

NAIPおよびcIAP-1 mRNAによるがん幹細胞探索

吉本 秀隆^{*1}, 久富 寿^{*2}

Genetic screening of cancer stem cells by fluorescence *in situ* hybridization

Hidetaka YOSHIMOTO^{*1}, Hisashi HISATOMI^{*2}

(Received March 10, 2008)

1. 背景

近年, がん形成は幹細胞から形質転換したがん幹細胞を起源とすると考えられている¹⁾。1997年のDickら²⁾による白血病幹細胞の発見後, 乳がんあるいは大腸がんなどの固形腫瘍においてもがん幹細胞が同定されている³⁾。がん幹細胞の発見は, がん治療や治療後の再発に対する考え方の転換期となった。抗がん剤治療や放射線治療によりがん細胞が死滅しても, 治療終了後に残存したがん幹細胞からがん細胞が分化し, 数年後に腫瘍を再構築すると考えられる。また, 術後に残存したがん幹細胞の他組織への移動に起因してがんが転移する可能性もある。したがって, すべてのがん細胞を死滅させるためには, がん幹細胞を特定し, がん治療の標的とする必要がある。がん幹細胞を標的とした治療法開発のため, がん幹細胞の同定が必要である。

がん幹細胞の特徴の一つとして, 細胞死を抑制する抗アポトーシス能が挙げられる。近年, 生体の恒常性維持や細胞死および発生調節へのヒト抗アポトーシスタンパク質(Inhibitor of apoptosis; IAP)の関与が報告されており⁴⁾, IAP遺伝子を高発現するがん細胞はがん幹細胞である可能性が高い。この性質を利用することにより, がん幹細胞を特異的に検出できる可能性がある。

現在, 8種類のヒトIAPが同定されており, これらはfamilyを形成している。胎児細胞および多種のがん細胞はヒトIAP familyを高発現し, 成熟細胞は極微量に発現する。

本研究では, 8種類のヒトIAPの中から比較的発現量が多い, Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein (NAIP)⁵⁾およびcellular Inhibitor of Apoptosis Protein (cIAP-1)⁶⁾に注目した。NAIPは3種のBaculovirus IAP repeat (BIR)ドメインを有し, apoptosisの最終調節因子であるcaspase-3および-7を阻害する。cIAP-1は3種のBIRドメイン, caspase recruitment

domainおよびRINGドメイン構造を有し, アポトーシス誘導に関与するcaspase-3, -7および-9を阻害する。本研究では, NAIPおよびcIAP-1 をがん幹細胞探索の指標として用い, 肝臓がん組織における両mRNAの発現局在をfluorescence *in situ* hybridization (FISH)法により確認した。

2. 材料と方法

ヒト肝臓がん由来細胞株Huh-7細胞からRNAを抽出し, cDNAを合成した。合成したcDNAにPCR溶液 (10×Paq 5000TM Reaction Buffer, 2.5 mM d(A,G,T)TP (TAKARA BIO), 1.0 mM Cy5-dCTP (GE Healthcare), 30 pM Forward Primer, 30 pM Reverse Primer, 0.8 U Paq5000TM DNA polymerase)を添加し, 94°C/30秒, 55°C/35秒, 72°C/30秒を1サイクルとしたPCR反応を50サイクル行った (2720 サーマルサイクラー)。反応終了後, 蛍光色素を修飾したPCR増幅産物を10% ポリアクリルアミドゲルに供し, 電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色したPCR増幅産物をUVトランスイルミネーターによって確認した。

脱パラフィン処理した肝臓組織の連続切片を100 mM グリシン含有PBSにて洗浄した。0.3% Triton X-100 (Wako) 含有PBSにて洗浄後, プロテナーゼK含有TEバッファー(100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0)にてインキュベートした。4% ホルムアルデヒド含有PBSにて後固定し, PBSにて洗浄した。0.25% 酢酸含有0.1M トリエタノールアミンバッファーにて37°C, 5分間インキュベート後, 50% (v/v) ホルムアミド含有4×Saline Sodium Citrate溶液 (SSC, 1×SSC: 150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム; pH 7.0)にて37°Cで1時間インキュベートした。蛍光プローブを94°Cで変性後, ハイブリダイゼーション溶液 (40% ホルムアミド, 10% デキストラン硫酸, 1×Dehardt' 溶液 (0.02% Ficoll (AppliChem), 0.02% polyvinylpyrrolidone (AppliChem), 0.2 mg/mL ウシ血清アルブミン), 4×SSC, 10 mM Dithiothreitol, 1 mg/mL サケ

^{*1}: 工学研究科応用化学専攻博士前期課程

^{*2}: 物質生命理工学科准教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

精子DNA)を添加し、37℃で20-50時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション反応後、2×SSCおよび1×SSCで洗浄後、NTEバッファー (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)にてインキュベートした。0.1×SSCにて洗浄後、MitoTracker[®] Green FMを添加し、37℃、1時間インキュベートした。インキュベート後、注射用蒸留水で洗浄した。洗浄後、細胞形態および遺伝子発現を共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SL, Leica)にて観察した。

3. 結果

がん幹細胞探索に用いる*NAIP*および*cIAP-1* mRNA 由来Cy-5ラベルプローブを合成した。合成に成功したプローブを用い、肝細胞がん組織における両mRNAの発現局在をFISH解析したところ、*NAIP*および*cIAP-1* mRNAの細胞質局在が確認され、両mRNAを高発現する細胞の点存在が確認された (Fig.1)。

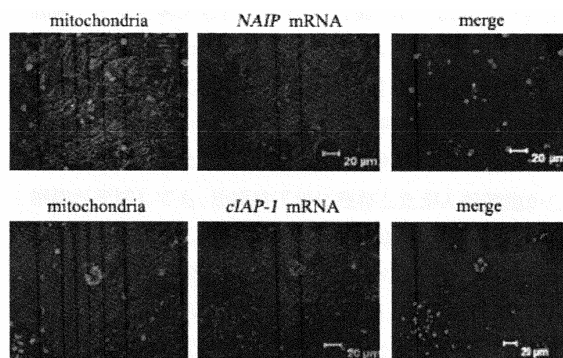


Fig.1. *NAIP* and *cIAP-1* mRNA expression in hepatocellular carcinoma tissues.

4. 考察

本研究では、肝細胞がん組織におけるFISH解析により、*NAIP*および*cIAP-1* mRNAの細胞質局在と両mRNAを高発現する細胞の点存在を確認した。*NAIP*および*cIAP-1* mRNAを高発現する細胞は両mRNAを低発現するがん細胞よりも未分化である可能性が高い。さらに、両mRNAを共に高発現する細胞は、片方のmRNAを高発現する細胞よりもさらに未分化ながん細胞と考えられるため、がん幹細胞である可能性が高い。本研究において、肝細胞がん組織中における*NAIP*および*cIAP-1* mRNA陽性細胞の点存在が確認された。従来、*NAIP*および*cIAP-1* mRNA量は細胞集団として測定されており、がん組織において両mRNAは高発現している。本研究において、*NAIP*および*cIAP-1* mRNA陽性細胞が点存在して確認されたことから、これらmRNAの発現は、がん細胞として均一ではなく、個々の細胞によって異なることが明らかとなり、肝細胞

がんはモノクローナルな細胞集団ではない可能性が示唆された。一方、*NAIP*および*cIAP-1* mRNAが検出されない細胞は、がん細胞であるにもかかわらず、抗アポトーシス能が低いと考えられる。

*NAIP*および*cIAP-1* mRNAを高発現する細胞が、がん幹細胞である可能性を示したことで、これらmRNA陽性細胞を標的とした治療法への応用が考えられる。両mRNA陽性細胞を特異的に死滅させることにより、がんの増殖や転移を飛躍的に抑制できる可能性が高い。また、肝臓以外のがん組織において確認される*NAIP*および*cIAP-1* mRNAの高発現も、がん幹細胞由来と推測される。したがって、両mRNAは肝臓がんの治療だけでなく、他の多くのがん幹細胞を特定するマーカーとして期待できる。

本研究では、がん幹細胞の特徴の一つである多能性を指標とした*Nanog*⁷⁾および*Oct3/4*⁸⁾mRNAにてFISH解析を行ったが、両mRNAの発現は普遍的であった(未発表データ)。また、これらmRNAでは*NAIP*および*cIAP-1* mRNAを指標としたFISH解析にて点存在した細胞の特異性をさらに高めることが不可能であった。これら結果より、肝幹細胞探索およびがん幹細胞探索において、*Nanog*および*Oct3/4* mRNAは標的として適していないと推測された。

本研究結果により、*NAIP*および*cIAP-1* mRNAプローブによるがん幹細胞探索の可能性が示唆された。現在の技術において、組織切片から細胞を取り出し、増殖させることは不可能であるため、本研究結果だけではがん幹細胞を*NAIP*および*cIAP-1* mRNAで同定したとは断定できない。しかし、がん組織において、*NAIP*および*cIAP-1* mRNAを高発現した細胞の点存在は、これらの細胞が他の細胞よりも未分化ながん細胞であることを示し、その性状はがん幹細胞と同様である。今後、プローブや検出法の改良により、がん発生や転移に関与するがん幹細胞を更に特異的に検出可能となることが期待される。

参考文献

- 1) Sakariassen PØ, Immervoll H, Chekenya M. Neoplasia 9:882-892, 2007.
- 2) Bonnet D, Dick JE. Nat Med. 3:730-737, 1997.
- 3) Ailles LE, Weissman IL. Curr Opin Biotechnol. 18: 460-466, 2007.
- 4) Schimmer AD. Cancer Res. 64: 7183-7190, 2004.
- 5) Young SS, Liston P, Xuan JY, McRoberts C, Lefebvre CA, Korneluk RG. Mamm Genome. 10:44-48, 1999.
- 6) Deveraux QL, Reed JC. Genes Dev. 13:239-252, 1999.
- 7) Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. Stem Cells. 26:412-421, 2008.
- 8) de Jong J, Looijenga LH. Crit Rev Oncog. 12:171-203, 2006.