

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09229

研究課題名(和文) p53変異に着目したEMAST型進行大腸癌の悪性化モデルの構築

研究課題名(英文) Identification of responsible genes for advanced colorectal cancer: Development of in vitro system that mimics EMAST-related tumor-progression regulated by p53.

研究代表者

有田 通恒 (Arita, Michitsune)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80307719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 進行大腸癌ではゲノム不安定性EMASTの有無と予後に高い相関が見られることから、細胞株でEMASTを誘導できれば、悪性化因子の探索の実現が期待できる。このコンセプトに基づき、本研究では1)高率なEMAST誘導条件の確立と、2)培養細胞での簡便なEMAST判別法の開発を行った。1)では、これまでに見いだしていた低酸素環境とp53の機能異常に加え、高細胞密度とすることでEMAST発生率が上昇することが分かった。さらに、EMAST発生に寄与すると考えられるp53の分子特性も見いだした。一方、2)については遂行中に計画の見直しが必要となり、今後の課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、散発性大腸癌の悪性度とEMASTとの強い相関性に着目し、実験的EMAST誘導培養系を用いたEMAST関連悪性化機構の解明を試みた。研究期間中に、細胞密度を高く維持することでEMAST誘導高率を上げられること、ならびに、癌抑制分子p53にはゲノム上のEMASTマーカー領域に結合して安定性に寄与する可能性があることを明らかにした。反面、当初計画した簡便で迅速なEMAST検出法の開発が予定通りに進まず課題を残した。今後の進捗により検出法を確立すれば、本研究で見いだしたp53の新たな分子特性を生細胞で評価でき、p53を介したEMAST関連悪性化機構の解明が大きく進むと期待できる。

研究成果の概要(英文)： Advanced colorectal cancers (CRCs) showing an elevated microsatellite alterations at selected tetra-nucleotide repeats (EMAST) correlates poor prognosis, suggesting that in vitro induction of EMAST in CRC cell lines should achieve to identify molecules relating to EMAST-associating malignancy. Based on the idea, we performed 1) improvement of culture condition inducing EMAST in CRC cells with higher rate and 2) establishment of high-throughput EMAST-detecting system using genome-edited cell lines. For culture condition, in addition to hypoxia and p53-deficiency which have been revealed to generate EMAST, we identified high-density of cells as additive factors to make higher rate of EMAST positive cells. Additionally, we found important clue of a molecular mechanism by which p53 contributes to EMAST generation. On the other hand, for an EMAST-detecting system, it remained to be continued due to unexpectedly modification of strategy.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：EMAST DNAミスマッチ修復 低酸素 p53 進行大腸癌

1. 研究開始当初の背景

散発性大腸癌は、同一組織内でさえ複数の遺伝子変異系統の細胞集団が混在する多様性の高い癌種である。切除不能な進行大腸癌の克服には、再発・転移を司る様々な分子の特定に加えて、一様ではない患者を治療戦略ごとに分類できる層別化マーカーの開発が喫緊の課題であることは、研究計画当初も現在も変わっていない。そのような背景のもと、我々は散発性大腸癌の多様な悪性化機構をひとつひとつ解明する必要性を感じ、大腸癌特有の悪性化モデルの開発を目標に掲げた。そこで着目したのが、散発性大腸癌の悪性度と高い相関性を示す Elevated microsatellite alterations at selected tetra-nucleotide repeats (EMAST) であった。

EMAST はゲノム不安定性のひとつであるマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability, MSI) の一様式であり、4塩基反復配列に異常が集中し、1塩基反復配列は正常であることが特徴である。1塩基や2塩基反復配列も異常となる高度な MSI (MSI-high) とは異なる様式として定義される。もし細胞株での EMAST を実験的に誘導できれば、これら細胞を散発性大腸癌の臨床で見られる予後不良性細胞群と見做し、悪性化因子の探索対象として利用できる。このコンセプトに基づき、本研究では、計画立案時にすでに掴んでいた EMAST 誘導条件をさらに掘り下げて、低酸素性 EMAST 発生機構の解明と、そこに立脚した EMAST 型進行大腸癌の悪性化因子探索系の構築に着手した。

2. 研究の目的

本研究計画を立ち上げるまでに掴んでいた EMAST 誘導必須条件はふたつあった。「7日間の連続した低酸素培養」と「p53 遺伝子の異常」である。主に転写因子として癌抑制に働く p53 が低酸素性の EMAST 発生にどのように働くのか。この疑問が解ければ、実験的 EMAST 誘導系を利用した悪性化モデルの構築と悪性化因子探索に、分子レベルでの根拠を持って臨める。そこで、本研究の目的のひとつを「低酸素性の EMAST 発生における p53 の役割を分子レベルで解明すること」とした。

実験的低酸素性 EMAST 誘導には p53 変異が必要であるものの、散発性大腸癌の臨床例で見られる EMAST と p53 との間には相関性が見いだされていない。これら相反する事実から想起されたのが「EMAST 発生は p53 の機能異常の種類に依存する可能性」である。実際、臨床腫瘍では p53 機能の欠失のみならず亢進に繋がる変異も見いだされるが、EMAST-p53 相関性に関するこれまでの報告では変異の分類はなされていない。低酸素条件下で種々の p53 変異を共存させ EMAST 発生の有無を整理すれば、p53 変異を EMAST 誘導能の有無で分類でき、低酸素性 EMAST 発生における p53 の役割の解明に繋げうる。そのためには、従来の EMAST 検出法に替わり、本研究に特化した手法が必要である。

従来、EMAST の判定はその定義に基づいて次のように行ってきた。1) 低酸素培養後の細胞集団を 1細胞ずつに分けて 1細胞由来のクローン集団を得る、2) 各クローンのゲノムについて、EMAST 判定マーカーである 4塩基リピートと EMAST 除外マーカーである 1塩基リピートの配列長を調べる。すなわち、クローニングに係る時間、発生効率算出に必要なクローン数 (100 程度)、ゲノム抽出から結果判定までに係る時間などの時間的コストが研究遂行のボトルネックとなっていた。さらに、従来法には生細胞解析が実質的に不可能である重大な欠点もあった。これら欠点を解消し、実用的な悪性化モデル構築を可能とするために、本研究計画では、ゲノムに EMAST 判定レポーター遺伝子を組み込んだレポーター細胞株を用いた「ハイスループットな EMAST 判定法の構築」も合わせて行った。

3. 研究の方法

本研究では、ふたつの目的、「① 低酸素性 EMAST 発生における p53 の役割の解明」と「② ハイスループットな EMAST 判定法の構築」を達成するため、以下の方法を計画し実施した。なお、①の p53 の役割解明には②の新規判定法の構築が不可欠であるが、それには少なくとも 1年は必要と見積もられた。また、実施に伴い、②の計画にはいくつかの改善点が必要であることも明らかとなった。したがって、実際の計画では、②と並行しながら①にも着手し、従来法に加えて、新たな EMAST 判定法に依存しない視点からの解析法も用いて、p53 の役割の検討を行った。以下には、これら改善点や別の解析法も含まれる。

① 低酸素性EMAST発生におけるp53の役割の解明

1) p53変異体の作製と評価

EMAST 発生における p53 変異の重要性は、大腸癌細胞株 HCT116+3+5 (p53 野性型) と

SW620 (p53 変異型) を用いて見いだした。SW620 の変異の種類は機能獲得型であるが、大腸癌での p53 変異もまた約 7 割が機能獲得型と報告されている。そこで、大腸癌で既知の変異を機能獲得型を中心に分類し、それぞれの代表的な変異を有する変異体系列の作製を行った。

ところで、EMAST の発生に p53 が寄与するとすれば、その関与の仕方には EMAST 判定マーカー (すなわち 4 塩基リピート) での異常発生頻度に影響する場合と、生じた異常の修復効率に影響する場合とが考えられる。そこで、変異体の作製とは別に、前者を評価する「p53 野生型と欠失型とでの EMAST 発生率の比較」と、後者を評価する「EMAST 判定マーカーに対する p53 分子結合の解析」も以下のように行った。

2) p53野生型と欠失型とでのEMAST発生率の比較

新規 EMAST 判定法の進捗を待つ間の暫定的な解析として、野生型 p53 分子の有無による EMAST 判定マーカーの不安定性の変化、すなわち、4 塩基リピートでの異常の蓄積に野生型 p53 分子の有無がどのように影響するかを調べた。用いたのは、p53 野生型かつ DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair, MMR) 欠損型の細胞株 HCT116 と比較対象細胞株 HCT116(p53 null) である。HCT116 および HCT116(p53 null) の MMR 欠損は EMAST 原因遺伝子である MSH3 に加えて、MSI-high の原因遺伝子 MLH1 の欠失に起因する。そのため、通常の培養下でも 4 塩基リピートと 1 塩基リピートはいずれも異常となり、かつ、これら異常が一切修復されない。したがって、純粋に 4 塩基リピートや 1 塩基リピートでの異常の頻度を評価できる。そこで、これら細胞株を低酸素とした場合に、どのリピート配列での異常頻度が増加するか、変化する場合、p53 の有無で異なるかを比較した。

3) EMAST判定マーカーに対するp53分子結合の解析

p53 の影響が低酸素で生じた異常の修復効率に対するものならば、p53 分子は直接的もしくは間接的に異常リピート配列に相互作用すると考えられる。そこで、通常酸素もしくは低酸素培養で培養した細胞のゲノム DNA を抽出し、4 塩基リピートや 1 塩基リピート配列に p53 が結合しているかをクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 法で解析した。対象とする細胞は、p53 が野生型の HCT116 に MLH1 と MSH3 遺伝子を補完した細胞株 HCT116+3+5 を用いた。

② ハイスループットEMAST判定法の構築

EMAST の定義のひとつ「4 塩基反復配列の異常」は「配列長の異常 (配列長の短縮や伸長)」として検出される。反復配列での短縮や伸長は繰り返し単位で起きやすいため、4 塩基反復配列の場合は 4 塩基の挿入もしくは欠失が生じる。この性質を利用して、予め翻訳の読み枠を 4 塩基分だけずらした 4 塩基反復配列を蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の upstream に直接連結させたレポーターカセットを準備した。このカセット配列をゲノムに組み込むことで、EMAST レポーター細胞株の構築を行った。なお、EMAST 誘導条件はこれまでに特定した「低酸素培養」と「p53 機能欠失細胞株」とすることに変更はないものの、従来法での EMAST 判定ではこの条件による EMAST 陽性率が 2% 程度と極めて低いことが分かっている。この陽性率を少しでも高めることは、今後の新規判定法でも有用となる。そこで、既知の二要素に加わる EMAST 高率化条件の検討も試みた。具体的には、低酸素が固型腫瘍に特有の腫瘍塊内部の微小環境であることを考慮して、血流が不足した腫瘍塊内部と関連する細胞密度について EMAST 陽性率に与える影響を検討した。

4. 研究成果

① 低酸素性EMAST発生に対するp53の役割の解明

1) p53変異体の作製と評価

各種変異を有する cDNA を組み込んだ変異体発現プラスミドを作製したが、これら評価には新規 EMAST 判定法が不可欠である。②に後述するように、研究期間内に判定法の構築には至らなかったため、変異体の評価についても保留としている。

2) p53野生型と欠失型とでのEMAST発生率の比較

方法の項に記載したように、p53 変異の EMAST 発生への関与については、EMAST 配列での異常の起きやすさとその後の修復のされ難さを考える必要がある。前者を検討するため、p53 は野生型だがマイクロサテライト配列異常の修復を担う DNA ミスマッチ修復 (MMR) 機構は欠失した細胞株 HCT116 と、その亜株で p53 も欠失した HCT116(p53 null) を用いて、EMAST 配列とそれ以外のマイクロサテライト配列での異常発生頻度を比較した。その結果、2 つの株ではどちらも低酸素により EMAST 配列での異常頻度が高くなる傾向を示した (表 1、太字網掛け

部分)。つまり、低酸素が EMAST 配列での異常を起し易くすると考えられた。一方で、EMAST を誘導する培養条件を確立する過程で、MMR 機能が野生型の細胞株は p53 が異常であっても通常酸素濃度では EMAST とならず、低酸素下でのみ EMAST となることを見いだしている。これらの結果を考え合わせると、p53 の変異は通常酸素濃度下での MMR 効率には影響しないが、低酸素下での効率は低下させると考えられる。つまり、低酸素では EMAST 配列での異常が起きやすく、かつ、p53 変異細胞ではその修復効率が低下するために EMAST となる可能性が示唆された。

表 1. 野生型p53の有無による1塩基ないし4塩基リピートの異常頻度と低酸素の影響

細胞株	MMRの機能	野生型p53の発現	O ₂ %	解析したクローン数	MSI陽性クローン数	
					1塩基 (%)	4塩基 (%)
HCT116	-	+	21	24	18 (75.0)	5 (20.8)
			0.1	26	17 (65.4)	8 (30.8)
HCT116(p53 null)	-	-	21	24	21 (87.5)	3 (12.5)
			0.1	14	9 (64.3)	4 (28.6)

3) EMAST判定マーカーに対するp53分子結合の解析

2) の解析から「p53 変異は低酸素下で生じた EMAST 配列異常の修復を抑制する可能性」が示唆された。これは、異常となった EMAST 配列に p53 がなんらかの形で相互作用する可能性を示す。そこで、クロマチン免疫沈降法を用いて、マイクロサテライト配列への野生型 p53 の結合を調べた。その結果、1 塩基、2 塩基、ないし 4 塩基反復配列の一部で p53 分子の結合が認められた (図 1)。さらに、EMAST 誘導条件である低酸素下では、特に 4 塩基反復配列で p53 結合が強まることも分かった (図 2)。これらの結果は、p53 がこれら反復配列に結合することを示すのみで、その後の修復への影響については不明である。しかし、EMAST 配列を含むマイクロサテライトの異常修復は MMR 機構が担うことは周知だが、p53 が MMR に関わることは知られていない。もし、今後の解析により、p53 の結合が MMR の修復効率に寄与することが明らかとなれば、臨床でのマイクロサテライト不安定性の表現型検査でも p53 変異を加味した判断が求められる。p53 変異は原発部位を問わずほとんどのがんで認められることから、本研究の進捗が内包する波及効果は散発性大腸癌に留まらない。次項の新規 EMAST 判定法の構築、ならびに前述の p53 変異体の評価の達成に係る責務は重い。

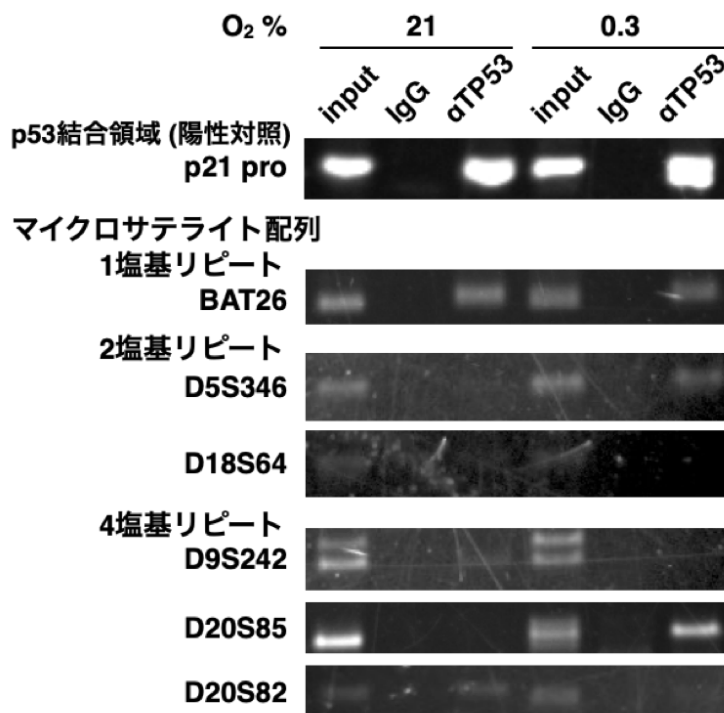


図 1. マイクロサテライト配列へのp53結合の有無と低酸素培養による結合度合いの変化
αTP53の列でバンドが認められれば該当するリピート配列にp53が結合していることを示す。また、バンドの濃さは相対的な結合度合いを示す。なお、Inputの列でのバンドの有無は検出の正否を示し、IgGの列でバンドがないことは誤った検出がないことを示す。

② ハイスループットEMAST判定法の構築

EMAST レポーター細胞株を作製するべく、研究計画に従って準備したレポーターカセットを標的細胞内で発現させ、レポーターとしての予備評価を行った。しかし、本来であれば GFP 遺伝子が発現しない EMAST レポーター細胞株でも GFP 発現が検出された。原因として、レポーターカセット内での意図せぬ翻訳開始点の存在が考えられた。解決のために EMAST レポーターの遺伝子構成を見直し、翻訳開始点となりうる塩基配列や EMAST 配列とレポーター遺伝子 GFP との間のスペーサーを変更するなど、いくつかの改善策を講じた。研究期間中に改良系の検証には至らなかったものの再構築の目処は立っており、本研究で得られた結果は既に着手している後続の研究計画に大きく貢献すると評価できる。

一方、従来からの懸念であった EMAST 陽性率の低さの改善のため、細胞密度が EMAST 陽性率に与える影響を検討した。その結果、低酸素培養時の細胞密度を高くすることで、陽性率が高くなることを見いだした。低酸素は固型腫瘍に特有の微小環境であり、腫瘍塊内部の血流不足が原因である。高い細胞密度はいわばこうした腫瘍環境を模したものと考えられ、EMAST 誘導条件の臨床再現性がより高まったと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 有田 通恒、渡部 洋	4. 巻 87
2. 論文標題 分子標的薬の基礎：DNAミスマッチ修復	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 17-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arita Michitsune, Koike Junichi, Yoshikawa Nobuji, Kondo Motonari, Hemmi Hiromichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Licochalcone A Inhibits BDNF and TrkB Gene Expression and Hypoxic Growth of Human Tumor Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 506～518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21020506	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有田通恒
2. 発表標題 上皮性卵巣癌におけるDNAミスマッチ修復異常の解析
3. 学会等名 第62回 日本婦人科腫瘍学会学術講演（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------