

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

令和2年4月30日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 複合原子力科学研究所

職 名 助教

氏 名 真田 悠生

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	腫瘍内休止期細胞の新規解析法の研究			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	腫瘍内環境応答因子をターゲットとした放射線増感効果の解析			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) Proceedings of the 54th KURNS Scientific Meeting (2020)にて、本研究の一部内容を発表			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品、試薬類	454,761	
		遺伝子発現量解析	245,663	
実験マウス、試薬類 (見込み)		299,576		
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) この度は貴財団に貴重なご支援をいただき、研究を大幅に進めることが出来ました。心より感謝申し上げます。 貴財団助成は、研究費が不足する中で研究を継続して遂行するためには、非常に重要だと感じました。今後もこのような助成を続けてくだされば幸いです。			

成果の概要 / 真田悠生

本研究では、固形腫瘍内に存在している増殖期の細胞、休止期の細胞を判別するための新規手法の確立を行った。

固形腫瘍内に存在する休止期細胞は、がん治療に対して抵抗性を示すと考えられており、この休止期細胞を標的とした治療法の研究が進められている。しかし、休止期細胞に対する治療効果を評価するためには、固形腫瘍内の休止期細胞と増殖期細胞を区別できるようにする必要がある。これまでに休止期細胞を判別するための手法は様々に考案されてきたが、担腫瘍マウスへの毒性や、観察のために細胞を固定させなくてはならないなどの難点もあった。そこで、蛍光タンパク質 (EGFP) の発現カセットを導入したマウス SCCVII 腫瘍細胞を樹立し、増殖期の細胞のみを標識する実験系を確立することにした。

まず、CDK 遺伝子の末尾に P2A 配列と CreERT2 を接続することで、CreERT2 が同時に発現するようにターゲティングベクターを構築した。このベクターを SCCVII 細胞に安定的に導入し (SCCVII-CE 細胞)、実際に CreERT2 が発現していることを RT-PCR によって確認した。次に、2つの loxP 配列の間にネオマイシン (Neo) 耐性遺伝子カセットを挿入したコンストラクト A (loxP-Neo-loxP)、および mCherry 遺伝子カセットを挿入したコンストラクト B (loxP-mCherry-loxP) を作製した。さらに、EGFP 発現ベクターのプロモーターと EGFP 翻訳開始部位の間に、このコンストラクト A, B を挿入することで、コンストラクト C (CAG-loxP-Neo-loxP-EGFP)、コンストラクト D (CAG-loxP-mCherry-loxP-EGFP) を作製した。コンストラクト C, D を細胞に導入した場合、それぞれ Neo 耐性遺伝子、mCherry の発現がおこるため、細胞のセレクションに利用した。一方、コンストラクト C, D を細胞に導入しても、そのままでは EGFP は発現しないが、Cre 活性によって組換えが起こると EGFP が発現するようになると予想される。このことを確かめるため、コンストラクト C, D を(前述の)SCCVII-CE 細胞に導入した。さらに 4-hydroxy Tamoxifen (4-OHT) 存在下で CreERT2 が働くようになることから、培地に 4-OHT を加えてから 1 日後の EGFP 発現を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、4-OHT を加えた場合にのみ EGFP 蛍光が観察され、4-OHT を加えない場合には EGFP 蛍光が観察されないことがわかった。以上の実験によって、増殖している細胞を 4-OHT を加えることによって (不可逆的に) 標識するという細胞実験系を確立することができた。

(今後の予定)

樹立したマウス腫瘍細胞を用いて増殖期細胞の標識ができることは細胞培養系にて確認することができたが、マウスに形成された固形腫瘍内においても同様に標識が可能であるかを確認するところまでは達成できなかった。今後の予定としては、樹立した腫瘍細胞を実験マウスに移植することで固形腫瘍を形成させ、増殖期細胞の標識が可能であるかを確認したいと考えている。このため、経費の一部 (299576 円) を次年度以降に使用する予定であ

る。具体的にはマウスの購入、維持に関わる費用と、細胞の標識に必要な試薬類の購入に使用することを考えている。