

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10540

研究課題名(和文)細胞初期化技術を用いた細胞腫特異性発癌の検証

研究課題名(英文) Cellular context-dependent consequences of Apc mutations on gene regulation and cellular behavior

研究代表者

橋本 恭一 (Hashimoto, Kyoichi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00769424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌は遺伝子変異により生じる疾患と考えられているが発生する臓器により検出される遺伝子変異は異なっている。このことから遺伝子変異による発癌は細胞の種類に依存していることが示唆される。申請者は大腸腫瘍細胞を初期化し他の臓器の細胞へ再分化させることで細胞種を規定しているエピゲノム制御を変化させ遺伝子変異による腫瘍形成への影響を検証した。その結果、Apc遺伝子変異により影響を受ける遺伝子発現や細胞動態の変化は細胞種に依存すると考えられ、腫瘍の進展には遺伝子配列異常のみならずエピゲノム制御が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、癌の発生や進展には多段階発癌に代表されるように遺伝子の異常が深く関与することが知られていたがエピゲノムの関与については議論の余地が残っていた。今回、エピゲノム制御が癌の発生・進展に影響することを実験動物モデルを用いて示し、癌の発生・進展におけるエピゲノムの関与解明に貢献し、癌の新しい治療戦略の構築に寄与するところが多いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The spectrum of genetic mutations differs among cancers in different organs, implying a cellular context-dependent effect for genetic aberrations. However, the extent to which the cellular context affects the consequences of oncogenic mutations remains to be fully elucidated. We reprogrammed colon tumor cells in an ApcMin/+ mouse model, in which the loss of the Apc gene plays a critical role in tumor development and subsequently, established reprogrammed tumor cells(RTCs). The redisruption of Apc in RTC-derived differentiated cells resulted in neoplastic growth that was exclusive to the intestine, but the majority of pretumoral microadenomas. These results highlight the significant influence of cellular context on gene regulation, cellular plasticity, and cellular behavior in response to the loss of the Apc function. Our results also imply that the transition from microadenomas to macroscopic tumors is reprogrammable, which underscores the importance of epigenetic regulation on tumor promotion.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の発生には遺伝子の異常が関与していることが広く知られている。しかしながら、同じ遺伝子の異常があるにも関わらず、ある特定の臓器にのみ癌が発生するという事象が見受けられる。例えば遺伝性の癌疾患である家族性大腸腺腫症 (Familial Adenomatous Polyposis) では、全身の体細胞に Apc 遺伝子の変異を有しているにも関わらず大腸にのみ癌の発生が認められる。また食道癌の軟骨化生など、癌にはしばしば化生という現象が認められ、癌細胞由来の化生細胞では細胞増殖の停止が確認される。これらのことは、たとえ腫瘍化に十分な遺伝子異常を有していたとしても細胞腫が異なれば腫瘍は発生せず、細胞種が変わること(分化転換)により癌細胞の特性が変化しうることを示唆する。癌の発生や癌特性を維持するためには遺伝子の異常に加え、細胞種すなわち細胞の分化状態が重要な因子であることが推測される。しかしながら、両者の関係を実験的に検証した報告はこれまでにない。この事象を検証するため、我々は iPS 細胞作成の技術を研究へと応用した。体細胞に特定の転写因子群を遺伝子導入することにより多能性幹細胞、iPS 細胞を作製することができる。この iPS 細胞を再分化させることにより元の細胞のゲノムの情報を持ったさまざまな組織の細胞を得ることができる。

2. 研究の目的

癌細胞に初期化を試みその細胞を分化転換させることにより、癌細胞の特性が変化するかどうか検討した。本研究の目的は癌の細胞腫特異的発癌 (遺伝子異常+特定の細胞腫 発癌) を実証し、細胞種を制御しているエピゲノムが癌の発生・進展に関与しているかどうかを示すことである。

3. 研究の方法

1. iPS 細胞作成の技術を用い大腸腫瘍細胞を初期化する。
2. 初期化した細胞を大腸以外の細胞へと再分化させ腫瘍細胞の特性は変化するか評価する。
1. iPS 細胞作成の技術を用い大腸腫瘍細胞より、初期化した大腸腫瘍細胞を樹立する。
Apcmin/+ マウスの大腸腫瘍細胞を初代培養し、初期化因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を発現させることにより腫瘍細胞の初期化を試みる。
初期化した大腸腫瘍細胞の品質を評価するため未分化マーカーが発現しているかどうか qRT-PCR、microarray にて解析する。またヌードマウスの皮下に細胞を移植し三胚葉分化できるかどうか多能性を評価する。
2. 初期化した細胞を大腸以外の細胞へと再分化させ、その細胞より腫瘍が発生するのか、また腫瘍細胞の特性は変化しているかどうか評価する。
初期化した大腸腫瘍細胞を用いてマイクロインジェクションにてキメラマウスを作製し、腫瘍が発生する臓器を評価する。(in vivo)
初期化した大腸腫瘍細胞を異なる胚葉の細胞 (外胚葉、中胚葉) の分化誘導し、腫瘍としての特性である自立性増殖能に変化があるかどうか評価する。(in vitro)

4. 研究成果

この研究を行うため doxycycline-inducible system を用いた。薬剤(Doxycycline)を投与することにより全身で初期化因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を発現するマウス (from Yamada lab : Cell. 2014 Feb 13;156(4):663-77) と Apcmin/+ マウスを交配し、全身で 4 因子を発現する Apcmin/+ マウスを作製した。また今後の初期化した腫瘍細胞を分化する実験系確立のため、得られたマウスと Lgr5 遺伝子に EGFP-IRES-creERT2 を knock-in したマウス (from Hans Clevers lab : Nature. 2007 Oct 25;449(7165):1003-7) を交配した。この交配により得られたマウス (Apcmin/+、Col1a1-OKMS、Lgr5-EGFP-IRES-creER) を用いて実験を進めた。樹立したマウスに発癌促進物質である DSS を投与し発生した大腸腫瘍細胞を初代培養し、doxycycline を投与することにより初期化を試みた。これにより iPS/ES に類似したコロニーを形成する細胞が得られた。この細胞は未分化性の指標である AP 染色陽性であり、qRT-PCR にて完全に初期化された細胞の指標である Nanog の発現上昇が確認された。またマイクロアレイにて網羅的に見ても、発現している遺伝子群が iPS/ES 細胞とほぼ同等であった。Nanog のプロモーター領域のメチル化、Oct3/4 の distal エンハンサー領域のメチル化も解除されており、樹立した細胞は、完全に初期化された細胞と考えられた。Apc min マウスの大腸腫瘍では、ほぼ全例で Apc の LOH が起こっているといわれている。初期化細胞のエキソームを次世代シーケンサーにて解析すると Apc の LOH が認められ、またいくつかの遺伝子にて遺伝子配列異常が生じていることが分かり、得られた細胞は腫瘍由来であることが確認された。われわれはこの初期化細胞を reprogrammed tumor cell (RTC) と命名した。

マイクロアレイにて RTC および腸管の細胞で Apc 遺伝子の変異によって発現に影響を受ける遺伝子群を比較するとほとんど重複しておらず、細胞の初期化によって Apc 遺伝子変異により影響を受ける遺伝子群が大きく変化する可能性が示唆された。さらに Apc 遺伝子が関与する canonical Wnt pathway を刺激することで変化する遺伝子群が細胞種により異なるかどうか検証した。まず doxycycline を投与することによりヒト β -catenin を発現させることができる ES 細胞を作成した。この ES 細胞およびこの細胞に由来する腸管、胎児線維芽細胞を用い、 β -catenin を発現させ発現に影響を受ける遺伝子群を検証したところ、腸管において発現が上昇する遺伝子群は、ES 細胞および胎児線維芽細胞では発現上昇はほと

んど認められなかった。これらの結果は Apc 変異が起こることにより影響を受ける遺伝子群は細胞種に依存することが示唆された。

次に RTC の分化能を確認するためヌードマウスの皮下に細胞を移植した。発生した腫瘍を調べるも三胚葉分化を示す奇形腫は認められなかった。しかしながら一定の分化傾向が確認され病理検査にて組織の中に多核巨細胞が認められた。多核巨細胞は胎盤組織の細胞の一つであり、そのマーカーである PI-1 および胎盤幹細胞で発現している Cdx2 を免疫染色で調べたところ発現が確認された。Cdx2 は胎盤分化に重要であると言われており、Oct3/4 と相反的な発現を示すことが報告されている。4 cell embryo 中で Oct3/4 の発現が高まることにより胎児となる内部細胞塊へと誘導され、Cdx2 の発現が上昇することにより胎盤となる栄養外胚葉へと誘導される。これらのことにより RTC は胎盤系列の細胞へと分化するのではないかと推測した。これを確認するため RTC を胎盤幹細胞の培地にて培養したところその形態は胎盤幹細胞に類似し、qRT-PCR でも Cdx2 の発現上昇が確認された。さらに GFP にてラベリングした RTC を胚盤胞へ injection したところ、胎盤幹細胞が存在する栄養外胚葉の層に GFP の蛍光を認めた。これらのことにより大腸腫瘍細胞から樹立した RTC は、胎盤系列へ分化することが示された。

RTC は胎盤系列へ分化を示したが、胎児組織細胞の起源となる内部細胞塊への分化は認められなかった。Apc の不活性化は胎児致死であり、内部細胞塊への分化を示さないのは Apc の欠損によると考えられ、Apc 遺伝子の救済を試みた。targeting vector を用い Apc min allele の片方の allele を相同組み換えにて置き換えた。サザンブロッティングにてターゲットアレルが Apc 遺伝子の片アレルに組み込まれていることを確認した。このターゲティングベクターには loxP 配列が置かれており、得られた細胞は Cre を発現させることにより再度 Apc 遺伝子を不活性化、すなわち元の腫瘍細胞に類似したゲノムの異常を再現することを可能とした。この Apc を救済した RTC をヌードマウスの皮下に打ち込むと再胚葉分化を示す奇形腫を形成し、胚盤胞への injection により胎児を形成、キメラマウスを発生することが確認できた。

RTC の胎盤系列への分化傾向は RTC 特有の可能性を除外するため、われわれは Apc min/min ES 細胞を樹立した。またこの Apc min/min ES 細胞の Apc min allele の片方を同様の targeting vector を用い相同組み換えにて置き換えた。樹立した細胞は、同様にヌードマウスの皮下に打ち込むと再胚葉分化を示す奇形腫を形成し、胚盤胞への injection により胎児を形成、キメラマウスを発生することが確認できた。

この Apc min/min ES 細胞は胎盤幹細胞と同等に Cdx2 が高発現しており、Apc 遺伝子を救済することでその発現は ES 細胞と同程度に低下することが示された。また Cre を発現させ再び Apc 遺伝子を不活性化すると再び胎盤幹細胞と同等に Cdx2 が高発現することが確認された。マイクロアレイを用いた hierarchical cluster analysis でも RTC は Apc min/min ES 細胞と発現パターンが類似しており、一方で Apc を救済した RTC は ES 細胞と遺伝子発現パターンが類似していた。この Apc 遺伝子が不活性化することで Cdx2 の発現が上昇することは canonical Wnt pathway が関与しているかどうかを調べるため、Dox-inducible -catenin ES 細胞を用いて実験を行った。-catenin は Dox 濃度依存的に発現が上昇すると言われている。Dox の濃度を割振った ES 培養培地にてこの細胞を 2 週間培養しおのこの Cdx2 の発現を調べた。結果、Dox の濃度を上昇させることにより Cdx2 の発現は上昇するも、胎盤幹細胞および Apc min/min ES 細胞と比較しごくわずかの上昇にとどまった。以上より Apc と胎盤分化の regulator である Cdx2 との間には現在まで報告されていない pathway が存在することが示唆された。

Apc を救済した RTC を用いて作製したキメラマウスの生体内で Apc 遺伝子を欠損させることにより（元の腫瘍細胞の異常を再現することで）再びマウスの腸管に腫瘍が発生するかどうか検証致した。また他の組織の細胞（小腸、大腸、肝臓、毛嚢）でも腫瘍は形成するかどうか観察を行った。Apc のレスキューを行った RTC の Lgr5 遺伝子には Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 配列が組み込まれており、Tamoxifen を投与することにより Lgr5 発現細胞で Apc の不活性化を引き起こすことができる。キメラマウスに tamoxifen を投与し 12 週後にマウスを犠牲させ、小腸、大腸、肝臓、皮膚の観察を行った結果、腸管では再び腫瘍を形成したが、他の臓器では肉眼的および顕微鏡学的にも腫瘍形成は認められなかった。さらに腸管腫瘍の大部分は、遺伝子変異を有するにも関わらずそのほとんどが腫瘍前段階である粘膜内病変にとどまっていた。これらのことにより、例え腫瘍化に十分な遺伝子異常を有していたとしても細胞種が異なれば腫瘍は発生しないことが in vivo で示された。

次に in vitro での分化実験を行った。この Apc を救済した RTC から胎児線維芽細胞を樹立し、Apc を再び不活性化した細胞と Apc 救済した細胞とで細胞増殖能を WST8 assay にて行ったところ差がなく、BrdU による細胞免疫染色でも細胞増殖能に有意な差は認められなかった。マイクロアレイにて腸管で Apc が不活性化すると発現上昇する遺伝子群は、胎児線維芽細胞において Apc を不活性化しても上昇は確認されなかった。一方でキメラマウスの腸管上皮よりオルガノイドを作製し、このオルガノイドの Apc を不活性化すると、腸管で Apc が不活性化すると発現上昇する遺伝子群の上昇が確認された。以上より in vitro でも細胞種が異なれば同じ遺伝子異常を有していたとしても細胞同愛や影響を受ける遺伝子群

は異なることが示された。
さらに Apc を不活性化することによりキメラマウスの腸管に発生した病変を調べたところ、そのほとんどは微小病変にとどまっておりに肉眼的腫瘍は総数であることが確認された。この腸管上皮の腺管分離を行い、微小病変を回収し解析したところ Apc 遺伝子是不活性化しており、RTC で確認されていた遺伝子群の異常を認めた。このことより微小病変は RTC 由来であり Apc が不活性化されているが肉眼的腫瘍には進展せずとどまっていることが判明した。
また機能的に重要かどうかは不明であるが、マウスの大腸腫瘍で特異的にメチル化されていると報告されている Nr5a2 遺伝子のメチル化が RTC から微小病変、肉眼的大腸腫瘍へと徐々に付加されていることが確認された。
以上より初期化にて大腸腫瘍に生じていたエピゲノム異常をリセットすると、たとえ大腸へ再分化させても大腸腫瘍まではしなくて済む微小病変にとどまることが示された。腫瘍の進展にはエピゲノムの異常が関与していることが示唆された。
以上まとめると本研究では、がんにおけるエピゲノムの意義について 2 点示した。一点は細胞種特異的な寄与。たとえ同一の遺伝子異常を有していても細胞種すなわちエピゲノム制御状態が異なれば腫瘍は発生しないこと。もう一点は病期特異的な寄与。微小病変から大腸腫瘍細胞の進展にはエピゲノムの異常が関与していること。
がんの発生や進展には遺伝子変異以外の因子であるエピゲノム制御・異常が関与していると考えられ、エピゲノム制御を改変することによりがん遺伝子変異の作用を変化・制御できる可能性をしめした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hashimoto K, Yamada Y, Semi K, Yagi M, Tanaka A, Itakura F, Aoki H, Kunisada T, Woltjen K, Haga H, Sakai Y, Yamamoto T, Yamada Y, Proc Natl Acad Sci U S A. ,査読有, 2017 Jan 24;114(4):758-763. doi: 10.1073/pnas.1614197114. Epub 2017 Jan 5.

〔学会発表〕(計 3 件)

橋本 恭一 他、日本外科学会定期学術集会、2016

橋本 恭一 他、大腸癌研究会、2017

橋本 恭一 他、日本外科学会定期学術集会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

所属研究機関名：なし

部局名：なし

職名：なし

研究者番号(8桁)：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山田 泰広

ローマ字氏名：Yamada Yasuhiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。