

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：34424

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07616

研究課題名(和文) 分泌系細胞が大腸がん浸潤に果たす役割の解明

研究課題名(英文) A role of secretory cells in colorectal cancer invasion

研究代表者

山崎 大輔 (Yamazaki, Daisuke)

梅花女子大学・食文化学部・准教授

研究者番号：50422415

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)：Apcはがん抑制遺伝子であり、その不活性化は大腸でのポリープ形成を引き起こす。大腸上皮におけるAPCの役割を解析するために、CRISPR/Cas9システムを利用してマウス大腸上皮細胞でApc遺伝子をKOした。Apc KO細胞を三次元培養したところ、野生型細胞と同様に球形のオルガノイドを形成したが、細胞の増殖速度が低下する一方で細胞のサイズが増加していた。また、Apc KOオルガノイド中では、大腸には存在しないリゾチーム陽性の細胞が異所的に出現した。これらの結果は、大腸上皮細胞の細胞分化における新たなAPCの役割を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APCは大腸発がんの鍵となる分子であり、大腸上皮細胞でどのような役割を果たしているのかを明らかにすることは、大腸発がんの分子機序を理解する上で重要である。今回、APCには大腸上皮細胞のサイズを制御すること、そしてリゾチームを発現する細胞への分化を妨げるという新たな役割があることがわかった。

がん浸潤メカニズムの解明は重要な課題だが、Apcヘテロ欠損マウスの解析から、ポリープが浸潤性を獲得する過程でリゾチーム陽性細胞の数が増えること、そしてその細胞は浸潤性をもつことがわかった。この結果は、「特定方向へとがん細胞が分化することで浸潤性を獲得する」という新たな浸潤性獲得機能の存在を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Adenomatous polyposis coli (APC) is a tumor-suppressing protein whose inactivation triggers the formation of colorectal polyps. To analyse the role of APC in colon epithelia, I deleted Apc gene in mouse colon epithelial cells using CRISPR/CAS9 system. When cultured in three-dimensional gels, Apc KO cells formed spherical organoids like wild-type cells. However, a significant decrease in proliferating speed and an increase in cross-sectional area of cells were seen in Apc KO organoids. Furthermore, depletion of Apc promoted the ectopic differentiation of lysozyme-positive cells, suggesting a novel role of APC in cellular differentiation in colon epithelia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：大腸がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管に多数のポリープを形成する *Apc* 遺伝子ヘテロ欠損 ( $Apc^{\Delta14/+}$ ) マウスで *Cnnm4* 遺伝子を欠失させた (KO) とし、約半数のポリープが筋層へと浸潤する腺がんとなっており、*CNNM4* が大腸がんの浸潤を抑えていることがわかっていました。しかし *CNNM4* 欠損ががんの浸潤を促進する分子機序は不明である。

(2)  $Apc^{\Delta14/+}, Cnnm4$  KO マウスの腺がんを構成する細胞の半数以上は分化マーカーを発現しない未分化な細胞であったが、浸潤先端の細胞は分泌系細胞であるパネート細胞のマーカー分子リゾチームを発現していることがわかっていました。

### 2. 研究の目的

(1) がん浸潤においてリゾチームを発現する分泌系がん細胞が果たす役割を明らかにし、「未分化ながん細胞が特定の方向に分化することで浸潤性を獲得する」という仮説を証明する。

(2) *CNNM4* の欠損が、がん細胞の分化や分泌系がん細胞の機能に与える影響を検討することで、「*PRL/CNNM4* による大腸がん転移促進メカニズムの詳細」を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)  $Apc^{\Delta14/+}$  マウスの遺伝的背景を変更することで、寿命が延長され生後一年を超えて生存する個体も確認できるようにし、同一個体において浸潤性を示さない良性のポリープと浸潤性を示す腺がんの違いを検討する

(2) ゲノム編集技術を用いて *Apc* KO 細胞を作製し、*Apc* 遺伝子の欠損が腸上皮細胞にどのような影響を与えるのか、細胞生物学的な解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) 分泌系がん細胞は、 $Apc^{\Delta14/+}, Cnnm4$  KO マウスの腸に形成されたポリープの中でも浸潤性を示す腺がんにより多く見られた。このことは、ポリープが浸潤性を獲得する過程で分泌系がん細胞が生み出される可能性を示しているが、*Cnnm4* 遺伝子の欠損がそれに寄与しているかは不明であった。そこで *Cnnm4* 遺伝子が欠損していない  $Apc^{\Delta14/+}$  マウスでもポリープの浸潤性獲得に伴って分泌系がん細胞が出現するのかが検討された。 $Apc^{\Delta14/+}, Cnnm4$  KO マウスでは 8 ヶ月齢で約半数のポリープが浸潤性を獲得するのに対して、 $Apc^{\Delta14/+}$  マウスではその割合が低いので、より高齢のマウスでの解析を試みた。C57BL6 マウスの遺伝背景を持つ  $Apc^{\Delta14/+}$  マウスは 10 ヶ月齢でほぼ全てのマウスが死んでしまうので、比較的体格が良い ICR マウスと  $Apc^{\Delta14/+}$  マウスを交配させたところ、寿命が延長され生後一年を超えて生存する個体も確認できるようになった。そこで 10 ヶ月齢を超えたマウスの腸から腫瘍を回収したところ、個体によっては半数以上の腫瘍で筋層への浸潤が確認された。このように、この系統のマウスを利用すれば腸に形成されるポリープが加齢により悪性化する様子を観察できることがわかった。

この系統のマウスの腸では、同一個体において浸潤性を示さない良性のポリープと浸潤性を示す腺がんが共存することから、両者の違いをマウスの個体差を無視して検討できるという利点がある。そこで、同一個体から回収したポリープと腺がんにおいて分泌系がん細胞の存在を比較したところ、 $Apc^{\Delta14/+}, Cnnm4$  KO マウスの場合と同様に腺がんではポリープと比較してリゾチームを発現する細胞の数が増えていることがわかった。この結果から、ポリープの浸潤性獲得に伴うリゾチーム陽性細胞の出現は、*Cnnm4* KO マウスだけでみられる現象というよりは、*Apc* 遺伝子の欠損を端緒として形成される腸管ポリープが悪性化する過程で広く認められるものだと考えられる。

また、腺がんではリゾチームを発現する細胞が筋層への浸潤部位に集積しているだけでなく、このリゾチーム陽性細胞の一部は腫瘍組織を離れ個々に筋層内に散らばっていた。この結果は、リゾチーム陽性細胞がまさに腺がんの浸潤を引き起こすがん細胞である可能性を示している。

(2) 上述の結果から、リゾチーム陽性がん細胞が腸管ポリープの悪性化に関与している可能性が示唆されたので、 $Apc^{\Delta14/+}$  マウスの腸より回収したポリープや腺がんを三次元ゲル内でオルガノイド培養し、分泌系がん細胞の振る舞いを観察した。ポリープや腺がんを構成するほとんどの

がん細胞は違いに接着し球状のオルガノイドを形成したが、ポリープに由来する細胞を培養した場合と比較して、浸潤性の腺がん由来する細胞を培養した場合には、オルガノイド中により多くのリゾチーム陽性細胞が含まれていた。これは、上述した組織観察の結果と矛盾していない。また、腺がん由来のオルガノイドでは、リゾチーム陽性細胞の一部がオルガノイドの球状構造の外側へと離脱し周囲のゲル内へと浸潤する様子が観察された。オルガノイドの外側は上皮細胞の基底側に相当するため、リゾチーム陽性細胞は他のがん細胞が作るオルガノイドの上皮構造の基底側からゲル内へと浸潤したと考えられる。

がん細胞が浸潤性を獲得する機構として上皮間葉転換が知られているので、これらの細胞で上皮細胞の細胞間接着分子 E-cadherin の発現を調べた。オルガノイドの上皮層を形成している細胞では、E-cadherin の発現がみられたのに対して、離脱したリゾチーム陽性細胞では E-cadherin の発現が顕著に減少しており、上皮間葉転換を起こしていることが示唆された。

以上の結果から、リゾチーム陽性細胞には上皮間葉転換を起こし周辺組織へと浸潤する能力があることがわかった。

(3) リゾチーム陽性細胞がポリープの悪性化に伴い生み出される分子メカニズムを明らかにするため、*Apc*<sup>Δ14/+</sup>マウスの腸より回収した腺がんをオルガノイド培養して、リゾチーム陽性細胞の単離を試みた。腺がん由来するオルガノイドには培養開始当初、リゾチーム陽性細胞が多く含まれていたが、それらを単一の細胞に分けた後、それぞれをオルガノイド培養したところ、培養が 2 週間を超えるとリゾチームの発現が急激に低下し、リゾチーム陽性細胞を維持することができなかった。現在のところリゾチーム陽性細胞の培養に必要な条件は見つかっておらず、今後の重要な研究課題である。

こうした状況を踏まえて、がん細胞でリゾチーム陽性細胞への分化を維持するのに必要なシグナルを探索することにした。リゾチーム陽性細胞の数がポリープの悪性化に伴い増えることから、大腸での発がんや悪性化に関与する遺伝子の中にリゾチーム陽性細胞の分化に関与するものがあると考えた。実際、*Apc* 遺伝子は**大腸がんの約 8 割で変異が見られるが、*Apc* 遺伝子を欠損させたマウスの大腸上皮では、本来発現がみられないリゾチームが異所的に発現していることが報告されている。**そこで、上皮細胞で *Apc* 遺伝子が欠損することがリゾチームの発現につながったことを確認するため、CRISPR/Cas9 システムを利用し大腸上皮細胞で *Apc* 遺伝子を欠損させたところ、*Apc* 遺伝子の欠損によりリゾチーム発現細胞が出現した。しかし *Apc* KO 細胞の中でリゾチームを発現している細胞は全体の 1% 以下であった。

大腸がんでは、*Apc* 遺伝子の変異を端緒として、多数の遺伝子に変異が起こることのでがんが進行する多段階発がんモデルが支持されている。そこで *Apc* 遺伝子に加えて大腸がん悪性化への寄与が報告されている遺伝子を同時に欠損させることで、より効率よくリゾチーム発現細胞が生み出されるのではないかと考えた。候補となる遺伝子の中で最も細胞分化に関与する可能性が高い *Smad4* 遺伝子に注目し、CRISPR/Cas9 システムを利用して *Apc, Smad4* 二重遺伝子欠損細胞を作製した。*Apc, Smad4* 二重遺伝子欠損細胞ではそれぞれを単独で欠損した細胞よりもリゾチームの発現が高く、*Smad4* がリゾチーム発現細胞の分化に関与している可能性が示された。

(4) *Apc* 遺伝子の欠損はリゾチーム発現細胞の産生を促進することがわかった。そこで *Apc* 遺伝子の欠損が腸管上皮細胞に与える影響を、上述の *Apc* KO 細胞を用いて検討した。

野生型 (WT) 細胞と *Apc* KO 細胞をオルガノイド培養し、それぞれのオルガノイドの大きさの変化を比較したところ、WT オルガノイドの方が *Apc* KO オルガノイドよりも早く成長していた。こうしたオルガノイドの成長における両者の違いがどのようにして生み出されたのかを知るために、WT 細胞および *Apc* KO 細胞の間で増殖と細胞死を検討した。

両オルガノイドで増殖中の細胞の割合を比較するため、増殖マーカー Ki67 を発現する細胞の割合を調べたところ、Ki67 陽性細胞の割合が WT および *Apc* KO オルガノイドではともに 60% で違いがなかった。そこで BrdU の取り込みを検討したところ、WT オルガノイドの方が *Apc* KO オルガノイドよりも BrdU を取り込んでいる細胞の割合が高かった。これらの結果から、両オルガノイドの間では増殖する細胞の割合に違いはないものの、それら増殖中の細胞が増殖する速度に違いがあることがわかった。一方、細胞死を検討するために切断された Caspase3 陽性細胞の割合を比較したところ、両方のオルガノイドの間でその割合に違いはなかった。以上の結果から、WT オルガノイドに比べて *Apc* KO オルガノイドの成長が遅くなるのは、*Apc* 遺伝子の欠損により細胞の増殖速度が低下することが原因だと考えられる。 APC は Wnt シグナルを負に調節する分子であり、実際に *Apc* KO 細胞では Wnt シグナルが過剰に活性化していることが *Axin2* 遺伝子の発現亢進により確認されている。Wnt シグナルは腸上皮細胞の増殖・維持に必須であるが、過剰な Wnt シグナルの亢進は却って細胞の増殖に負の影響を与えるのかもしれない。

次に細胞自体の形をみるために、WT および *Apc* KO オルガノイドを抗 E-cadherin 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察したところ、WT オルガノイドと比較して *Apc* KO オルガノイドでは、ひとつのオルガノイドに含まれる細胞の数が少ないことがわかった。またその一方で、*Apc* KO オルガノイドに含まれる細胞の方が WT オルガノイドのそれより大きいことがわかった。以上の結果から、*Apc* 遺伝子の欠損により細胞のサイズが大きくなることがわかった。細胞のサイズを制御するシグナルとして mTORC1 シグナルが知られており、その活性化は細胞のサイズを大きくする。APC と mTORC1 の間には機能的相関があることも報告されており、*Apc* KO 細

胞では mTORC1 シグナルの活性化が起きているのかもしれない。

前述の通り、*Apc* KO オルガノイドではパネート細胞のマーカ分子リゾチームの異所的な発現が見られたので、他の上皮細胞の分化マーカ分子の発現を検討した。ゴブレット細胞のマーカ分子として Mucin2、内分泌細胞のマーカ分子として ChromograninA、吸収上皮細胞のマーカ分子としてアルカリホスファターゼの発現をそれぞれ検討したが、WT および *Apc* KO オルガノイドの間で各種マーカ分子を発現する細胞の割合に違いはなかった。したがって、これら細胞分化マーカ分子の中で、リゾチームの発現だけが特異的に *Apc* 遺伝子の欠損により増加することがわかった。通常、WT オルガノイドの培養には Wnt3a を添加するが、それを培地から除くことでオルガノイド中の細胞が細胞分化を開始する。WT オルガノイドでは、Wnt3a の除去によりいずれのマーカ分子を発現する細胞の割合も増加したが、*Apc* KO オルガノイドでは発現細胞の割合が変化するマーカ分子はなかった。Wnt3a の除去により WT オルガノイドでは Wnt シグナルが低下するが、*Apc* KO オルガノイドでは Wnt シグナルが活性化したままであることが原因だと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ryu Kajung, Yoshida Atsushi, Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 47
2. 論文標題 PRL stimulates mitotic errors by suppressing kinetochore-localized activation of AMPK during mitosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 75～87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.22034	査読の有無 有
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 山崎大輔	4. 巻 11
2. 論文標題 Mg2+輸送体CNNM4は大腸での発がんを抑制する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 97～99
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 有
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 Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Okuzaki Daisuke, Yamamoto Nobuhiko, Miki Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Importance of the renal ion channel TRPM6 in the circadian secretion of renin to raise blood pressure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24063-2	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 Yamazaki Daisuke, Hashizume Osamu, Taniguchi Shiho, Funato Yosuke, Miki Hiroaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of adenomatous polyposis coli in proliferation and differentiation of colon epithelial cells in organoid culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83590-6	査読の有無 有
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 Funato Yosuke, Yoshida Atsushi, Hirata Yusuke, Hashizume Osamu, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 55
2. 論文標題 The Oncogenic PRL Protein Causes Acid Addiction of Cells by Stimulating Lysosomal Exocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.08.009	査読の有無 有
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 Hashizume Osamu, Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Excessive Mg <sup>2+</sup> Impairs Intestinal Homeostasis by Enhanced Production of Adenosine Triphosphate and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 20 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2019.7951	査読の有無 有
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 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山崎大輔 三木裕明
2. 発表標題 大腸がん浸潤・転移に関するがん細胞の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎大輔、橋爪修、谷口詩保、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 オルガノイド培養を用いた大腸上皮細胞の増殖および分化におけるAPCの役割の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------