

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640094

研究課題名(和文) TACC3を標的とした消化管腫瘍に対する分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of intestinal tumor therapy targeting TACC3

研究代表者

八尾 良司 (Yao, Ryoji)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：80291095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト消化管腫瘍は、Apc遺伝子不活性化に伴うWntシグナルの活性化により生じる事が知られている。本研究課題では、Apc遺伝子改変モデルマウスとそこから樹立された3次元培養オルガノイドを用いて、Apc遺伝子不活性化による腫瘍発生の初期過程に、消化管幹細胞の増殖が亢進する事を示した。さらに、がん関連遺伝子Tacc3が、その増殖亢進に必須の役割を果たしており、その阻害により腫瘍が有意に抑制される事を明らかにした。Tacc3は、新しいヒト消化管腫瘍の治療標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：Human colorectal cancer is often initiated by the aberrant activation of Wnt signaling, notably following adenomatous polyposis coli (Apc) inactivation. Using organoid cultures established from conditional knockout mice and in vitro gene ablation, we showed that Apc inactivation led to aberrant Intestinal stem cell (ISC) proliferation and the expansion of the crypt domain. Using this system, we found that Tacc3 is required for the proper mitosis of Apc-deficient ISCs, and its disruption significantly attenuated the expansion of the crypt domain. In vivo analysis of corresponding mutant mice demonstrated that Tacc3 disruption led to a significant decrease in tumor number and prolonged survival. These observations demonstrated that Tacc3 is a potential chemotherapeutic target for intestinal tumors by perturbing the aberrant cell proliferation of Apc-deficient ISCs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：消化管腫瘍 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

化学療法の課題の一つに、がん細胞の抵抗性獲得を挙げる事ができる。これは、がん組織には増殖能や分化度が異なる多様な細胞種が存在するため、治療に対して抵抗性を示す細胞が選択的に増殖することが一因である。申請者はこれまでに、がん関連遺伝子 Tacc3 を標的とするがん分子標的治療法の確立を試み、p53 マウスに発生する胸腺リンパ腫で Tacc3 を欠損させると腫瘍が退縮する事を示した (Yao et al. Oncogene, 2012)。さらに固形腫瘍における効果を検討する目的で、家族性大腸腺腫症(FAP)のモデルマウスである Apc 欠損マウスで Tacc3 を欠損させたところ、腫瘍の抑制効果が認められた。しかし時間とともに、腫瘍が徐々に増大したことから (図 1)、これらの細胞集団の特性を明らかにし、抵抗性の分子機構を解明する事により、より効果的な治療法を開発する事ができると考えられた。

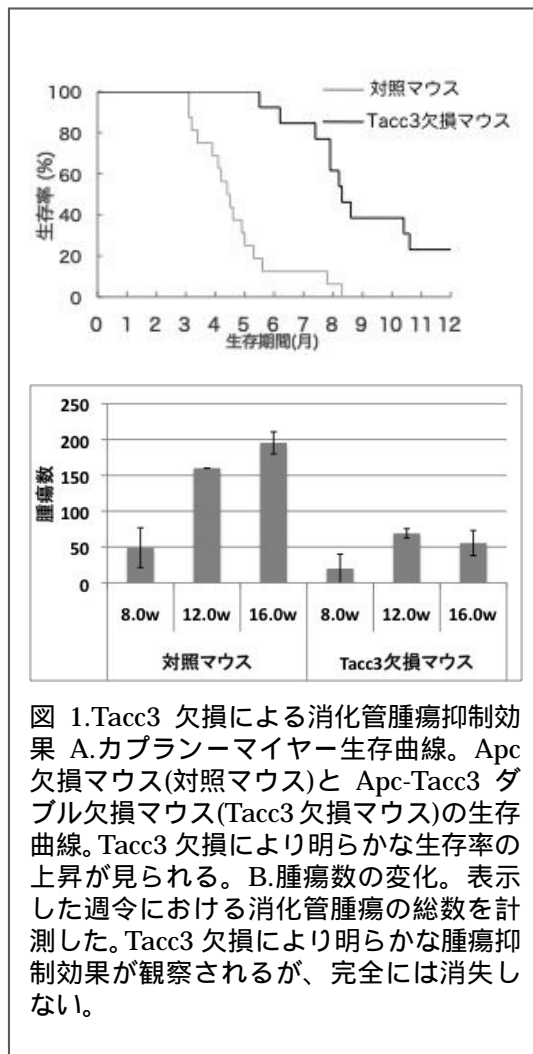


図 1. Tacc3 欠損による消化管腫瘍抑制効果 A. カプラン-マイヤー生存曲線。Apc 欠損マウス(対照マウス)と Apc-Tacc3 ダブル欠損マウス(Tacc3 欠損マウス)の生存曲線。Tacc3 欠損により明らかな生存率の上昇が見られる。B. 腫瘍数の変化。表示した週令における消化管腫瘍の総数を計測した。Tacc3 欠損により明らかな腫瘍抑制効果が観察されるが、完全には消失しない。

2. 研究の目的

本研究課題では、がん関連遺伝子 TACC3 を標的とした消化管腫瘍に対する分子標的治療法を開発を目的とする。

がん組織は、増殖能や分化形質が異なる多彩な細胞種から構成されており、この細胞の多様性が分子標的治療に対する抵抗性の一因となっている。Apc 遺伝子変異により生じる消化管腫瘍で Tacc3 を欠損させると腫瘍抑制効果は認められることから、Tacc3 は有望な治療標的である可能性が示唆された。しかし、長期観察では、抵抗性の細胞が増殖し、腫瘍を消失する事はできなかった。そこで本研究課題では、消化管腫瘍の細胞多様性と抵抗性の分子機構を明らかにし、Tacc3 を標的としたより効率的ながん分子標的治療法を開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、Tacc3 欠損に対して抵抗性を規定する因子の同定、および細胞多様性の関与を明らかにする。具体的には、Tacc3 枯渇に感受性を示す 2 次元培養細胞を用いたスクリーニングに加えて、生体内の細胞多様性・階層性を維持する三次元オルガノイドを樹立し、解析する。Apc コンディショナルノックアウトマウスと Tacc3 コンディショナルノックアウトマウスおよび Apc/Tacc3 ダブルコンディショナルノックアウトマウスを作製し、さらに ROSA26-CreERT2 アリルを導入、それぞれの正常消化管よりオルガノイドを作製する。一方、in vivo での解析を目的として、Lgr5CreERT2 アリルを導入し、幹細胞特異的な変異導入が可能な消化管腫瘍モデルマウスを作製する。これらの実験系を用いて、以下の方法により進める。

Tacc3 枯渇に感受性を示すがん細胞に shRNA ライブラリーを感染させた細胞プールを作製、Tacc3 を標的とする siRNA をトランスフェクションし、生存細胞を回収し、シーケンスにより shRNA を同定する。次に Apc/Tacc3 二重変異と ROSA26CreERT2 アリルをもつオルガノイドを複数樹立し、shRNA ライブラリーの感染実験を行う。それぞれのオルガノイドに感染した shRNA クローンをシーケンスにより同定し、機能的に Tacc3 欠損オルガノイドの増殖に必須な遺伝子を同定する。同定された遺伝子は、細胞、組織、さらに生体レベルで解析を行い、紡錘体形成における役割を明らかにするとともに、Tacc3 との機能的相互作用を明らかにすることにより、新たながん分子標的治療の併用療法を開発を行う。

Tacc3 を発現するオルガノイドと欠損するオルガノイドの遺伝子発現プロファイルを取得する。得られた遺伝子発現情報を元に、Apc 遺伝子不活化により増殖する細胞集団を明らかにする。さらに Apc/Tacc3 二重変異オルガノイドの遺伝子発現プロファイルを取得、Tacc3 欠損により抑制される細胞集団を明らかにする。それらの結果を元に、Tacc3 欠損により生じる生体内での細胞多様性の変化を検討する。

4. 研究成果

ゲノムワイドな shRNA を発現するレンチウイルスライブラリーを用いたスクリーニング系を、ヒト大腸がん細胞を用いて行った。これまでに解析を行った各種ヒトがん細胞に加えて、新たな TACC3 阻害感受性のヒト大腸がん細胞株を同定することを目的として、TACC3 を標的とする siRNA をトランスフェクションにより導入し、イムノプロットにより遺伝子枯渇を評価した。次に細胞増殖を検討し、TACC3 たんぱく質の枯渇により、細胞増殖が著しく低下するヒト大腸がん細胞を見いだした。この細胞株を用いて、それぞれ 8000 クローンを含む 10 種類のサブプールからなる shRNA ライブラリーを感染させ、10 個の感染細胞プールを作製した。それぞれの感染細胞プールに siRNA のトランスフェクションにより TACC3 を枯渇させた結果、一つのプールから増殖する細胞集団が確認された。これらの細胞集団は、再度の TACC3 siRNA のトランスフェクションにおいても増殖が確認された。

次に細胞多様性による抵抗性の解明を目的として、コンディショナルノックアウトマウスからオルガノイドの樹立を行った。誘導的遺伝子破壊には、ROSA26CreERT2 アリルを用いた。Tacc3 遺伝子変異には Tacc3 コンディショナルアリル(Tacc3S/S)、Apc 遺伝子変異導入には Apc コンディショナルアリル(ApcS/S)を用いた。遺伝子型の差によらないオルガノイドの形質の違いを考慮し、複数の Tacc3W/W, ApcS/S, ROSA26Cre ERT2 および Tacc3S/S, ApcS/S, ROSA26CreERT2 という遺伝子型を持つマウスから、消化管オルガノイドを作製し、その特性を明らかにした。その結果、これらのオルガノイドは、クリプト絨毛構造をもち、吸収上皮細胞に加え、パネート細胞、ゴブレット細胞などの細胞種を有していた。in vitro で 4OHT を添加したところ、前者では増殖が促進したのに対し、後者では、増殖が低下した。また、Apc 遺伝子欠損オルガノイドでは、Tacc3 欠損により細胞分裂停止もしくは遅延が生じることが明らかになった。興味深い事に、Tacc3S/S, ApcW/W, ROSA26 CreERT2 オルガノイドでは、Tacc3 を欠損しても、増殖抑制が観察されず、Tacc3 が Apc 不活化により誘導されたがん化細胞選択的に必須の機能を有している事が明らかになり、Tacc3 のがん治療分子標的としての有用性が示された。

樹立されたオルガノイドに対するレンチウイルスの感染法の最適化を行った。EGFP を発現するレンチウイルスベクターを作製、オルガノイドを個々の細胞に消化した後、サイトスピンを用いる事により、効率良く感染した。さらに、薬剤処理を行い非感染細胞を排除することにより、継続

してマーカー遺伝子を発現するオルガノイドの取得が可能となった。しかし、ゲノムワイドな shRNA を発現するレンチウイルスライブラリーの感染実験では、十分数のオルガノイドが得られず、さらなる効率化が望まれた。Tacc3S/S, ApcS/S, ROSA26CreERT2 および Tacc3W/W, ApcS/S, ROSA26CreERT2 の遺伝子型をもつマウス消化管から樹立したオルガノイドを用いて、マイクロアレイによる網羅的発現遺伝子解析を行った。その結果、Apc 遺伝子の単独欠損では、生体内での Apc 遺伝子不活化に伴う遺伝子発現の変化と強い相関を示し、さらに Lgr5 などの消化管幹細胞マーカーの亢進が観察された。これらの事から ApcS/S, ROSA26CreERT2 オルガノイドが、生体内のがん化に伴う細胞多様性を再現する有用な in vitro 実験系である事が示された。そこで、これらのオルガノイドから、さらに Tacc3 を欠損させると、Apc 遺伝子不活化により生じる消化管幹細胞マーカーの亢進が顕著に抑制される事が明らかになった(図2)。さらに蛍光免疫染色による解析では、Apc 不活化により、消化管幹細胞が存在する陰窩領域が拡大するのに対し、Tacc3 欠損ではその抑制が生じている事が明らかになった。これらの事から Tacc3 は Apc 遺伝子不活

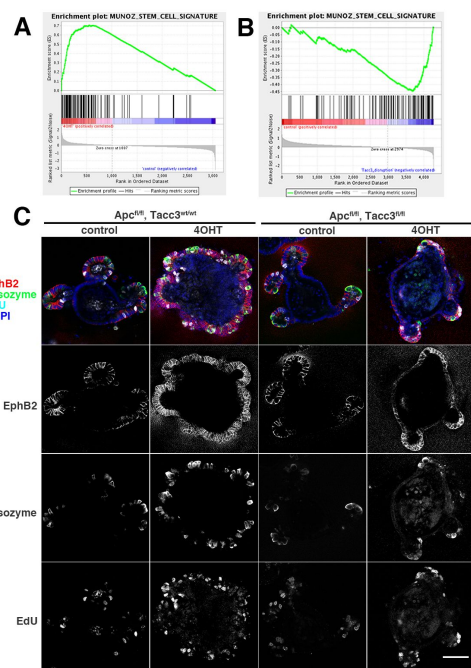


図2. Apc 遺伝子および Tacc3 遺伝子の不活化による消化管幹細胞の変化。マイクロアレイを用いた網羅的発現解析では、Apc 遺伝子の不活化による消化管幹細胞マーカーの発現亢進(A)と Tacc3 遺伝子の欠損による抑制が観察された(B)。蛍光免疫染色による解析により、消化管幹細胞マーカーの発現亢進・抑制は、幹細胞領域の進展であることが示された。

化による幹細胞の異常増殖を抑える事により、腫瘍発生を抑制する事が明らかになった。

興味深い事に、オルガノイドを構成する様々な消化管幹細胞の反応性を観察したところ、Apc 不活化により一部の消化管幹細胞マーカーの発現が亢進し、Tacc3 欠損によりこれらが顕著に抑制された(図 3)。Apc および Apc/Tacc3 二重欠損マウスの蛍光免疫染色では、同様の消化管幹細胞の Apc 遺伝子不活化に細胞増殖亢進と Tacc3 欠損による抑制が観察された。これらの結果は、組織を構成する細胞種が異なるヒト消化管腫瘍においては、それらの幹細胞を明らかにすることにより、Tacc3 阻害が有効ながんを選択できる可能性があること、さらに他の幹細胞を標的とする治療法との併用により、治療効果の向上が期待されることを示しており、Tacc3 を標的とする新たな消化管腫瘍治療法の開発が期待さ

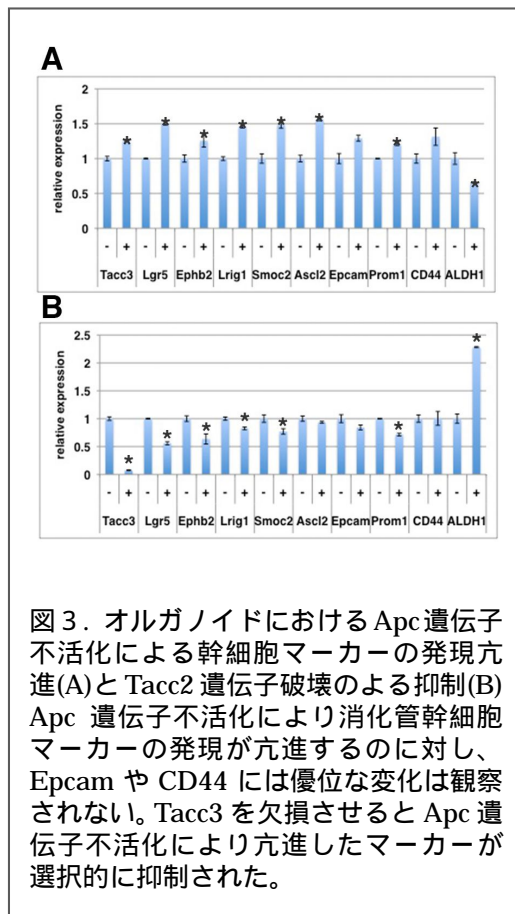


図 3. オルガノイドにおける Apc 遺伝子不活化による幹細胞マーカーの発現亢進(A)と Tacc2 遺伝子破壊による抑制(B) Apc 遺伝子不活化により消化管幹細胞マーカーの発現が亢進するのに対し、Epcam や CD44 には優位な変化は観察されない。Tacc3 を欠損させると Apc 遺伝子不活化により亢進したマーカーが選択的に抑制された。

れる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yao, R., Oyanagi, J., Natsume, Y., Kusama, D., Kato, Y., Nagayama, S. &

Noda, T. Suppression of intestinal tumors by targeting the mitotic spindle of intestinal stem cells. *Oncogene* 査読有 Advanced online publication (2016).

Yao, R., Mori, S. & Noda, T. JCA-AACR Joint Symposia in the 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 25-26 September 2014. 査読有 *Cancer Sci* 106, 475-9 (2015).

Yao, R., Kondoh, Y., Natsume, Y., Yamanaka, H., Inoue, M., Toki, H., Takagi, R., Shimizu, T., Yamori, T., Osada, H. & Noda, T. A small compound targeting TACC3 revealed its different spatiotemporal contributions for spindle assembly in cancer cells. 査読有 *Oncogene* 33, 4242-52 (2014).

Toki, H., Inoue, M., Minowa, O., Motegi, H., Saiki, Y., Wakana, S., Masuya, H., Gondo, Y., Shiroishi, T., Yao, R. & Noda, T. Novel retinoblastoma mutation abrogating the interaction to E2F2/3, but not E2F1, led to selective suppression of thyroid tumors. 査読有 *Cancer Sci* (2014).

Toki, H., Inoue, M., Motegi, H., Minowa, O., Kanda, H., Yamamoto, N., Ikeda, A., Karashima, Y., Matsui, J., Kaneda, H., Miura, I., Suzuki, T., Wakana, S., Masuya, H., Gondo, Y., Shiroishi, T., Akiyama, T., Yao, R. & Noda, T. Novel mouse model for Gardner syndrome generated by a large-scale N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis program. 査読有 *Cancer Sci* 104, 937-44 (2013).

〔学会発表〕(計 12 件)

八尾良司、小柳潤、野田哲生、Wnt および Ras シグナルによる腸幹細胞制御 第 74 回日本癌学会 (名古屋)、2015 年 10 月 8 日

小柳潤、八尾良司、野田哲生、オルガノイドを用いた Apc 欠損による消化管幹細胞の動態解析 第 74 回日本癌学会 (名古屋)、2015 年 10 月 8 日

Ryoji Yao, Tetsuo Noda The Cellular hierarchy of intestinal tumors American association for cancer research (米国 フラデルフィア) AACR Annual meeting 2015, 2015 年 4 月 21 日

八尾良司、長田裕之、吉田稔、野田哲生、TACC3 を標的とした低分子化合物の開発と応用 第 73 回日本癌学会 (横浜)、2014 年 9 月 27 日

小柳潤、八尾良司、野田哲生、オルガノイドを用いた TACC3 阻害による消化管腫瘍抑制機構の解析第 73 回日本癌学会 (横浜)、2014 年 9 月 26 日

長垣良和、中條萌絵子、樽本雄介、八尾良司、石川冬木、哺乳動物細胞の低用量ストレス応答におけるヒストンシヤペロン

HIRA の機能解析、第 73 回日本癌学会 (横浜)、2014 年 9 月 27 日

土岐秀明、井上麻紀、美野輪治、齋木由利子、若菜茂晴、権藤洋一、八尾良司、野田哲生、新規 Rb1 変異発がんモデルマウスにおける下垂体腫瘍発生と甲状腺腫瘍抑制の機構、第 73 回日本癌学会 (横浜)、2014 年 9 月 26 日

高野洋、八尾良司、野田哲生、消化管腫瘍形成における APC1309 の機能解析、第 73 回日本癌学会 (横浜)、2014 年 9 月 27 日

八尾良司、矢守隆夫、近藤恭光、長田裕之、野田哲生、新規 TACC3 阻害剤を用いた紡錘体制御機構解析とがん治療への応用 第 36 回日本分子生物学会 (神戸)、2013 年 12 月 3 日

八尾良司、矢守隆夫、長田裕之、野田哲生 新規 TACC3 阻害剤による紡錘体形成阻害機構 第 72 回日本癌学会 (横浜)、2013 年 10 月 5 日

井上麻紀、土岐秀明、美濃輪治、神田浩明、山本智理子、八尾良司、野田哲生 ENU 誘発大規模ミュータジェネシスにより開発された新規ガードナー症候群モデルマウス第 72 回日本癌学会 (横浜)、2013 年 10 月 4 日

八尾良司、夏目康子、野田哲生 TACC3・TOGp・MCAK によるがん細胞の紡錘体形成機構 第 86 回日本生化学会 (横浜)、2013 年 9 月 12 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

八尾 良司 (YAO, Ryoji)

(公益財団法人)がん研究会 / がん研究所・主任研究員

研究者番号 : 80291095