

2024 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	がん三次元培養法を用いた血清アミロイド A の病理的意義の解明
キーワード	①血清アミロイド A、②三次元培養、③腫瘍スフェロイド

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	タカラダ トオル 寶田 徹
配付時の所属先・職位等 (令和 6 年 4 月 1 日現在)	神戸薬科大学 機能性分子化学研究室 助教
現在の所属先・職位等	神戸薬科大学 機能性分子化学研究室 助教
プロフィール	これまでは企業で食品開発や遺伝子治療法の開発研究に従事してきた。現在は機能不明な血清アミロイド A4 に焦点を当て、その生理的および病理的意義を解明するための研究を行っている。

1. 研究の概要

血清アミロイド A (SAA) は、高比重リポタンパク (HDL) と結合して血中に存在するアポリポタンパク質の一つである。炎症応答に伴い急増する「急性期型」と、恒常的に発現する「構成型」に分類される。急性期型の代表である SAA1 は、がんやアミロイドーシスとの関連が広く研究されてきた一方で、構成型である SAA4 の生理的・病理的意義は明らかになっていない。本研究では、より生体内に近い環境を再現可能な三次元培養法を用いて、がんにおける SAA4 の発現動態と病理的意義を明らかにすることを目的とした。ヒト肝癌細胞株 HepG2 において SAA1 はサイトカイン刺激によって産生されるのに対し、SAA4 はサイトカインの有無に関わらず産生されることを確認した。三次元培養により腫瘍スフェロイドを作製し、がん幹細胞マーカーの発現変動を RT-PCR で解析した。さらに、SAA4 の発現を平面培養と三次元培養で比較した結果、三次元培養条件下での発現は低下傾向を示した。しかし、スフェロイドからの RNA 回収量は低く、再現性を高めるための技術的課題も明らかとなった。さらに、SAA の機能解析に向けて、大腸菌発現系を用いた SAA1 および SAA4 の組換えタンパク質の作製を行い、可溶性画分からの回収に成功した。今後は、これらの組換えタンパク質を用いて、SAA が腫瘍スフェロイドの形成や成長に与える影響を検討する予定である。

2. 研究の動機、目的

血清アミロイド A (SAA) は、炎症で血中濃度が著増する「急性期型」と変動しない「構成型」の二つに大別される。急性期 SAA の代表である SAA1 はアミロイドーシスの原因となることから古くから精力的な研究が行われてきた。一方で、唯一の構成 SAA である SAA4 については生理的・病理的意義は明らかになっていない。これまでに種々の固形がん患者において急性期 SAA の血中濃度の増加が報告されており、悪性度や予後との相関が注目されている。SAA は主に肝で産生され血中を循環するが、卵巣がんや大腸がん等の腫瘍組織内において SAA1 のみならず SAA4 の発現上昇が報告されている。がん細胞を取り囲む腫瘍微小環境には、様々な分泌因子が存在し、それらを介した細胞間コミュニケーションにより腫瘍に有益な環境が実現されている。SAA はがん細胞だけでなく腫瘍組織内に集積するマクロファージからも分泌されることが知られている。また、SAA1 は細胞外マトリックスに豊富なフィブロネクチンやラ

ミニンの細胞結合ドメインと類似した配列を有しており、がん細胞を含む細胞接着やインテグリンシグナルを介した細胞増殖への寄与も考えられる。これらのことから、SAA は、がんの発生や進展に何らかの役割をもつことが推察される。そこで本研究では、より生体内に近い生理学的環境を再現可能な三次元培養法で作製した「腫瘍スフェロイド」を用いて SAA のがんにおける病理的意義に関する新たな知見を得ることを目的とした。

近年、がん研究において三次元培養法による評価が重要視されている。従来の平面培養は *in vivo* における本来の状態とは異なる遺伝子発現パターンや細胞増殖性、薬剤感受性を示すことが知られている。これまでに SAA1 のがん細胞の増殖促進作用や上皮間葉転換への関与が報告されているが、いずれも平面培養で検討された結果であり、実際の組織・臓器に近い生理学的環境を再現できる三次元培養モデルを用いた評価が必要である。そこで本研究では、がん細胞株から作製した腫瘍スフェロイドにおける SAA1 と SAA4 の発現を調べ、SAA のがんにおける病理的意義を解明するための研究基盤の構築を目指した。

3. 研究の結果

ヒト肝癌細胞株 HepG2 における SAA の発現

ヒト肝癌細胞株 HepG2 における SAA1 および SAA4 の発現を平面培養条件下で評価した。これまでに、SAA1 が炎症性サイトカインの添加によって発現誘導されるのに対し、SAA4 は定常状態で発現していることを転写レベルで確認していた。そこで、SAA1 および SAA4 のタンパク質発現をウェスタンブロット法により評価した。その結果、IL-1 β と IL-6 の共処理により SAA1 は培養上清中に分泌されることを確認した (図 1 上)。また、SAA4 はサイトカイン処理の有無に関わらず、培養上清中に分泌されていることがわかった (図 1 下)。SAA4 は N 型糖鎖付加部位を有しており、糖鎖付加型と非付加型の両方が存在する。そこで、HepG2 に野生型 SAA4 (SAA4^{WT}) または糖鎖付加部位を変異させたプラスミド (SAA4^{N76Q}) を導入し、得られた培養上清をゲルろ過クロマトグラフィーで分離した。各フラクションをウェスタンブロット法で評価した結果、糖鎖の有無によって SAA4 は異なるリポタンパク分布を示す可能性が示唆された (図 2)。これらの結果については、Takarada et al. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 1870(2):159588 (2025) に論文報告を行った。

腫瘍スフェロイドの作製

三次元培養法により HepG2 の腫瘍スフェロイドの作製を試みた。超低接着表面プレートに HepG2 細胞を 2×10^5 個/well の密度で播種し、スフェロイドを形成させた。また、ヒト卵巣

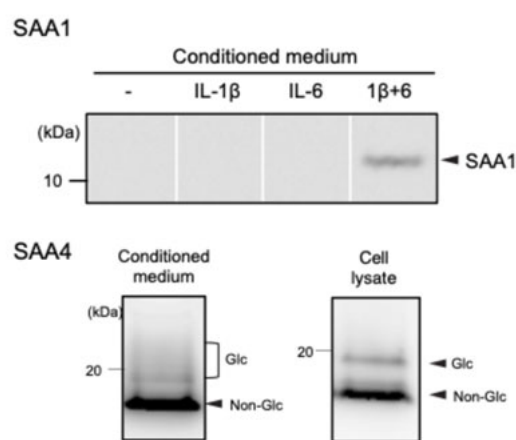


図 1. HepG2 における SAA1 及び SAA4 の発現

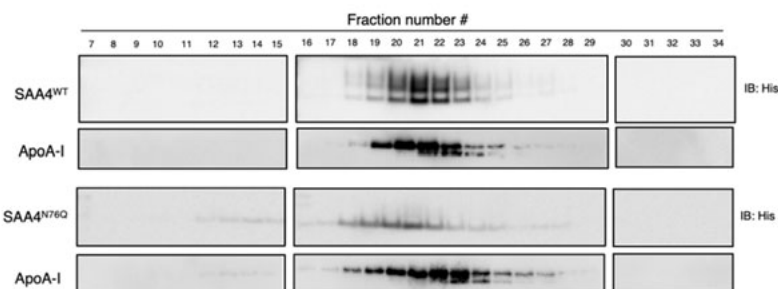
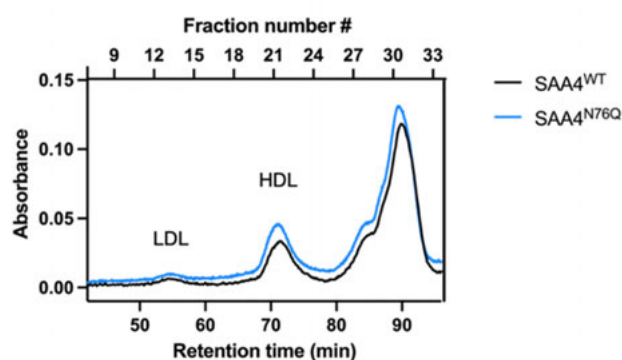


図 2. SAA4 のリポタンパク分布の評価

癌細胞株 OVCAR-3 においてもサイトカイン処理時に SAA の発現が転写レベルで増加することを確認していたため、同様の手法を用いて、スフェロイドの形成を試みた。しかしながら、OVCAR-3 は緩やかな凝集傾向を示すにとどまり、明確なスフェロイドの形成には至らなかった。そこで、本研究では HepG2 のスフェロイドを用いて、各種評価を実施した (図 3)。

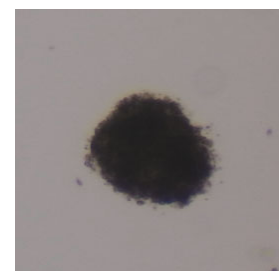


図 3. HepG2 スフェロイド

平面培養と三次元培養では、細胞における遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが知られている。特に、がん幹細胞マーカーは、培養条件によって発現量が変動することが報告されている。そこで、平面培養および三次元培養条件下におけるがん幹細胞マーカーの発現を調べた。平面培養は、HepG2 細胞を 2×10^5 個/well (12 ウェルプレート) で通常の培養容器に播種し、3 日間培養後、total RNA を回収し、RT-PCR により各種遺伝子発現を解析した。一方で、三次元培養では、平面培養と同じ細胞密度で超低接着表面プレートに HepG2 細胞を播種し、スフェロイドを形成させた後、同様の手法で発現解析を行った。その結果、一部の遺伝子マーカーでは発現量の増加が認められたが、低下傾向を示す遺伝子もみられた。これらの発現には、播種時の細胞の状態などが影響している可能性があり、RT-PCR のみの評価では再現性が乏しい結果となった。そこで、以降の実験では、HepG2 細胞において三次元培養により遺伝子発現プロファイルが変化することが報告されている培養 10 日目のスフェロイドで評価を実施することにした。

平面培養と三次元培養における SAA1 および SAA4 の発現変動評価

SAA4 はさまざまながん組織で発現量が変化することが知られている。そこで、HepG2 細胞を用いて、平面培養と三次元培養における SAA1 および SAA4 の発現変動を調べた。その結果、SAA1 は両培養条件において、その発現は認められなかった。一方で、SAA4 は平面培養では高い発現を示したが、三次元培養では発現量が低下する傾向を示した (図 4)。しかしながら、発現低下の程度にはばらつきがあり、再現性のある結果を得るには至らなかった。RNA 回収量を比較したところ、スフェロイドからの total RNA の回収効率率は平面培養と比べて低く、回収量に大きな差がみられた。このことから、RNA 抽出法やキットの選定を含め、さらなる解析条件の最適化が必要と考えている。

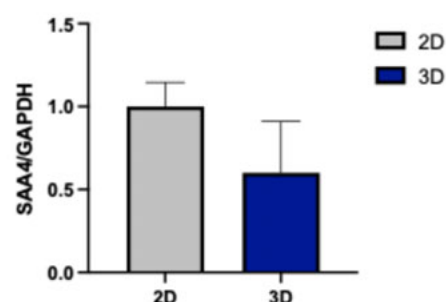


図 4. 培養条件の違いと SAA4 の発現

近年、肝がんにおいて SAA4 の発現量の低下が報告されており、その低下は予後不良と関連することが知られている。このことから、SAA4 は実際の生体環境に近い三次元培養条件では発現が転写レベルで抑制される可能性があり、これががんの進行や予後に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。三次元培養では、細胞が球状に増殖することでスフェロイドの内部は酸素や栄養の拡散が制限される状態となり、低酸素環境が形成される。低酸素環境下では、低酸素誘導因子である HIF1 α のタンパク質分解が抑制され、細胞内の HIF1 α タンパク質量が増加することで、多くの遺伝子発現が制御されることが知られている。SAA4 の発現が培養条件により変動することを踏まえ、その転写制御に関与する因子の同定を目的として、SAA4 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子のモチーフ解析を行った。その結果、低酸素環境下で発現量が低下することが知られている HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) の結合配列が複数検出された。HNF-4 は肝臓の発生、分化および恒常性維持に重要な転写因子である。今後は、SAA4 の発現変動が低酸素環境に起因するのか、HNF-4 を介した転写制御が実際に関与しているのかについて詳細な解析を進める予定である。さらに、上記のスフェロイドによる評価の継続に加え、三次元培養用器材を用いた足場依存型の培養法を用いた評価の導入も検討している。

SAA1 および SAA4 組み換えタンパク質の作製

大腸菌発現系を用いて SAA1 および SAA4 の組み換えタンパク質の作製を試みた。発現ベクターとして pET-19b を使い、それぞれの全長コーディング配列を導入した発現プラスミドを大腸菌発現株である BL21(DE3)pLysS に形質転換し、IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) を用いてタンパク質発現の誘導を行った。発現誘導後、菌体を回収・破碎し、Ni アフィニティークロマトグラフィーにより、目的の His タグ付きタンパク質の精製を行った (図 5)。その結果、SAA1 および SAA4 のいずれにおいても発現が確認され、可溶性画分からの回収が可能であった。しかしながら、同条件下で比較した場合、SAA4 の回収量は SAA1 に比べて低い傾向が見られた。SAA4 の配列中にはシャイン・ダルガルノ配列と類似した配列が 2 箇所存在することが知られており、これらの部位に変異を導入することで大腸菌発現における産生効率が改善されることが報告されている。この知見を踏まえ、今後は SAA4 の挿入配列の最適化、特にシャイン・ダルガルノ配列との干渉を考慮した変異導入を検討する予定である。今後は、得られた組み換えタンパク質を用いて三次元培養におけるスフェロイドの形成、成長に及ぼす影響を調べる予定である。

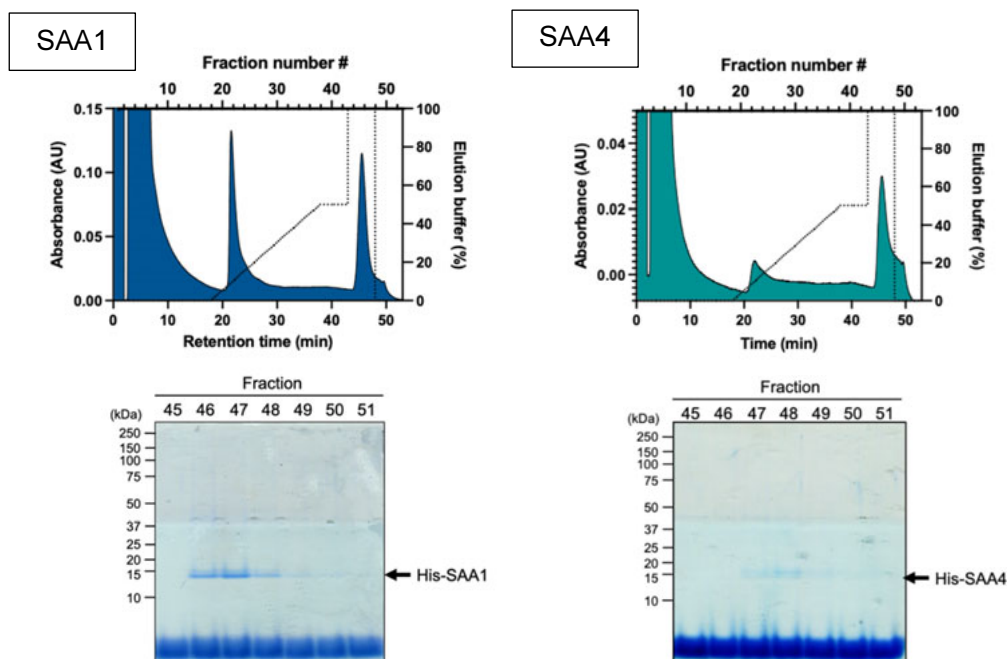


図 5. SAA1 及び SAA4 組み換えタンパク質の精製

4. 研究者としてのこれからの展望

これまでに私は、企業での研究を含め、複数の異なる分野に携わってきました。こうした経験は、自身の視野を広げる貴重なきっかけとなりました。今後も研究者としての経験を積み重ねながら、特定の分野にとらわれることなく、多角的な視点から物事を捉えられる研究者を目指して、日々研鑽を重ねてまいります。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究をご支援いただきました寄付企業法人ならびにご寄付者の皆様に、心より感謝申し上げます。2021年に現職に着任して以来、生理機能が明らかになっていないタンパク質を対象として研究を進めてまいりました。しかし、これまで異なる分野での研究経験が中心であったこともあり、関連分野における実績が十分ではなく、研究費の獲得には苦慮しておりました。そのような中で、このたび奨励金という形でご支援を賜りましたことは、資金面の助けとなっただけでなく、研究活動を継続する上で大きな励みとなりました。今後は、本研究で得られた成果を社会に役立てることができるよう努めるとともに、謙虚で誠実な姿勢を大切にしながら、研究者としてさらに成長してまいりたいと存じます。

