

論文の内容の要旨

論文題目 Analyses of genes involved in cell migration, tumor invasion and metastasis
(和訳 細胞運動、浸潤、転移関連遺伝子の解析)

氏名 須山 英悟

がん細胞は様々な遺伝子変異が蓄積して悪性癌に至る。その変化には細胞増殖異常、分化異常、細胞の不死化、血管新生能の獲得など様々あるが、治療にとって最も深刻な変化の1つが“転移能の獲得”である。転移はがん細胞が元の腫瘍から離脱し、血管などをつたって体の他の部位に移動し新たな腫瘍を形成することで、これまでに様々な転移に関与する因子・遺伝子とその治療標的候補としてあげられてきた。しかしながらがん細胞特異的な治療標的となる決定的な因子はまだ得られていないのが現状であり、また、がん転移は様々なステップが複合して成立する複雑な現象であり、その分子メカニズムにはまだ明らかにすべき事象も残されている。

DNAの2重らせんモデルがJames WatsonとFrancis Crickによって発表されてから50年が経過した。そして生命科学の発展における1つの集大成とも言うべき国際的なヒトゲノムプロジェクトにより解読不能な1%を除くヒトゲノムのDNA塩基配列の解読完了が宣言された。現時点で3万2615個とも推定されるヒト遺伝子について、生体内での機能やそのネットワークを高効率に解析することが今後の生命科学研究において重要な鍵となる。すなわち疾病などに関わるいわゆる“キー遺伝子”をピックアップする技術、また遺伝子機能の迅速で効率の良い解析技術は、人が抱える様々な問題の解決糸口を提起する事ができる可能性をも秘めている。ハンマーヘッド型リボザイム(以下リボザイム)はRNA切断活性を持つRNA分子であり、基質となる(切断される)RNA分子と結合し、切断する。触媒部位と基質認識部位からなるリボザイムはその基質認識部位と基質RNAが塩基対形成により結合するために、様々な配列を持ったRNAの中から基質と成りうるRNAを配列特異的に切断することが可能である。この特性からリボザイムを細胞内で働かせて目的遺伝子のmRNAを特異的に切断させ、タンパク質へ翻訳させないことにより遺伝子発現を抑制させる試みが行われ成功を収めてきた。特異的遺伝子発現抑制を目的とする場合、目的遺伝子にあわせてリボザイム基質認識部位の配列を設計するが、この部位をランダム化したリボザイムのプールは、様々な配列を持つ遺伝子mRNAに対応するライブラリーとなり得る。ライブラリーを細胞群に作用させれば、様々な遺伝子がそれぞれ特異的に発現抑制された細胞集団を作り出すことが可能となり、その細胞群中に何らかの

表現型が変化した細胞が出現した場合、表現型の変化を指標にそのリボザイムを単離することが出来る。また、得られたリボザイムの配列から、標的とする遺伝子の断片的な配列情報を手にすることになる。これはリボザイムの基質結合部位の配列が標的遺伝子の mRNA と相補的な配列をとるからである。この遺伝子の配列情報を元に DNA データベースを検索して、リボザイムの標的遺伝子=細胞の表現型の変化に関わる遺伝子の同定が可能となる。本研究では主にリボザイムライブラリーを用いてがん転移に関与する遺伝子の探索を行い、治療標的因子の同定も視野に入れたがん転移の分子メカニズム及びその遺伝子ネットワークの一端を明らかにすることを目的とした。

がん転移が成立する際、特にがん細胞が基底膜や周辺組織などへの浸潤の際に細胞運動は必須なステップの1つである。これまでの研究から、高転移性の細胞は運動性が顕著に上昇している事が知られており、運動性を低下させれば転移も抑制されることが期待できる。さらに、細胞増殖や細胞死（アポトーシス）などを治療標的にするよりも正常細胞への毒性が低いという利点も予想される。そこでリボザイムライブラリーを用いて、細胞運動に関与する遺伝子の同定を試みた。運動性の高い悪性ヒト由来 HT1080 fibrosarcoma をリボザイムライブラリーで処理した後、ケモタキシスアッセイを行った。ケモタキシスアッセイは細胞運動能の測定に頻用される実験法1つであり小孔を有するフィルターを装着した2層培養槽（ポイデンチャンバー）を用いたものである。通常では HT1080 細胞は誘因物質にひかれて培養槽上層からフィルター小孔を通過して下層へと移動を行う。ここで細胞運動・下層への移動を阻害するリボザイム、すなわち細胞運動に働く遺伝子を標的とするリボザイムを導入された細胞は移動できずに上層に残る。この残存細胞を回収し、リボザイムを単離した。さらに得られたリボザイムの塩基配列を決定し、DNA データベースを利用してその標的遺伝子を同定した。細胞運動には細胞骨格フィラメントの1つであるアクチンの再構築が必要であるが、解析の結果、アクチン骨格制御に関与することが知られている *ROCK1* 遺伝子に対するリボザイムなどが同定された。*ROCK1* に対するリボザイムは、*ROCK1* と相同性の高い遺伝子である *ROCK2* の発現に影響することなく *ROCK1* の発現を抑制し、HT1080 細胞の *in vitro* での運動、浸潤を阻害したが細胞増殖は阻害しなかった。遺伝子同定のみならず、ライブラリーから得られたリボザイムを用いてこのような機能解析も併せて行った。また、解析がなされていない機能未知の遺伝子を標的とする細胞運動阻害リボザイムも得られている。このような同定された候補遺伝子の機能解析を詳細に行うことで、細胞運動における遺伝子ネットワークの一端が明らかとなり、また癌細胞の運動を抑制することにより転移抑制につながる治療標的因子を示唆することが出来ると期待している。

浸潤はがん細胞が周囲の正常組織へと侵入することで、悪性腫瘍の最も特徴的な現象の1つである。小孔の開いたフィルターで仕切られた2層培養槽を用いるケモインベージョンアッセ

イは、細胞の浸潤能を測定する擬似的な実験として頻用されている。フィルターに細胞外マトリックス (ECM) 成分をコートし、細胞を上層に、誘因物質を下層に注入すると細胞はケモタキシス (誘因物質を感知し、その方向へ移動する現象) により下層へと向かうが、移動の際に ECM を分解し小孔を通過する必要がある、この過程が擬似的な浸潤ステップとなる。ECM のコート量のある程度増してやると低浸潤性細胞であるマウス線維芽細胞細胞株 NIH3T3 は ECM のバリアを突破できずに上層にとどまる。そこで NIH3T3 細胞をリボザイムライブラリーで処理し、アッセイを行った。リボザイムの効果により“浸潤”に成功し下層へと移動した (浸潤を抑制する遺伝子の発現を阻害することにより、細胞の浸潤を昂進させるリボザイムが導入された) 細胞からリボザイムを単離した。そしてデータベース検索によりリボザイムの標的となった浸潤関連遺伝子同定を行った。その 1 例として *Gem GTPase* を標的とするリボザイムが同定された。*Gem GTPase* は細胞運動に働くアクチン骨格制御系の Rho-ROCK 経路において負に働く因子であることが最近の研究から明らかになった遺伝子である。細胞運動は浸潤の際に必須な現象であり、実際に *Gem GTPase* を標的とするリボザイムは細胞運動を昂進することにより NIH3T3 細胞の浸潤能を促進していることが明らかとなった。上記の細胞運動関連遺伝子の探索においても *ROCK1* を標的とするリボザイムが得られたことも併せ考えると、Rho-ROCK 経路は低分子阻害剤や関与する遺伝子の発現を調節することによって人為的に癌細胞の振る舞いを制御しやすい経路であることが予想される。また *Gem GTPase* を標的とするリボザイムとは逆に細胞の運動性に影響を与えずに浸潤能を促進するリボザイムなど興味深いものも得られている。この他既知遺伝子、また機能未知の遺伝子を含めて複数の遺伝子が浸潤に関与する候補としてあげられた。さらにリボザイムライブラリーを用いたがん転移関連遺伝子の探索として、マウス個体を用いた経尾静脈転移実験モデルを利用して低転移性がん細胞の転移能を亢進するリボザイムの単離、及びその標的遺伝子を同定する試み、すなわちより *vivo* に近い状態での癌転移関連遺伝子の探索も併せて行った。

リボザイムライブラリーを用いた遺伝子探索は、研究対象の細胞にライブラリーを効率よく導入することができ、また効果のあるリボザイムの影響による細胞の表現型の変化を検出し、変化した細胞を単離することが出来れば原理的にどのような実験系においても適用可能であると考えられる。がん細胞は悪性化、転移能の獲得までに様々な悪性形質を獲得し、その表現型を変化させる。汎用性の高いリボザイムライブラリーによる遺伝子探索は多様なアプローチが必要とされる癌研究において有用なツールとなりうると思われる。本研究で明らかとなった知見と様々な癌研究によって得られた知見を照らしあわせることによってがん転移の分子メカニズム及びその遺伝子ネットワークに対する理解が深まると期待している。