

主論文

Conclusive evidence for *OCT4* transcription in human cancer cell lines: possible role of a small *OCT4*-positive cancer cell population

(ヒトがん細胞株における *OCT4* 遺伝子発現の決定的な証拠: *OCT4* 陽性細胞集団の機能検証)

【緒言】

幹細胞は多細胞生物の発生や腫瘍の発生において重要な役割を果たしている。腫瘍にはがん幹細胞(cancer stem cells; CSCs)と呼ばれる少数の細胞集団が含まれ、がん細胞の供給源として働き、腫瘍の進展に重要だと考えられている。

転写調節因子である octamer-binding transcription factor 4A (*OCT4A*)は哺乳類の初期発生、多能性維持、胚性幹細胞の自己複製に必須の因子である。更にマウス胚細胞性腫瘍においては、*OCT4A* 発現は造腫瘍能との相関が報告されている。一方、ヒト正常体性組織または体性組織由来がん組織における *OCT4A* に関しては、情報が錯綜しておりその発現の有無自体が未だ明らかでない。これは、ヒト *OCT4* 遺伝子に相同性の極めて高い偽遺伝子やスプライスバリエントの存在に起因している。実際に Liedtke や Schöler は、ヒトがん細胞での *OCT4* の検出に対して抗体の非特異性や PCR プライマーによる偽陽性を指摘し、体性組織由来がん細胞での *OCT4A* の関与を否定している。ヒト *OCT4A* 発現の有無を結論づけるためには、偽遺伝子を排除し、多種のバリエントを区別し得る方法で解析することが必須であるが、その様な報告は皆無である。

ヒト *OCT4* バリエントとして *OCT4A* 以外に *OCT4B*, *OCT4B1* の 2 種類が報告されている。*OCT4B* および *OCT4B1* は *OCT4A* の様には多能性には関与せず、alternative translation initiation により少なくとも 3 つのアイソフォーム(B265, B190, B164; *OCT4A* タンパク質と比較し N 末端側を欠く)が翻訳されると想定されている。しかし、*OCT4B* 型の first ATG では AGG への single-nucleotide polymorphism (SNP)が知られるが、がん発症率には差が無いことが報告されており、転写産物及び翻訳産物の有無・その機能については不明な点が多い。

本研究で我々はまず、ヒト体性組織由来がん細胞における *OCT4* の関与の有無を決定づけるために、偽陽性を完全に排除し得る方法を開発し、その転写産物および翻訳産物の同定を実施した。更に、本研究で同定したヒトがん細胞株における少数の *OCT4* 発現細胞の役割について検証した。

【材料と方法】

ヒト *OCT4-pg1*, *-pg3*, *-pg4* DNA の単離

PCR にて増幅後、クローニングによりヒト *OCT4-pg1*, *-pg3*, *-pg4* DNA 断片を単離した。

解析に用いたヒトがん細胞株

ヒト体性組織由来がん細胞株として MCF7, HeLa, Ishikawa, HEC265, HEC1, HEC50B, TTA1, A549, S2 を、不死化細胞株として HEK293T を、正常組織由来細胞として ARPE-19, HFF, HUVEC, HAoSMC

を用いた。ヒト胚細胞性腫瘍細胞株 PA1 を OCT4 発現陽性コントロールとして使用した。

RNA 抽出と RT-PCR

RNA 抽出後に逆転写酵素による cDNA 合成を行い、各種プライマーを用いて RT-PCR を行った。PCR 産物を精製、クローニング後にシーケンサにて塩基配列を確認した。

ヒト OCT4 翻訳産物の同定の試み

市販の抗体では偽遺伝子産物との判別が困難であるため、OCT4 遺伝子の制御領域を含むトランスジーンを導入することにより、翻訳産物の同定、発現細胞の可視化を試みた。

転写開始点より上流約 5 kb からなる制御領域を含む OCT4 遺伝子を BAC クローンから単離し、タグ (FLAG もしくは nanoluciferase; Nluc) を付加したコンストラクトを作製し細胞内に導入した (pOCT4Gen-FLAG, pOCT4Gen-Nluc)。タンパク質の検出は、FLAG 抗体による免疫染色、ルシフェラーゼ活性測定、発光イメージング (生細胞観察, in-gel detection) により実施した。

強制発現系による翻訳産物の同定

OCT4A 以外のバリエーションから翻訳されるタンパク質を同定するため、各種バリエーションをコードする cDNA に FLAG タグを付加した配列を強制発現ベクターに挿入して使用した。COS7 細胞に各コンストラクトをリポフェクション法にて導入し、FLAG 抗体によるウエスタンブロット法にてタンパク質を同定した。同時に 5'-RACE 法を用いて各々の遺伝子由来の転写産物を確認した。

足場非依存的増殖能に及ぼす効果

OCT4A および OCT4C を正常線維芽細胞に強制発現させ薬剤耐性を用いて安定発現株を単離し、軟寒天培地中での増殖能を解析することで腫瘍化活性を調査した。

がん細胞の移動能および浸潤能の測定

遊走/浸潤アッセイには BioCoat マトリゲルインバージョンチャンバーを使用した。

【結果】

プライマーの特異性についての検証

データベースから OCT4A と偽遺伝子を区別可能な配列を確認し、プライマーを設計した。5'-untranslated region (UTR) 内の転写開始点付近にフォワードプライマーを設計することにより、偽遺伝子およびゲノム DNA のコンタミネーションを排除し、ヒト OCT4A を特異的に検出することができた。またリバースプライマーを 3'-UTR 内に設計することにより、網羅的に転写産物を同定することが可能となり、従来の問題をすべて解決する検出方法であることを示した。

ヒトがん細胞における OCT4 転写産物の網羅的同定

上記方法を用いて各種細胞における OCT4 転写産物の検出を行った結果、多くのがん細胞株では OCT4A が発現し正常組織由来細胞では発現していない事が明確になった。OCT4A 発現がん細胞株では、同時に他の既知のバリエーション (OCT4A, B, B1) に加え、5 種の新規バリエーション (OCT4A1, A2, B2, B3, Bns) も転写されている事を確認した。

トランスジーンを用いたヒトがん細胞における OCT4 翻訳の可能性の検証

pOCT4Gen-FLAG を悪性度の異なる 2 種のがん細胞株 (Ishikawa (高分化型子宮体癌) 細胞と

HEC50B (低分化型子宮体癌)細胞)に導入し, FLAG 抗体で翻訳産物の検出を行った結果, 導入された細胞のうち Ishikawa 細胞では 0.3%, HEC50B 細胞では 7.0%の細胞でのみ翻訳産物を認めた。また, pOCT4Gen-Nluc を導入した結果, 50B 細胞では in-gel detection において OCT4A-Nluc 融合タンパク質が検出できたことから, 一部のがん細胞では少なくとも OCT4A タンパク質を産生している可能性が示された。

強制発現系を用いた OCT4 バリエント由来の翻訳産物の同定

OCT4A の翻訳産物である A360 タンパク質以外に, A168, B265, B164 タンパク質が検出された。5'-RACE による解析から, OCT4A 以外のバリエントを強制発現させると, 更なるスプライシングを受けることが判明した。また従来の報告にある IRES 活性は一切認められず, alternative translation initiation の可能性は低く, OCT4B 型バリエントからの主たる産物である B164 の翻訳には mRNA の CAP 依存性翻訳開始機構が利用されている事を示した。

B164 (OCT4C)の腫瘍化活性

OCT4C を強制発現させた線維芽細胞は, OCT4A と同等に足場非依存的増殖能を獲得した。また核移行シグナルを欠損させた OCT4C Δ NLS ではその活性は見られなかった。

ヒトがん細胞における OCT4 発現細胞特異的除去効果

OCT4 遺伝子発現制御領域を用いて diphtheria toxin A (DTA)を発現させることにより, 細胞集団から OCT4 発現細胞を特異的に死滅させると, がん細胞の移動能およびマトリゲル浸潤能が顕著に低下した。

【考察】

今回設計したプライマーセットにより偽遺伝子転写産物やゲノム DNA の混入による疑陽性を確実に排除し, 特異的かつ網羅的にヒト OCT4 転写産物を同定することが可能となった。従来使用されてきたプライマーではいずれも各種バリエントの区別や疑陽性の排除ができていない事を確認した。ヒトがん細胞および腫瘍検体における OCT4 発現報告については真偽不明なものが多く, 本研究で開発した方法を用いて再調査を進める必要がある。

本研究では種々のヒトがん細胞株を対象とし OCT4 発現を精査した。正常組織由来細胞では発現は殆ど検出できず, 様々ながん細胞株で発現が認められたことから, ヒト OCT4A は多くのがん細胞で機能し, がん細胞の特性に影響を及ぼす可能性がある事を結論づけた。また, OCT4A を発現するがん細胞では多種類のバリエントも転写されていることが新たに判明したことから, 複数のアイソフォームタンパク質が存在する可能性が得られた。今回得られた新規バリエントを含むすべてのバリエントがコードするタンパク質の同定を強制発現系にて実施した結果, OCT4B バリエントについては, 過去の報告とは異なり OCT4C タンパク質が主たる翻訳産物である可能性を得た。しかし実際に OCT4A 以外のアイソフォームタンパク質ががん細胞に存在する証拠は未だ得られておらず今後の検討が必要である。

次に, OCT4 発現がん細胞の可視化と翻訳産物の同定を試みた。内在性タンパク質の検出には通常抗体が汎用されるが, がん細胞における偽遺伝子の転写・翻訳が否定できない現状では抗体による検出は困難である。本研究では, タグを付加したトランスジーンを導入することにより翻訳の可能性を検証した。その結果, OCT4 発現制御領域が働かざる細胞, すなわち, OCT4 発現細胞は全体のごく一部であること

が判明した。またその発現細胞の数が、全体の発現レベルに反映され、悪性度の高いがん細胞集団ほど OCT4 発現細胞の頻度が高く発現量も高いという興味深い可能性を得た。過去には、OCT4A の強制発現によりがんの移動能や浸潤能が亢進する、がんの悪性形質に OCT4A タンパク質が関与している可能性が報告されており、本研究においても OCT4A の強制発現により HEC50B 細胞の移動能/浸潤能が亢進することを予備調査により確認した。これらの結果は細胞あたりの OCT4 発現量を単に上昇させたということよりも発現細胞の比率を高めた事に因るのかもしれない。

最後に、OCT4 発現がん細胞の機能を明らかにするために、OCT4 発現細胞の選択的死滅効果を調査した。悪性度の高い HEC50B 細胞を用いて OCT4 発現細胞の特異的の死滅を引き起こした結果、移動能/浸潤能が低下したことから、少数の OCT4 発現細胞はがん幹細胞自体である可能性、あるいはがん幹細胞の性質に影響を及ぼす可能性が考えられた。

【結論】

これまでヒト細胞における OCT4 解析の障壁となっていた検出系の問題を解決し、OCT4 遺伝子の転写産物を特異的かつ網羅的に検出可能な方法を開発した。本法を用いて 5 種の新規転写産物 (OCT4A1, A2, B2, B3, Bns) を同定し、多くのがん細胞株で OCT4A を含む多種類のバリエントが発現している事実を明らかにした。更に、がん細胞集団の中にごく一部の OCT4 発現細胞が存在し、それらは細胞の移動・浸潤能に関与する事を実証した。