

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09369

研究課題名(和文) ヒト癌におけるFBXW7ホットスポット変異の癌発生進展における役割

研究課題名(英文) Role of cancer-associated FBXW7 hotspot mutation in carcinogenesis

研究代表者

池上 恒雄 (Ikenoue, Tsuneo)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80396712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌における FBXW7 のホットスポット変異の生体内での作用を明らかにするため、独自に開発したFbxw7R468C変異条件的ノックインマウスを2種類の大腸腫瘍発生マウスモデル(染色体不安定性の腫瘍を生じるモデルとマイクロサテライト安定性の腫瘍を生じるモデル)に交配し、Fbxw7変異をヘテロで導入した。また、Fbxw7変異とFbxw7欠損の作用の比較のために2種のマウスモデルにFbxw7条件的ノックアウトマウスを交配し、Fbxw7をヘテロで欠損するマウスも作製した。その結果Fbxw7R468C変異はFbxw7ヘテロ欠損よりも腫瘍発生を促進し、ドミナントネガティブ効果を有す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

FBXW7変異は大腸癌、胆管癌などで比較的高率に変異を認め、変異はFBXW7の遺伝子配列上の3か所に集中している。FBXW7遺伝子の癌化における働きの研究はほとんどがFBXW7変異を細胞株に導入したり、マウス個体にFBXW7の欠損を導入するという手法を用いており、マウス個体においてヒトの癌で見られるFBXW7変異を導入してその発癌における役割を調べた研究はほとんどない。本研究はマウス個体にヒトで最も高頻度に見られるFBXW7R468C変異(マウスではR468C変異に相当)を導入して発がんへの影響を調べており、FBXW7変異癌の発癌メカニズムの解明、治療法の開発に有益と考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate roles of cancer-associated FBXW7 hotspot mutation in colorectal carcinogenesis, we introduced Fbxw7R468C mutation in two mouse models of colorectal cancer. One is a chromosomal instability-related model in which heterozygous Apc deletion is induced using the CDX2P-Cre mice. The other is a microsatellite instability-related model in which homozygous Apc deletion is induced using the CDX2P-polyG-Cre mice. We generated CDX2P-Cre;Apcflox/+; Fbxw7R468C/+ and CDX2P-polyG-Cre;Apcflox/flox;Fbxw7R468C/+ mice. Furthermore, we compared the phenotype of these mice with the counterparts whose Fbxw7 alleles were both wild-type or heterozygously knocked out.

Mice carrying colon-specific Fbxw7R468C/+ allele developed larger number of polyps and showed shorter survival time compared with those carrying colon-specific heterozygous Fbxw7 knockout allele and intact Fbxw7 alleles. These results suggest that Fbxw7R468C mutant has a dominant-negative effect in this context.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸がん

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト癌では様々な癌抑制遺伝子の変異が見られるが、癌で見られるそれらの変異の多くはミスマッチ変異であり、発癌に及ぼす影響が遺伝子欠失とは異なることが示されている。代表例としては TP53 や PTEN があり、これらの遺伝子の癌で好発するミスマッチ変異がドミナントネガティブ効果を示し、遺伝子欠失よりもさらに強力な癌化促進作用を有していることが、*in vitro*での生化学的実験のみならず、これらのミスマッチ変異を再現したノックインマウスとノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験系でも検証されている。細胞周期、細胞増殖、アポトーシスなど癌の発生進展に関わる種々の機能をつかさどる多くの細胞内タンパク質の量は、ユビキチンプロテアソーム経路で調節されている。そのため、ユビキチンプロテアソーム経路に関わる遺伝子変異は、癌抑制遺伝子産物の分解亢進や癌抑制遺伝子産物の分解抑制を介して、癌化を促進すると考えられている。

FBXW7 (F-box and WD repeat domain-containing 7) は、SKP1-Cullin-F-box (SCF) 型の E3 ユビキチンリガーゼの構成因子である F-box タンパクの一つで、Myc、CyclinE、c-Jun、Notch1 など種々の癌関連タンパク質の分解をつかさどっている (Nakayama KI, Semin Cell Dev Biol, 2005)。ヒトでは大腸癌、胆管癌、白血病など種々の癌で FBXW7 遺伝子の変異が報告されている。FBXW7 変異の大部分はコドン 465、479 及び 505 の 3 か所に集中しておりホットスポットと呼ばれるが、これらのコドンはいずれも FBXW7 タンパク質が標的基質タンパク質を認識するのに必須なアルギニン残基をコードしている (Welcker M, Nat Rev Cancer, 2008)。これらの FBXW7 遺伝子変異の特徴は、その多くがヘテロ接合型であり、野生型のアレルを保持していることである。生化学的実験により、ホットスポット変異はナンセンス変異による欠失変異やアレルの欠失よりも標的タンパク質の分解活性に強い作用を有し、ドミナントネガティブに近い作用を有することが示唆されている。しかし、これらのホットスポット変異の生体内での機能はほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

我々はヒト癌における FBXW7 のホットスポット変異の生体内での作用を明らかにするため、ヒト癌で最も高頻度に見られる R465C 変異 (マウスでは R468C に相当) を再現する条件的ノックインマウス (Fbxw7<sup>LSL-R468C</sup> マウス) を作製した。このマウスはヒトで見られる FBXW7 の *in vivo*での機能解析に有用である。本研究では独自に開発した Fbxw7 変異ノックインマウスを大腸がんマウスモデル mRNA に導入し、この変異の *in vivo*での大腸癌発生進展における役割を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

Hinoi らが作製した大腸特異的 Apc ノックアウトマウス CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup> はマイクロサテライト安定性と染色体不安定性を有するヒト大腸癌マウスモデルである。また、同じく Hinoi らが作製した CDX2P-polyG-Cre;Apc<sup>flox/flox</sup> マウスはマイクロサテライト不安定性によって生じるヒト大腸癌のマウスモデルと考えられている。また、これらの大腸癌マウスモデルに我々が作製した Fbxw7R468C 変異条件的ノックインマウス (Fbxw7<sup>LSL-R468C</sup>) あるいは Fbxw7 条件的ノックインマウス (Fbxw7<sup>flox</sup>, Iannis Aifantis 博士より供与) を交配することにより、それぞれの大腸癌マウスモデルの大腸腫瘍発生における Fbxw7 変異または欠損の影響を検討する。また、各腫瘍より RNA、タンパク質を抽出し、遺伝子発現及びタンパク質発現を解析することにより、Fbxw7 変異または欠損が大腸腫瘍細胞に及ぼす腫瘍促進 (あるいは抑制) の分子メカニズムを検討する。

## 4. 研究成果

CDX2P-Cre マウスを用いて大腸特異的に Apc 遺伝子をノックアウトした CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup> マウスを用いた場合、Fbxw7R468C 変異を導入することにより作製された CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup>;Fbxw7<sup>R468C/+</sup> マウスの生存期間は、CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup> マウスや Fbxw7 をヘテロでノックアウトした CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup>;Fbxw7<sup>flox/+</sup> マウスの生存期間よりも有意に短かった。これにより、Fbxw7R468C 変異は野生型 Fbxw7 やヘテロノックアウトよりも大腸腫瘍を促進することが示唆された。また、生じるポリープの数を計測したところ、CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup>;Fbxw7<sup>R468C/+</sup> に生じたポリープ数は、CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup> マウス及び CDX2P-Cre;Apc<sup>flox/+</sup>;Fbxw7<sup>flox/+</sup> マウスに比して有意に多いことが明らかとなった。

一方、CDX2P-polyG-Cre マウスを用いてマイクロサテライト不安定性依存的に遺伝子改変するシステムを用いた CDX2P-polyG-Cre;Apc<sup>flox/flox</sup> マウスにおいても Fbxw7R468C 変異をヘテロで導入した CDX2P-polyG-Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Fbxw7<sup>flox/+</sup> マウスは CDX2P-polyG-Cre;Apc<sup>flox/flox</sup> マウス及び CDX2P-polyG-Cre;Apc<sup>flox/flox</sup> マウスに Fbxw7 ノックアウトをヘテロで導入した CDX2P-polyG-Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Fbxw7<sup>flox/+</sup> マウスよりも有意に生存期間が短く、生じるポリープ数が多かった。これらの結果から Fbxw7R468C 変異は大腸特異的 Apc 遺伝子欠損マウスにおける腫瘍発生においてドミナントネガティブ効果を有していることが示唆された。

次にそれぞれの遺伝子型のマウスに生じた腫瘍の組織学的検討を行なった。HE 染色では腫瘍の病理組織像において Fbxw7 の遺伝子型 (野生型, Fbxw7R468C/+, ヘテロノックアウト) による明らかな違いは認めず、Wnt シグナル活性化の指標である beta-catenin の核染色においても明

らかな違いは認めなかった。また、ユビキチンリガーゼ Fbxw7 の分解基質として知られた Myc, Cyclin E, Notch1 の免疫組織化学染色においても遺伝子型による相違は明らかではなかった。一方、腫瘍から抽出したタンパク質を用いたウエスタンブロットティングでは Fbxw7<sup>R468C</sup> 変異を導入されたマウスの腫瘍では Fbxw7 が Wt であるマウスや Fbxw7 がヘテロでノックアウトされたマウスの腫瘍に比して Klf5 及び Tgif1 の発現増加を認めた。一方、Myc, CyclinE, Notch1 はウエスタンブロットティングでも免疫染色同様に Fbxw7R468C 変異導入による明らかなタンパク質発現の増加は認めなかった。また、このとき Real-time PCR では *Klf5* 及び *Tgif1* mRNA の発現は Fbxw<sup>R468C</sup> 変異を導入したマウス腫瘍と Fbxw7 Wt や Fbxw7 ヘテロノックアウトのマウス腫瘍では差は見られず、Fbxw<sup>R468C</sup> 変異を導入されたマウス腫瘍での Klf5 及び Tgif1 タンパク質の増加はタンパク質の安定化によることが示唆された。

以上の結果から Fbxw7<sup>R468C</sup> 変異はドミナントネガティブ効果により、Klf5, Tgif1 等のタンパク質の安定化を来し、大腸腫瘍の発生を促進することが示唆された。しかしながら、Klf5, Tgif1 による腫瘍発生促進メカニズムやそれら以外の腫瘍発生促進分子についての探索も今後進めていくべき課題であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohsugi T, Kiyoshi Yamaguchi K, Zhu C, Ikenoue T, Takane K, Shinozaki M, Tsurita G, Yano H, Furukawa Y	4. 巻 38
2. 論文標題 Anti-apoptotic effect by the suppression of IRF1 as a downstream of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 6051-6064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0856-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita H, Hayakawa Y, Konishi M, Hata M, Tsuboi M, Hayata Y, Hikiba Y, Ihara S, Nakagawa H, Ikenoue T, Ushiku T, Fukayama M, Hirata Y, Koike K.	4. 巻 247
2. 論文標題 Three types of metaplasia model through Kras activation, Pten deletion, or Cdh1 deletion in the gastric epithelium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 35-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5163.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikenoue T, Terakado Y, Zhu C, Liu X, Ohsugi T, Matsubara D, Fujii T, Kakuta S, Kubo S, Shibata T, Yamaguchi K, Iwakura Y, Furukawa Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Establishment and analysis of a novel mouse line carrying a conditional knockin allele of a cancer-specific FBXW7 mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19769-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohsugi T, Yamaguchi K, Zhu C, Ikenoue T, Furukawa Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Decreased expression of interferon-induced protein 2 (IFIT2) by Wnt/ -catenin signaling confers anti-apoptotic properties to colorectal cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 100176-100186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.22122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi K, Zhu C, Ohsugi T, Yamaguchi Y, Ikenoue T, Furukawa Y.	4. 巻 114
2. 論文標題 Bidirectional reporter assay using HAL promoter and TOPFLASH improves specificity in high-throughput screening of Wnt inhibitors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 2868-2882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.26394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi R, Yamaguchi K, Ikenoue T, Terakado Y, Ohta Y, Yamashita N, Kainuma O, Yokoi S, Maru Y, Nagase H, Furukawa Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Genetic alterations in Japanese extrahepatic biliary tract cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 877-884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.6224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhu C, Yamaguchi K, Ohsugi T, Terakado Y, Noguchi R, Ikenoue T, Furukawa Y	4. 巻 108
2. 論文標題 Identification of FERM domain-containing protein 5 as a novel target of $\beta$ -catenin/TCF7L2 complex.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 612-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大杉 友之、山口 貴世志、池上 恒雄、高根希世子、篠崎 大、釣田 義一郎、古川洋一
2. 発表標題 大腸癌においてWnt/beta-カテニンシグナルはインターフェロン制御因子1(IRF1)を制御する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoshi Yamaguchi, Tomoyuki Ohsugi, Kiyoko Takane, Tsuneo Ikenoue, Yoichi Furukawa.
2. 発表標題 Wnt/beta-catenin signaling controls interferon regulatory factor 1 (IRF1) in colorectal cancer cells.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上 恒雄、寺門 侑美、劉 洵、高根 希世子、山口 貴世志、古川洋一
2. 発表標題 Context-dependent induction of distinct liver tumors in mice with Kras activation and Pten inactivation
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 洵、池上 恒雄、寺門 侑美、朱 赤、大杉 友之、松原 大祐、藤井 智明、角田 茂、久保 幸子、柴田 琢磨、山口 貴世志、岩倉 洋一郎、古川洋一
2. 発表標題 新規FBXW7癌特異的変異条件的ノックインマウスの樹立と解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	古川 洋一  (Furukawa Yoichi)  (20272560)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	