

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06975

研究課題名(和文) TGF-シグナル抑制分子TMEPAIによる消化管腫瘍形成抑制機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of intestinal tumorigenesis by TMEPAI

研究代表者

中野 なおこ (NAKANO, Naoko)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50733218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Apc 716/+マウスおよびTMEPAI KO/Apc 716/+マウスより小腸腺腫を採取し、RNAseqを行った結果、発現誘導に変動のある遺伝子が得られたため、特に発現量に変動のあった遺伝子について検討している。また、Apc 716/+マウスおよびTMEPAI KO/Apc 716/+マウスより小腸オルガノイドを樹立し、増殖能について検討すると、TMEPAI KO/Apc 716/+マウス由来オルガノイドの膨張率が抑制された。現在、各オルガノイドに候補遺伝子を高発現させたオルガノイドを樹立し、腫瘍形成能への影響を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TMEPAI KO/Apc 716/+マウスにおいて、Apc 716/+マウスに比較して消化管腺腫形成が著しく抑制される結果が得られている。APC遺伝子は家族性大腸腺腫症(FAP)の原因遺伝子として単離され、また、APC遺伝子の変異は大腸がんにおいても高頻度に検出されている。さらに、TMEPAIは大腸がんや様々ながんで発現が上昇していることも報告されていることから、TMEPAI遺伝子欠損による消化管腺腫抑制メカニズムを明らかにすることで、新規の消化管腫瘍治療法や抗がん剤開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：We tried RNA sequencing using total RNAs from intestinal epithelial cells between Apc 716/+ and TmepaiKO/Apc 716/+ mice. We could observe about 30 genes whose expressions were different between Apc 716/+ and TmepaiKO/Apc 716/+ mice. At present, We are trying to examine if these genes are involved in loss of tumorigenicity in intestines from TmepaiKO/Apc 716/+ mice. In addition, We established small intestinal organoids from Apc 716/+ and TMEPAI KO/Apc 716/+ mice and examined their proliferative ability, and found that the expansion rate of organoids from TMEPAI KO/Apc 716/+ mice was suppressed. Currently, We are establishing organoids with high expression of candidate genes in each organoid and examining the effect on tumorigenic potential.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：TMEPAI Apc 716/+ ノックアウトマウス 腸オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

TGF- β によって誘導される TMEPAI は、Smad2/3 との結合を TGF- β I 型受容体と競合阻害することで、TGF- β シグナルをネガティブフィードバック機構により抑制する。TMEPAI 遺伝子を欠損させた TMEPAI KO マウスと Wnt シグナルが恒常的に活性化された Apc Δ 716/+ マウスを交配した TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスにおいて、Apc Δ 716/+ マウスに比較して腺腫形成が著しく抑制される結果を得ていたが、そのメカニズムは不明であったことから、このメカニズムを明らかにするために、Apc Δ 716/+ マウスおよび TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスより小腸腺腫を採取し、それぞれの組織から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現を網羅的に解析し、発現に変動のあった遺伝子が得られ、中でも特に発現に変動のあった遺伝子について検討を行っていた。

2. 研究の目的

TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスにおいて、Apc Δ 716/+ マウスに比較して腺腫形成が著しく抑制される結果を得ていたが、そのメカニズムは不明であったことから、メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

オルガノイド研究

1. タモキシフェン (TM) 処理により Apc 遺伝子欠損が起こる Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウスおよび TMEPAI KO/Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウスから腸オルガノイドを作出し、DNA マイクロアレイによって得られた候補遺伝子を高発現または発現抑制し、腸オルガノイドのがん化過程の変化を検討をする。

2. 1)の実験から、候補遺伝子のがん化に関与していることが明らかとなれば、候補遺伝子 KO マウスを作出して TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスと交配、候補遺伝子^hは腸特異的発現トランスジェニックマウスを作出し TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスと交配させ、腫瘍数が増大するか検討する。

4. 研究成果

DNA マイクロアレイで得られた候補遺伝子について、各マウスの小腸粘膜や腺腫を採取し RNA を抽出し qPCR を行った結果、候補遺伝子^hが得られた。加えて、これら候補遺伝子以外にも炎症との関係にも着目し、炎症に関連した遺伝子の発現変動についても検討した結果、Apc Δ 716/+ マウスの腺腫組織に比較して TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスの腺腫組織において発現量が減少する遺伝子^hが得られた。しかしながら、これらの遺伝子の発現変動はばらつきが多く、腺腫の悪性度に依存した結果を見ている可能性があると考え、DNA マイクロアレイで使用した腺腫組織(16 週齢)よりも早い週齢のマウス腸粘膜(10 週齢)を用いて、RNAseq を行い、Apc Δ 716/+ マウスに比較して TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスにおいて発現に変動のある遺伝子について検討し、候補遺伝子^hが得られたため、RNAseq の結果をもとに qPCR を行うなど検討したが、結果にばらつきが多かった。再度、Apc Δ 716/+ マウスおよび TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスの小腸陰窩のみを用いて RNAseq を行い、新たな候補遺伝子^hが 50 種類ほど得られた。これら候補遺伝子について実際に発現量に変動があるかを検討するために qPCR を行った。その結果、得られた候補遺伝子^hのうち、特に Apc Δ 716/+ マウスと TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウス間で発現量に差のあった遺伝子について検討するためにウイルスベクターを作製した。また、Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウスおよび TMEPAI KO/Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウスから腸オルガノイドを樹立し、膨張度について検討したところ、Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウス由来小腸オルガノイドに比較して、TMEPAI KO/Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウス由来小腸オルガノイドの膨張率が抑制される結果を得た。現在、各小腸オルガノイドに候補遺伝子^hを高発現させて膨張率への影響を検討するために準備を行っている。

今回、サンプルを取り直して RNAseq を再検討することになったため、予定よりも研究が進まなかった。また、オルガノイドにウイルスを感染させる方法の樹立にも時間を要してしまった。しかしながら、現在はオルガノイドへのウイルス感染方法も確立でき、RNAseq の結果、候補遺伝子^hも絞られ、また、Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウス由来小腸オルガノイドと TMEPAI KO/Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウス由来小腸オルガノイドの膨張度の比較方法も確立できたことから、今後、TMEPAI KO/Apc^{flox/flox}/Villin-CreER マウス由来小腸オルガノイドに候補遺伝子^hを高発現させることによって、小腸オルガノイドの膨張率が促進するような結果が得られれば、2 の研究方法に記載したように、候補遺伝子 KO マウスを作出して TMEPAI KO/Apc Δ 716/+ マウスと

交配し、TMEPAI KO/Apc^{Δ716/+}マウスではほとんど認められなかった腫瘍数が増大するかを検討するなどの実験を試みることで、TMEPAI によるがん化進展への関与を明らかにできれば、メカニズム解明へとつながると考えている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakano N, Fukuda K, Tashiro E, Ishikawa H, Nagano W, Kawamoto R, Mori A, Watanabe M, Yamazaki R, Nakane T, Naito M, Okamoto I, Itoh S.	4. 巻 171
2. 論文標題 Hybrid molecule between platanic acid and LCL-161 as a yes-associated protein (YAP) degrader.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of biochemistry	6. 最初と最後の頁 631-640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac021	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 Nakano N, Fukuda K, Tashiro E, Ishikawa H, Nagano W, Kawamoto R, Mori A, Watanabe M, Yamazaki R, Nakane T, Naito M, Okamoto I, Itoh S.	4. 巻 0
2. 論文標題 Hybrid molecule between platanic acid and LCL-161 as a yes-associated protein (YAP) degrader.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac021.	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野なおこ、星名梨、内田吉美、伊東史子、渡邊幸秀、武藤誠、加藤光保、伊東進
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanism for intestinal tumorigenesis controlled by TMEPAI family
3. 学会等名 第94回 生化学会学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野なおこ、伊東史子、渡邊幸秀、武藤誠、加藤光保、伊東進
2. 発表標題 Role of the TMEPAI family gene in intestinal tumorigenesis
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野なおこ、田代悦、永野和果、内藤幹彦、伊東進
2. 発表標題 YAPシグナルを標的とした新規抗がん剤の開発
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星名黎、伊東進、中野なおこ
2. 発表標題 TMEPAI 遺伝子ファミリー欠損マウスにおける消化管腫瘍形成抑制機構の解明
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永野和果、内藤幹彦、伊東進、中野なおこ、田代悦
2. 発表標題 中皮腫進展抑制を目指したSNIPER化合物の開発
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星名黎、中野なおこ、伊東史子、渡邊幸秀、加藤光保、武藤誠、伊東進
2. 発表標題 マウス消化管腫瘍形成におけるTMEPAI ファミリー分子の役割
3. 学会等名 2021年度日本生化学会関東支部例会
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
---------	---------