと行なった。マウス Ly6d 遺伝子の Exon 2 上流および Exon 3 下流に gRNA を設計し、鋳型となる ssODN (3' arm-FLT-Ly6d-IRE S-EGFP-FLT-5' arm) とリコンビナント Cas9 タンパクとともにマイクロインジェクションを行った。産仔の尾から DNA を抽出・精製してジェノタイプングと挿入遺伝子領域のシーケンスを行い、設計どおりのマウスが得られるまでマイクロインジェクションを繰り返した。その結果、目的の遺伝子型をもったマウス産仔を得た。

【考察と今後の展望】

p63 陽性腫瘍細胞に Ly6d が頻繁に発現することを見出した。p63 は主に肺の幹細胞の一つである基底細胞のマーカーとして知られており、p63 陽性基底細胞由来の腫瘍細胞に LY6D が発現している可能性が考えられた。今後は作製したマウスの交配を進め、得られたマウスからの肺細胞分離、遺伝子編集を通じて、LY6D を発現する腫瘍細胞の起源を探索する予定である。また、LY6D のノックアウトにより変化するオープンクロマチン領域の解析を行うべく、ATAC-seq の条件検討を進めている。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました公益財団法人がん研究振興財団に心より感謝申し上げます。