

医科学研究 I 年度末レポート

# イヌ SLFN14 のヒト SLFN11 との 機能的類似性について

提出者氏名、番号

藤山英樹 5401084A

所属研究室/指導者氏名

分子遺伝学講座 / 村井純子教授、田手壮太、鎌田諒

本レポートの作成は、提出者本人が行い、研究不正に該当する剽窃、偽造、捏造を行っていないことを確認しました。

本レポートは学生神野真帆と共同して行った研究で、要約・緒言・考察については各自で作成したレポートであることを確認しました。

指導教員自署

謝辞

本研究遂行にあたりご指導いただきました、

村井純子教授、田手壮太先生、鎌田諒先生に感謝申し上げます。

## 要約

2012年にヒトSLFN11ががん化学療法剤の感受性を高めるという報告以降、SLFNファミリーへの注目が高まっている。Schlafen (SLFN) familyは真獣類分岐後にメンバーが急増している遺伝子であり、イヌにはSLFN5と14がある。イヌSLFNにもヒトSLFN11と同機能があれば、イヌの癌に対するバイオマーカーとして利用できると考えられる。

本研究ではイヌSLFN14のヒトSLFN11との機能的類似性について調べた。外注したイヌSLFN14のcDNA全長をPCRで増幅し、発現ベクターに導入した。大腸菌に対しcDNAを導入したベクターでIn-fusion反応を起こし、形質転換した大腸菌を繁殖させることで発現ベクターを増幅した。その後、発現ベクターをヒトSLFN11とヒトSLFN14が発現していないヒト細胞に導入し、ヒトSLFN11との機能的類似性を検証した。結果、イヌSLFN14はK562細胞、HCT116細胞およびMCF7細胞において、過剰発現細胞を樹立できなかった。イヌSLFN14はヒト細胞において細胞増殖抑制を起こすと考えられた。

## 緒言

米国国立がん研究所が主導したNCI-60プロジェクトにおける網羅的薬剤感受性解析によって、SLFN11のmRNA発現量が、多くのDNA障害型抗がん剤に対する感受性ときわめて強く相関することが明らかとなった<sup>1)</sup>。同年、Cancer Cell Line Encyclopedia(CCLE)を用いた独立した解析においても、トポイソメラーゼI阻害剤camptothecinに対する感受性とSLFN11発現量との強い相関が報告された<sup>2)</sup>。

これらの結果は、SLFN11がDNA障害型抗がん剤に対する感受性を規定する新規因子であることを強く示唆した。興味深いことに、この相関はトポイソメラーゼ阻害剤(camptothecin, topotecanなど)、白金製剤(cisplatin, carboplatin)、核酸アナログ(cytarabine)、代謝拮抗薬(gemcitabine)といった薬理作用の異なる複数の薬剤群に共通して観察された<sup>1,3,4)</sup>。すなわち、SLFN11はDNA損傷あるいはDNA複製阻害を標的とする薬剤全般において、その細胞感受性をmRNA発現量で説明できる遺伝子として同定された。

イヌには多中心型リンパ腫や骨肉腫など多くのがんがあり、人間と同様に抗がん剤を用いたがん治療も行われている<sup>5)</sup>。また、動物専用の抗がん剤は発売されてなく、cisplatinやcytarabineなど人間用の抗がん剤が動物の治療にも用いられている<sup>6)</sup>。イヌにはSLFN5と14があり、ヒトSLFN11と酷似した遺伝子配列を持っている。もし、イヌSLFN14がヒトSLFN11との機能的類似性が認められればイヌの抗がん剤治療の新たなバイオマーカーになり得るのではないかと考え、本研究を実施した。

## 材料と方法

本研究で用いたイヌSLFN14のcDNAは図1にあるようにNotI制限酵素で切断される構造となっている。また図1より、イヌSLFN14は約2.7-2.8 kbpである。



図1 イヌSLFN14のcDNA

### I. Insertの作成

#### 1 PCRによるcDNAの複製

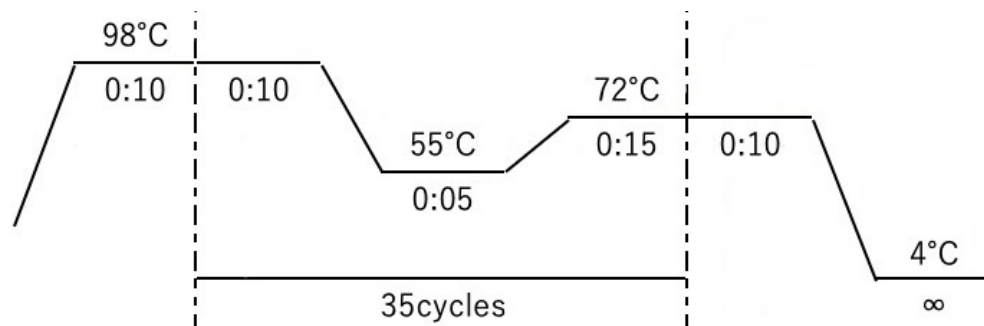
外注したイヌSLFN14のcDNAを鋳型DNAとして、PCRを用いて複製する。

PCR mixture

-Prime Star Max	10ul
-forward primer (10 uM)	0.4ul
-reverse primer (10 uM)	0.4ul
-鋳型DNA(1 ng/ul)	1.0ul
-dH <sub>2</sub> O	8.2ul

Total 20ul

PCR cycle



## 2 電気泳動

イヌSLFN14がPCRで増幅されているかを確認するため、1.5%のAgarose gelに100Vで30分間の電気泳動を行う。その後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa)を使用したgel extractionで増幅したイヌSLFN14をgelから抽出した。

### NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa)の手順

- (1) Agarose gel 100mgあたりNT1を200uL加える。
- (2) 50°Cで5-10minインキュベートし、gelを溶解させる。
- (3) Spin columnをCollection tubeにセットする。
- (4) 溶液をデカントで移し、遠心(11000g, 室温, 1min)し、濾液を捨てる。
- (5) NT3を650uL加え、遠心(11000g, 室温, 1min)し、濾液を捨てる。この操作を2回行う。
- (6) Spin columnを遠心(11000g, 室温, 1min)し、メンブレンを乾燥させる。
- (7) Spin columnを1.5mL tubeにセットし、NEを30uL加え、室温で1min incubateし、遠心(11000g, 室温, 1min)する。

## II. In-fusion反応

### 1. NotI-HFによるpPCIP の制限酵素処理

本研究ではvectorとしてpPCIP を用いた。

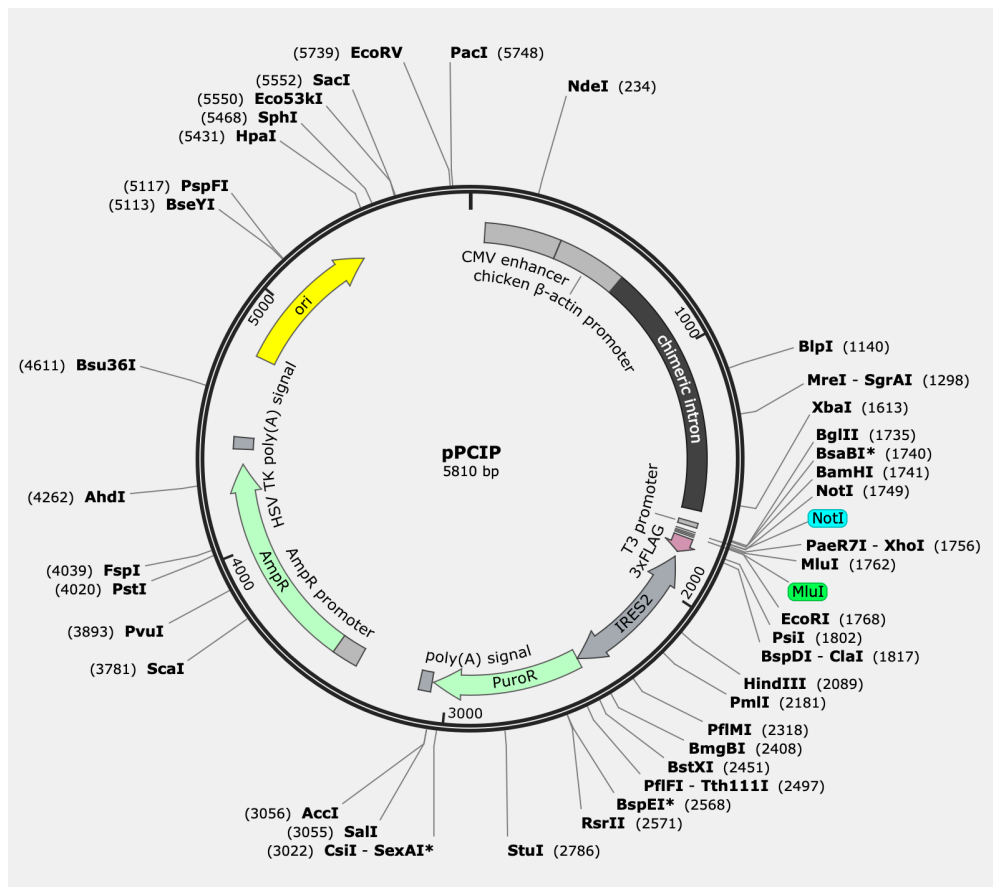


図 2 pPCIP の遺伝子

制限酵素NotI-HFを用いて、pPCIHにあるNotIを切断する。

pPCIP (1 ug/uL)	1 uL
NotI-HF	1 uL
rCutSmart (10x)	5 uL
dH <sub>2</sub> O	43 uL
<hr/>	
Total	50 uL

65 °C 20 minで制限酵素不活化する。制限酵素処理前/後のサンプルから一部取り、ベクターが開いたのを確認するため電気泳動をする。

## 2. In-Fusion反応

nanodropを用いて、PCR fragmentの濃度測定をし、イヌSLFN14は42.0 ng/uLであった。In-Fusion反応をするとき、PCR fragment : vector = 2:1(モル比) が最適で、イヌSLFN14は約2.7-2.8 kbp、pPCIPは約5.8 kbpでinsertはvectorの約半分の大きさである。よってモル比を2:1にするためには、濃度が同じであれば良い。

Vectorは計算上20 ng/uLなので、大まかに調整して下記の配合でIn-Fusionした。

5x In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2 uL
Linearized vector	2 uL (50-200 ng)
Purified PCR fragment	2 uL (10-200 ng)
dH <sub>2</sub> O	4 uL
<hr/>	
Total	10 uL 50 °C、15 min

## III. Transformation

イヌSLFN14を導入したvectorをヒートショックを用いて、大腸菌に導入する。KClで冷却し、-80°Cで保管している、DNAに対する膜透過性が増大した大腸菌を使用する。

- (1) 大腸菌を0n iceで溶かす。このとき一気に解凍するとDNAを傷つける原因となるため注意する。
- (2) 大腸菌50ulとプラスミド1ulを混合し、0n iceで20分おき、細胞膜にプラスミドが付着させる。
- (3) 42°Cで40秒間ヒートショックし、プラスミドを大腸菌に導入する。
- (4) 培地を1ml加え、一時間揺らしβラクタマーゼをある程度細胞内で増殖させる。
- (5) plateに薄く広げ、一日保管する。その後冷凍保管する。

Plateに大腸菌が増殖しているか確認し、Mini-prep & Midi-prepを行いプラスミドを増やす。

## IV. Electroporation

### 1. 使用する細胞の準備

本研究ではヒトSLFN11とヒトSLFN14を持っていないヒト細胞であるK562細胞を使用した。

- (1) K562細胞を溶かす。凍結するための物質が入っており細胞に悪影響を及ぼすため、溶けそうになったら培地へ移す。
- (2) 20ml培地へ移す。培地には下記のものが含まれている。  
Medium・・・培地  
FBS・・・子牛の血漿  
ペニシリン・・・抗生物質  
フェノールレッドが入っていて、細胞の呼吸により色が変わるため培地を入れ替えるマーカーとして使用されている。
- (3) CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベータに保管する。フラスコの蓋を緩めて空気が出入りできるようにする。

### 2. Electroporation

増幅したvectorをK562細胞に導入するためにNEPAGENEを用いたエレクトロポレーション法を行う。Electroporationをした後、スクリーニング・クローニングをするため、3sample作成する。K562細胞の必要数が $\geq 1.0 \times 10^6$ 個/sampleであり、必要数まで増殖していることを自動セルカウンターを用いて確認した。

- (1) 細胞を必要量取り、15mL tubeに入れ、遠心する。(1200 rpm, 2 min)
- (2) FBSが残らないようにPBSで1回washし、遠心する(1200 rpm, 2 min)
- (3) PBS 100 uL/sampleで懸濁し、 $1.0 \times 10^6$ 個/100 uLになるように100 uLずつエッペンに分注する。
- (4) Vector 1 ug/uLを5 uL程度入れる。
- (5) キュベットの蓋を取り、エッペンからキュベットに全量移す。このとき、なるべく溝に空気が入らないように気を付ける。
- (6) Transfection後は細胞が弱っているため、早めにmediumへ入れる準備として6well plateの内3wellにあらかじめmediumを5mLずつ入れておく。
- (7) キュベットの蓋をして、NEPAGENEを使用してエレクトロポレーションを行う。  
Protocol: 5  
 $\Omega$  0.030-0.050が適切  
Start (終わったら気泡が発生を確認) → push でキュベット取り出す
- (8) スポイトでplateから培地を吸って、混ぜて、plateに戻す。

また、PiggyBac法により遺伝子をK562細胞に導入した。PiggyBacの原理は、トランスポゾンの仕組みを利

用し、トランスポザーゼという酵素の働きで目的の遺伝子を宿主細胞のゲノムに効率的かつ安定的に挿入または除去する技術である。具体的には、目的遺伝子と、それを認識する両端の配列(ITR)を持つ「トランスポゾンプラスミド」と、トランスポザーゼをコードする「ヘルパープラスミド」を細胞に導入し、ヘルパーから作られたトランスポザーゼがITRを認識して遺伝子をゲノムのTTAA配列に挿入する<sup>7)</sup>。

### 3. スクリーニング・クローニング

イヌSLFN14を導入できたK562だけを増幅させるために、スクリーニングを行なった。

- (1). 6ウェルプレートで細胞を1週間培養する。
- (2). プューロマイシンを1/5000になるように入れ、ベクターのプューロマイシン耐性を利用してスクリーニングを行う。
- (3). 一部をBulky populationのために取り出す。
- (4). 限界希釈で5倍希釈系列を作成する。
- (5). 8連ピペットを使って希釈系列ごとに96ウェルプレートに分注・培養し、1ウェル1cellができるようにする。

## V. 追加実験

K562細胞ではイヌSLFN14を導入後コロニーが消滅したため、他のヒトSLFN13とヒトSLFN14を持っていないヒト細胞を用いて追加実験を行う。

### 1. 細胞の選択

K562細胞以外のヒトSLFN11とヒトSLFN14を発現していないヒト細胞を選択した。図3の縦軸と横軸のData Typeは「exp:mRNA Expression(log2)」であり、ヒト細胞がヒトSLFN11とヒトSLFN14の発現量を示している。ヒト細胞がヒトSLFN11とヒトSLFN14の発現量が4以下の細胞は、発現量が微量であり、本研究で適切であると考え「HCT116」と「MCF7」を用いるとする。

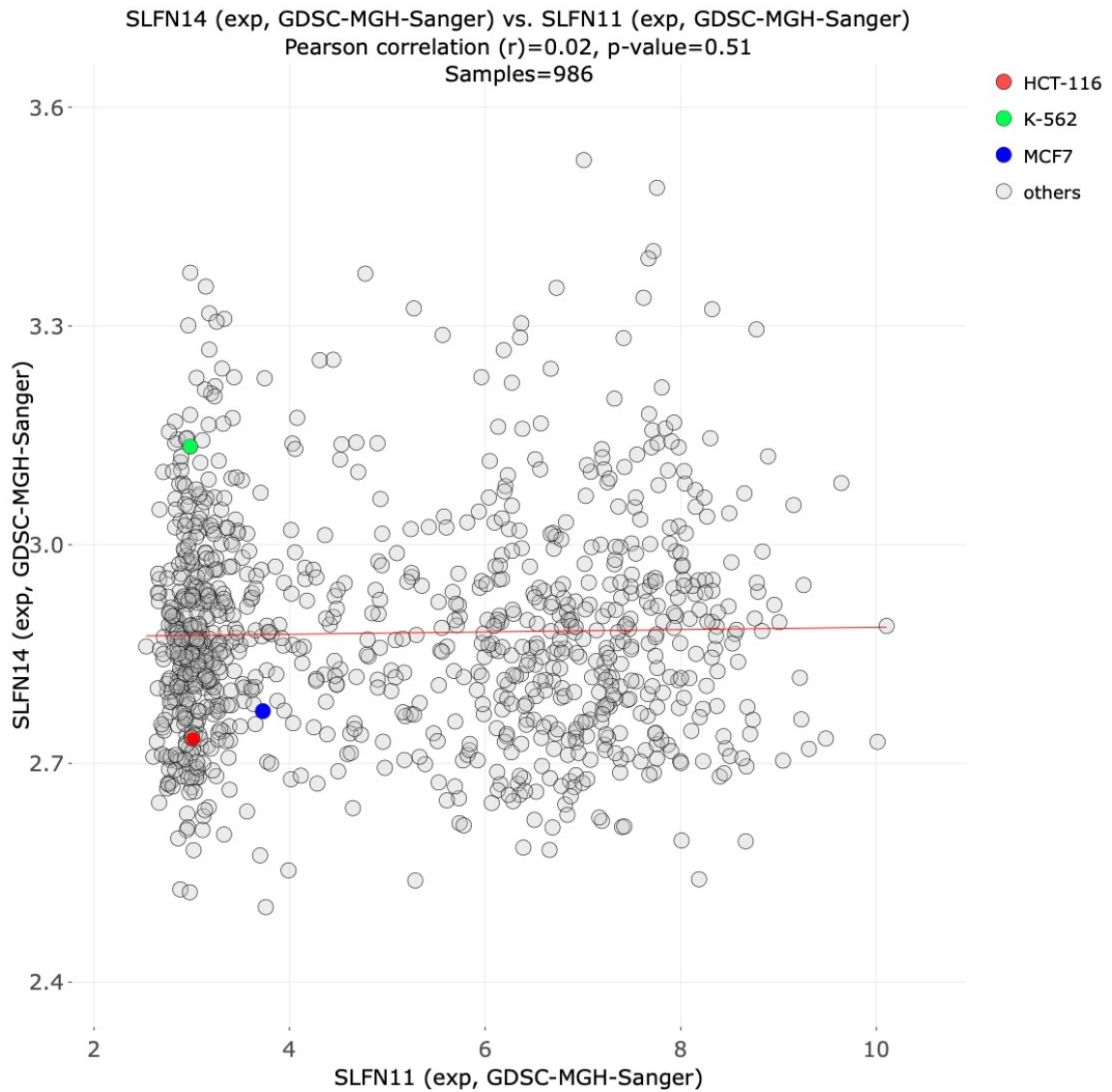


図 3 ヒト細胞のヒト SLFN11 とヒト SLFN14 の発現量  
 (CellMinerCDB で作成し、一部改変)

## 2. Lipofectamine

HCT116細胞とMCF7細胞のベクターの導入ではLipofectamineという脂質ベースの陽イオン性試薬を用いてDNAやRNAを細胞内に導入する手法を用いた。

### (1). Day 0 : 細胞播種 (HCT116, MCF7どちらも)

6-wellに $3 \times 10^5$  cells/well/2ml の細胞を播種した。

### (2). Day 1 : DNA-Lipo複合体作成 → 添加 (1 well分)

#### ① Lipofectamine 3000 側 (チューブ1)

[1]. 滅菌チューブにOpti-MEM 125  $\mu$ L を入れる。

[2]. Lipofectamine 3000を7.5  $\mu$ L 加える。

[3]. 軽く混和

- ② DNA + P3000 側 (チューブ2)
  - [1]. 別チューブにOpti-MEM 250  $\mu$ L を入れる。
  - [2]. プラスミドDNAを加える : DNA 2.5  $\mu$ g/well
  - [3]. P3000 を 5  $\mu$ L/well
  - [4]. よく混和
- ③ 複合体形成
  - [1]. チューブ2 (DNA+P3000) を、チューブ1 (Lipo3000希釈液) へ加える。
  - [2]. 1:1で混ぜる (例 : 125  $\mu$ L + 125  $\mu$ L)
  - [3]. 室温で 10-15分インキュベート
- ④ 細胞へ添加
  - [1]. できたDNA-脂質複合体を、1 wellに全量添加 (6-wellでは合計250  $\mu$ L/well)
  - [2]. 37° Cで培養し、3日後に細胞を回収して、10 cm dishに細胞数を、最も濃い状態から1:5希釈したものを合計5枚に巻き直し、その際にpuromycin (10  $\mu$ g/ml)を添加した。

### (3). Day 11 : 細胞の回収

約10日後に、コロニーができているdishから、細胞を回収した。

## VI. Drug sensitivity

イヌSLFN14を導入後コロニーを形成したHCT116に抗がん剤であるカソプトテシン(CPT)とパクリタキセル(Taxol)をそれぞれ添加し、イヌSLFN14がCPTとTaxolの薬剤感受性があるか調べる。

### ① Day 0 : 細胞播種

96-wellに1500 cells/wellの細胞を播種した。

### ② Day 1 : 薬剤添加

薬剤の濃度を1:2希釈して添加

### ③ Day 3:ATPlite

細胞内のATP量を生物発光法で定量し、生細胞数や細胞毒性を高感度に測定するATPliteを行う。

## 結果

本研究は、学生神野真帆と共同で異なるcDNAを用いて行なった。そのため、結果にある図には神野真帆が使用したチンパンジーのSLFN13についても書かれている。

### I. Insertの作成

電気泳動により、増幅されたイヌSLFN14を確認することができた。

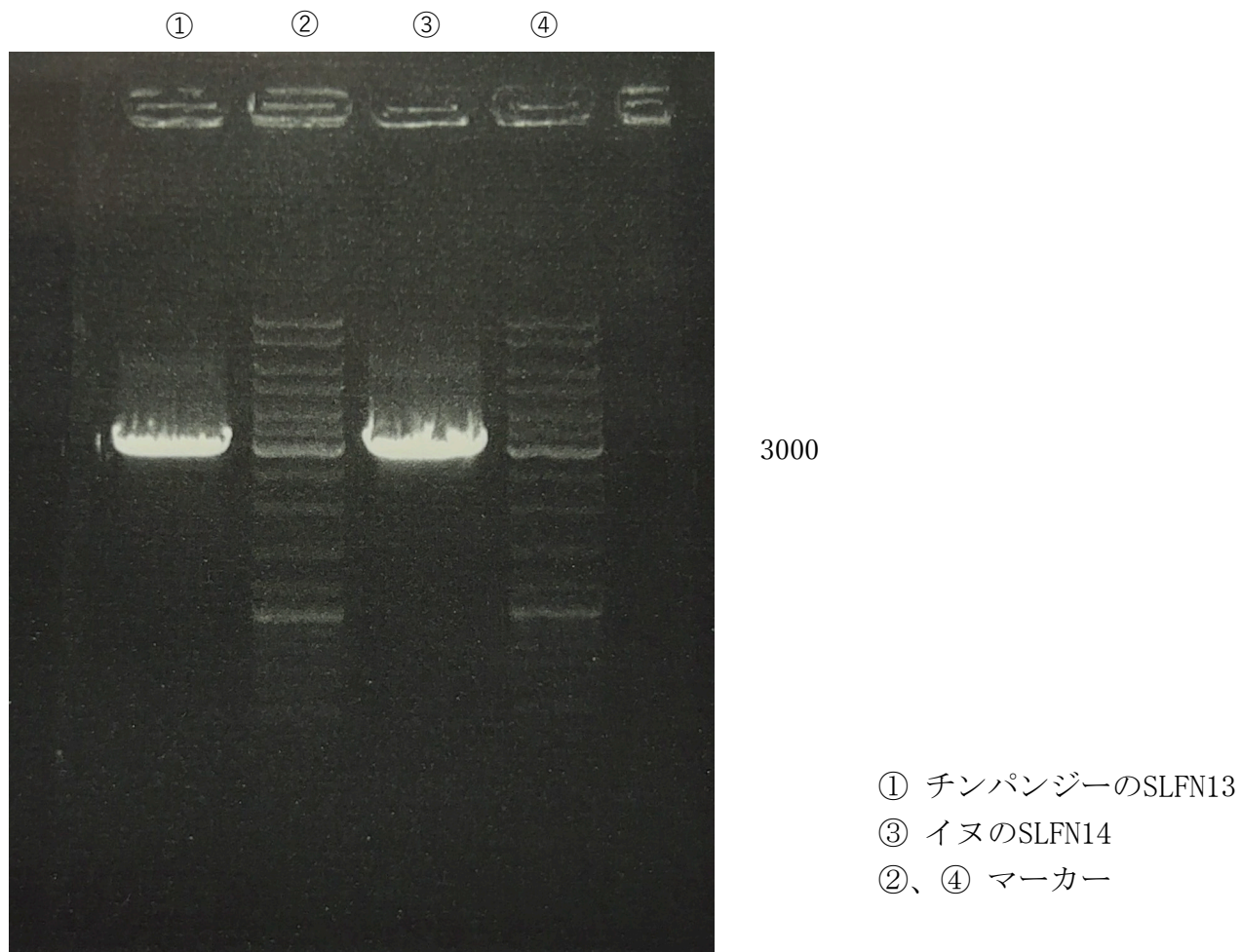
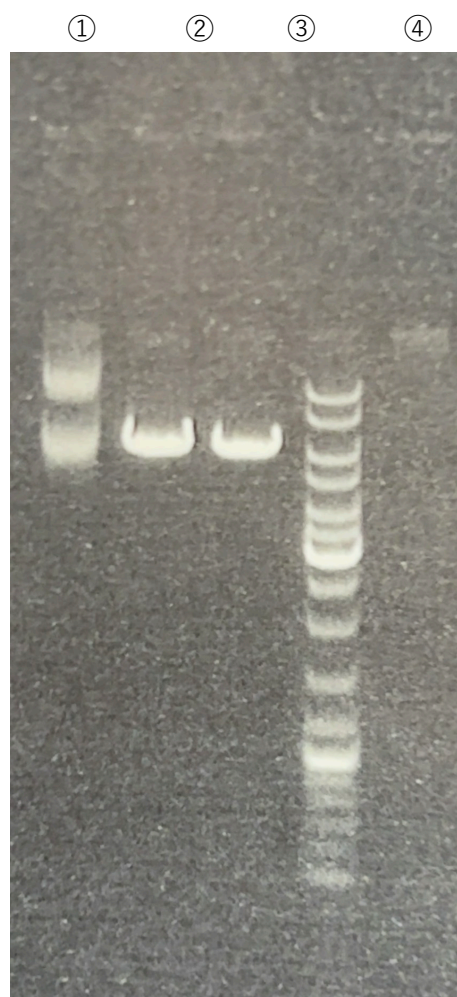


図 4 Insert の電気泳動

イヌ SLFN14 は約 2.7-2.8 kbp であるため、電気泳動の結果から Insert を増幅できたと確認できた。

## II. In-fusion反応



- ① 制限酵素処理前のベクター
- ②、③ 制限酵素処理後のベクター
- ④ マーカー

**図 5 制限酵素処理前後のベクター**

制限酵素処理前は開環状・閉環状のバンド 2 本、制限酵素処理後は直鎖状のバンド 1 本のみで、ベクターが完全に酵素処理されていると確認できた。

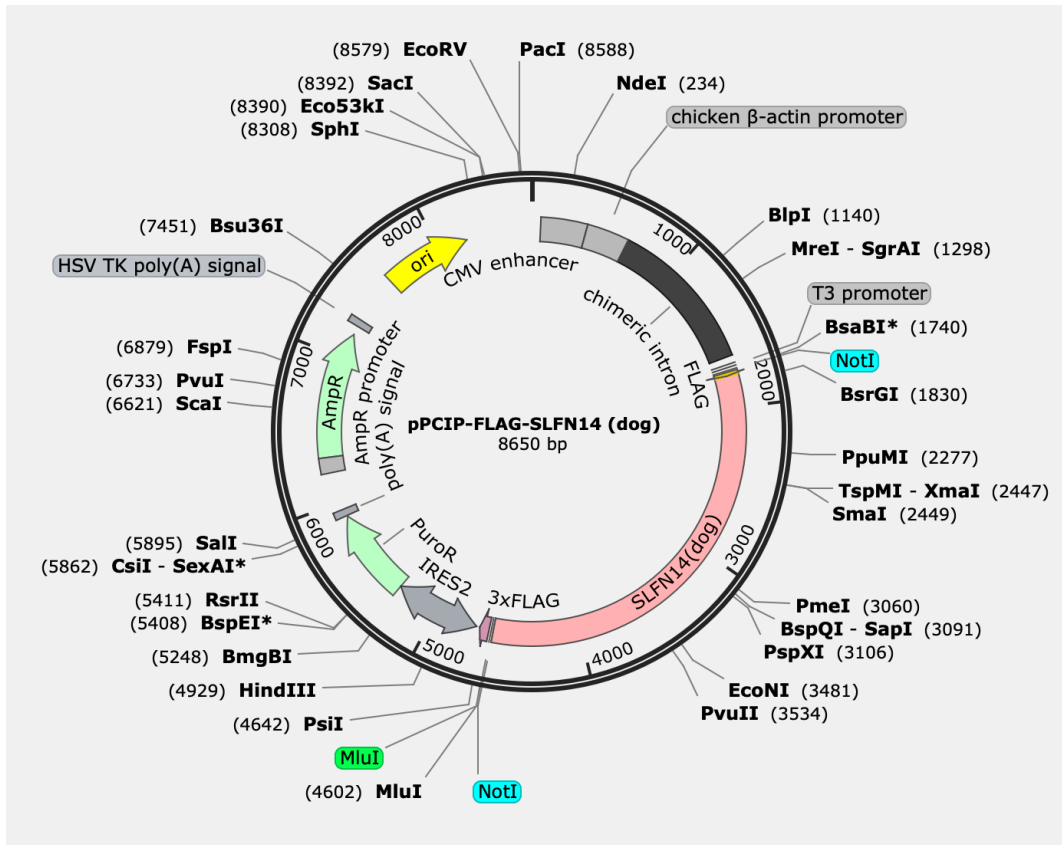


図 6 イヌ SLFN14 を導入した pPCIP の遺伝子

In-fusion反応により、図6のようにベクターにイヌSLFN14を導入した。

### III. Transformation

βラクタマーゼによるスクリーニングにより、イヌSLFN14を導入したvectorを取り込んだ大腸菌のみ増殖させた。

### IV. Electroporation

オワンクラゲの緑色発光タンパク質（GFP）を紫外線照射により観察することで、vectorを導入したK562細胞が生存していることを確認することができた。10日後コロニーは形成されていなかった。

### V. 追加実験

MCF7細胞ではEmpty vectorではコロニーが形成されていたが、イヌSLFN14を導入した細胞ではコロニーは形成されていなかった。HCT116細胞ではEmpty vectorではコロニーが形成されて、イヌSLFN14を導入した細胞ではコロニーが数が少ないものの形成されていた。目視だとEmptyと比較して1/100~1/1000の増殖量であった。

## VI. Drug sensitivity

薬剤を添加し、Western blottingによりFlagがあるかを確認した。

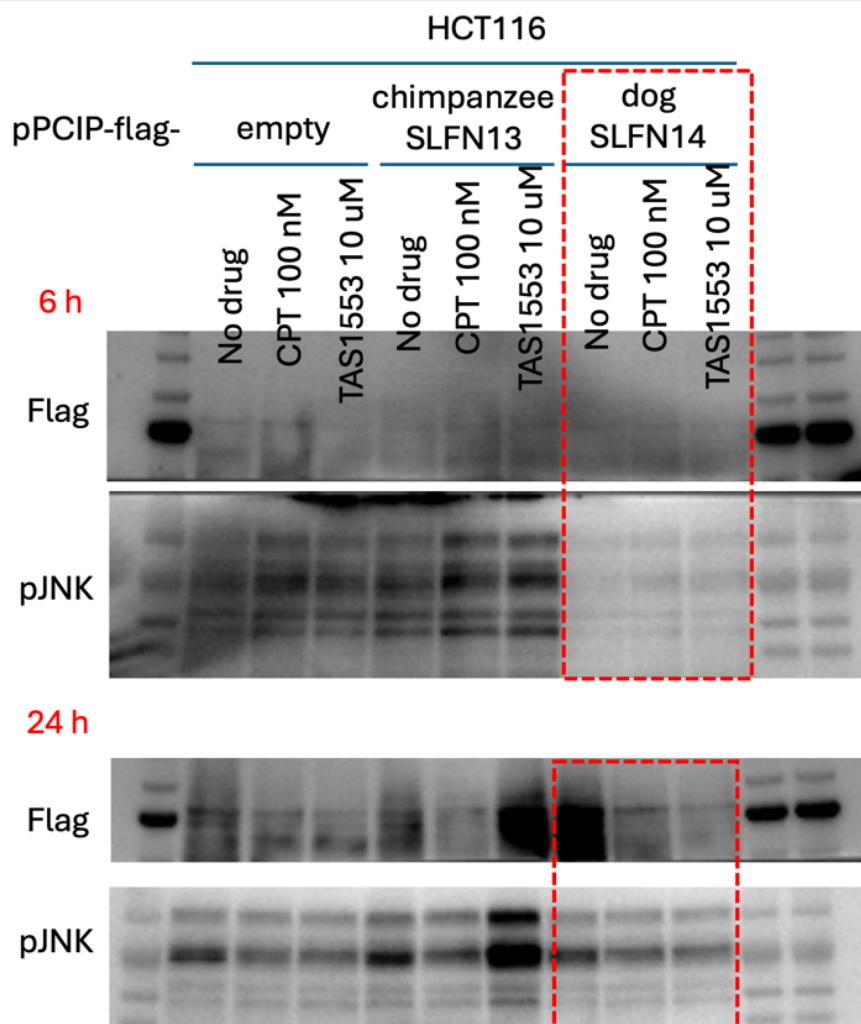


図 7 HCT116 細胞の Western blotting  
(実施者 中根幹男)

図7より、イヌSLFN14を導入したHCT116細胞において、flag-イヌSLFN14に相当する約100 kDaあたりに、バンドが検出できなかった。

以下の、表1, 2はATPliteによるEmptyのHCT116細胞とイヌSLFNを導入したHCT116細胞の薬剤感受性の比較を示したものである。表3は表1, 2を元に外れ値を作成したものである。

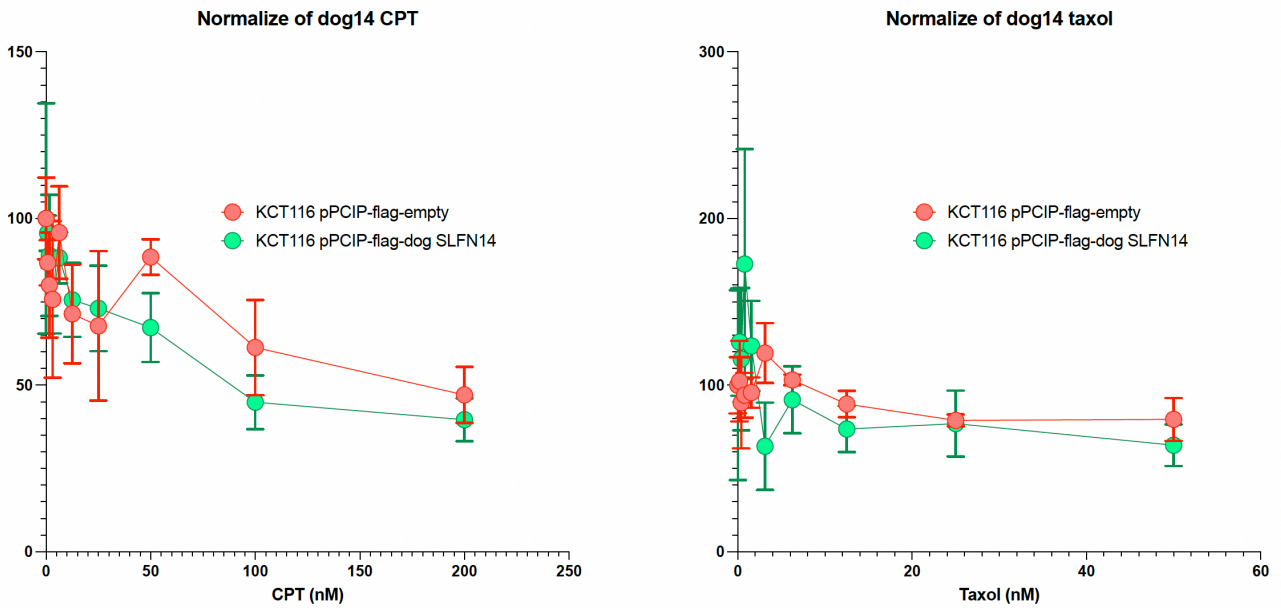
表 1 イヌ SLFN14 の CPT 感受性

CPT (nM)	KCT116 pPCIP-flag-empty			KCT116 pPCIP-flag-dog SLFN14		
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2
0.000	20853	26690	24442	7947	4342	9044
0.780	21950	18943	21540	6589	6568	7237
1.560	16529	37374*	21876	6199	7676	5100
3.125	23818	18181	12531	6209	4829	5120
6.250	19260	23967	25704	5752	6225	6842
12.500	13010	19138	19242	4495	5606	6024
25.000	11016	16010	21780	6226	4482	4877
50.000	20142	22643	20877	4494	5619	4234
100.000	18602	13380	12139	3724	2580	3268
200.000	13307	11320	9257	2465	3338	2659

表 2 イヌ SLFN14 の Taxol 感受性

Taxol (nM)	KCT116 pPCIP-flag-empty			KCT116 pPCIP-flag-dog SLFN14		
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2
0.000	16791	17102	12435	3279	4691	1221
0.200	16574	19129	11771	4439	2716	4414
0.390	18665	11920	10852	2988	5040	2602
0.780	15320	16081	12147	4476	3707	7689
1.560	13887	14022	16381	4739	3377	3238
3.125	16701	21606	16939	1291	2840	1690
6.250	15850	16455	15469	3112	3186	2082
12.500	13830	14822	12414	2067	2745	1960
25.000	12597	11533	12389	3034	2175	1859
50.000	14482	10610	11728	2398	1698	1781

表 3 イヌ SLFN14 の薬剤感受性



## 考察

今回の研究では、emptyベクターおよびイヌSLFN14を導入したHCT116細胞において、薬剤感受性の向上は認められなかった。一つの可能性として、イヌSLFN14にはヒトSLFN11のように薬剤感受性を高める効果が存在しない可能性が考えられる。しかし、Western blottingの結果において、イヌSLFN14を導入したHCT116細胞ではFlagシグナルが弱く検出されていたことから、HCT116細胞ではイヌSLFN14の過剰発現が十分に達成されていなかった可能性がある。そのため、本研究において観察された薬剤感受性の結果は、イヌSLFN14本来の機能を正確に反映していない可能性があり、発現量の違いが結果に影響を与えた可能性を考慮する必要がある。

一方で、K562細胞およびMCF7細胞では、イヌSLFN14を導入するとコロニー形成が認められず、細胞は死滅した。この結果から、HCT116細胞では多少の耐性が示唆されるものの、イヌSLFN14はヒト細胞に対して毒性を示す可能性が高いと考えられる。このような細胞死は、単なる過剰発現ストレスによるものだけでなく、イヌSLFN14がヒト細胞内の分子機構と適切に調和せず、翻訳制御やDNA損傷応答などの重要な細胞機能に影響を与えた結果である可能性も考えられる。

以上の結果を踏まえると、本研究の目的であるイヌSLFN14とヒトSLFN11の機能的類似性を検証するためには、イヌSLFN14の過剰発現が可能なヒト細胞を探索する必要があると考えられる。図3より、ヒトSLFN11およびヒトSLFN14の発現量がほとんど認められない細胞も存在しており、そのような細胞ではイヌSLFN14に対する耐性を示す可能性も考えられる。特に、内在性SLFNファミリー遺伝子の発現が低い細胞では、外来性SLFN14の影響を比較的受けにくい可能性があり、過剰発現実験を行う上で有用なモデルとなることが期待される。しかし、どのヒト細胞がイヌSLFN14に耐性を持つかは現時点では不明であり、すべてのヒト細胞に対して毒性を示す可能性も否定できない。

そのため将来的な展望として、イヌSLFN14をイヌにおける抗がん剤感受性のバイオマーカーとして応用することを考える場合、イヌSLFN14をノックアウトしたイヌ細胞を入手または作成し、野生型細胞と比較する方法が有効であると考えられる。特定の遺伝子をノックアウトすることで、その遺伝子の機能を解析する手法は、哺乳類細胞において有用であることが報告されており<sup>8)</sup>、この方法を用いることで、イヌ細胞におけるイヌSLFN14の役割をより直接的に評価できると考えられる。また、ノックアウト細胞を用いることで、遺伝子導入に伴う非特異的な細胞毒性の影響を排除できる点も大きな利点である。イヌ由来細胞であれば、外来遺伝子導入による細胞死を回避できる可能性があり、ヒト細胞とイヌ細胞間でのイヌSLFN14の機能差について過度に考慮する必要も少なくなると考えられる。

## 参考文献

### 【形式はAMA】

- 1 Zoppoli G, Regairaz M, Leo E, et al. Putative DNA/RNA helicase Schlafen-11 (SLFN11) sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 15030-15035.
- 2 Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012; 483: 603-607.
- 3 Jo U, Murai Y, Takebe N, Thomas A, Pommier Y. Precision Oncology with Drugs Targeting the Replication Stress, ATR, and Schlafen 11. *Cancers (Basel)*. 2021; 13.

- 4 Jo U, Pommier Y. Structural, molecular, and functional insights into Schlafen proteins. *Exp Mol Med*. 2022; 54: 730-738.
- 5 Nobuta T, Maruo T, Kawamura Y. Epidemiological analysis of 5,819 cases of tumors in dogs. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*. 2008;61(11):867-872.
- 6 Norris AM, Withrow SJ. A review of cancer chemotherapy for pet animals. *Can Vet J*. 1984;25(4):153-157.
- 7 Yusa K. piggyBac Transposon. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2):MDNA3-2014.  
doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0028-2014
- 8 Santiago Y, Chan E, Liu PQ, et al. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5809-5814.  
doi:10.1073/pnas.0800940105