

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290045

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた大腸がん転移機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms of colorectal cancer metastasis using mouse models

研究代表者

青木 正博 (Aoki, Masahiro)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・部長

研究者番号：60362464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス生体での機能に基づいた探索により大腸がんの転移制御因子の同定を試み、HNRNPLLというRNA結合タンパクを見出した。大腸がん細胞でHNRNPLLの発現を低下させると転移能や浸潤能が亢進した。さらにHNRNPLLは、(1) CD44というタンパクをコードするpre-mRNAの選択的スプライシングを調節して大腸がん細胞の浸潤を抑制すること、(2) 大腸がん細胞の上皮間葉転換の際に発現が低下すること、(3) DNA複製因子をコードするmRNAの安定性を高めて大腸がん細胞の増殖を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified HNRNPLL, an RNA binding protein, as a novel suppressor of colorectal cancer metastasis through a functional screen in mice. Reduced expression of HNRNPLL in colorectal cancer cells conferred increased their invasion ability in vitro and metastatic ability in vivo. HNRNPLL was shown to suppress invasion of colorectal cancer cells at least partly via controlling the alternative splicing of CD44 pre-mRNA. HNRNPLL expression was downregulated during epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colorectal cancer cells, and immunohistochemical analysis of colorectal cancer clinical samples further suggested the link between the HNRNPLL level and EMT. HNRNPLL was also shown to stabilize mRNAs encoding the DNA replication factors, and to enhance proliferation of colorectal cancer cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：大腸がん 転移 マウスモデル スプライシング RNA結合タンパク トランスポゾン 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

日本では1日あたり100人以上の大腸がん患者が死亡しており、2020年には、大腸がんは日本人の最も罹患率の高い悪性腫瘍になると予想されている。転移能を獲得した大腸がんの症例では治療困難となることが多い。

これまでに大腸がん細胞株の移植による転移マウスモデルの研究や、臨床検体を用いた網羅的な発現解析・変異解析により、転移制御因子の候補が同定されるとともに、シグネチャー遺伝子と呼ばれる、転移性大腸がんの特徴的な遺伝子発現パターンなどが明らかにされてきている。

しかしながら、転移に必要な遺伝子レベルでの変化は既に原発巣で獲得しているという考察もあり (Vogelstein, 2013)、さらに個々のがん組織においても驚くほど

heterogenousな遺伝子変異が認められるという報告もあり、量的・質的な変化を示す遺伝子をリストアップするだけでは、転移に重要な役割を果たす因子を絞り込めない可能性もある。

2. 研究の目的

大腸がんによる死因の約9割が浸潤・転移によるものであるとされ、新機軸の分子標的治療薬の開発が求められている。網羅的な変異解析・発現解析などにより転移性大腸がんにおける遺伝子発現の質的・量的な変化は明らかになりつつあるが、予防・治療標的となり得る機能的に重要な転移制御因子の同定には至っていない。

本研究では、1) レンチウイルス shRNA ライブラリー、および2) トランスポゾンを用いたマウス生体でのゲノムワイドな順行遺伝学的スクリーニング法により、大腸がんの転移を制御する因子を同定し、それらの転移における役割を明らかにすることによって大腸がん転移の分子機序を解明するとともに、転移性大腸がんを自然発症する遺伝子改変マウスモデルを樹立することを目的とした。

3. 研究の方法

1) レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いた転移抑制因子の同定

細胞株としては、マウス大腸がん細胞株 CMT93、およびヒト大腸がん細胞株 SW480, HT29, T84, SW116 を用いた。CMT93 細胞の肺転移能は、C57BL/6 マウスの直腸粘膜下に移植し、3ヶ月後に転移巣を数えて評価した。*in vitro*での浸潤能は、Venus 蛍光タンパク発現細胞を用いて FluoroBlok Cancer Cenn Invasion Assay System (BD Biosciences) により評価した。CD44v6 中和抗体としては、clone 2F10 (R&D) と clone 9A4 (GeneTex) を使用した。

RNA-immunoprecipitation は Magna RNA immunoprecipitation (RIP) RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit (Merck

Millipore) を用いて行った。

ヒト大腸がん検体については、インフォームドコンセントを得た外科切除検体のパラフィン切片を愛知県がんセンター中央病院遺伝子病理診断部より入手し、蛍光免疫法で染色した標本を、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) で観察した。

2) トランスポゾンを用いた転移制御因子の同定

大腸がんマウスモデルのプロトタイプとして、腸管に良性の腺腫を発症する *Villin-cre^{ERT2}; Ctnnb^{+/loxEx3}* マウス (VB マウス) と *Lgr5-cre^{ERT2}; Ctnnb^{+/loxEx3}* マウス (LB マウス) を用いた。これらのマウスにタモキシフェンを投与すると、腸管上皮細胞で Cre リコンビナーゼが活性化し、Ctnnb1 (β -catenin) 遺伝子の第3エクソン欠失により β -catenin が安定化して腸管に良性の腺腫を発症する。さらに *Smad4* 不活化変異 (S)、*Kras* 活性化変異 (K)、*p53* 不活化変異 (P) の floxed アレルを導入した VBS マウス、VBKPS マウス、LBS マウス、LBKPS マウスなどを交配により作出した。これらのマウスと ATP1-S2 マウス (A)、さらに Rosa-LSL-PBase マウス (P) とを交配させることにより、大腸がんマウスのゲノムに PiggyBac トランスポゾンを導入した

(VBAP、VBAPKPS マウスなど)。ATP1-S2 マウスはゲノムに ATP トランスポゾン 20 コピー持ち、Rosa-LSL-PBase マウスはタモキシフェン依存的にトランスポゼースを発現する。完成したマウスにタモキシフェンを投与することにより、腸管腫瘍が発症するとともに、PiggyBac トランスポゼースが発現しトランスポゾンの転位が開始される。VBAP マウスなどに6週齢の時点でタモキシフェンを投与し、マウスの全身状態を注意深く観察した。マウスが瀕死状態になった時点で安楽死させて解剖し、肝臓、肺、腸間膜リンパ節その他への転移の有無を検討した。

4. 研究成果

1) レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いた転移抑制因子の同定

本研究の開始時点で、レンチウイルスマウス全ゲノム shRNA ライブラリーを感染させたマウス大腸がん細胞株 CMT93 を C57BL/6 マウスの直腸粘膜下に移植し、得られた肝臓、肺、腸間膜リンパ節の転移巣から抽出したゲノム DNA より PCR で増幅した shRNA フラグメントの塩基配列を決定し、ノックダウンされている標的遺伝子を同定するという手法で 47 個の候補遺伝子を得ていた。

Hnrnp11 の転移抑制能の検証

2匹のマウスの転移巣から独立して検出された *Hnrnp11* (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like) 遺伝子について、2種類の shRNA により CMT93 細胞で安定的にノックダウンしたクローンを作成した。

さらに、それらの shRNA に抵抗性を持つ *Hnrnp11* cDNA を導入し、*Hnrnp11* の発現を回復させたクローンも作成した。各クローンを C57BL/6 マウスの直腸粘膜下に接種し、3 ヶ月後に肺への転移を検討したところ、*Hnrnp11* ノックダウンにより肺転移巣の数が有意に増加し、さらに *Hnrnp11* の発現回復により有意に減少した (図 1)。

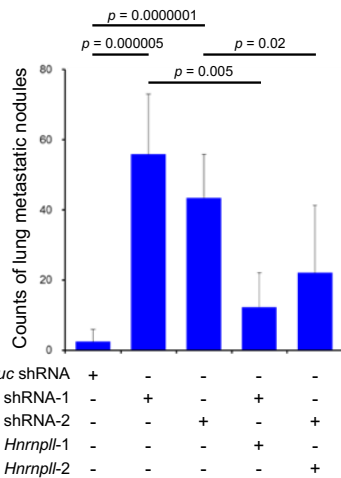


図 1. *Hnrnp11* のノックダウンは CMT93 細胞の肺転移を亢進させる。sh1/2 : *Hnrnp11* に対する shRNA。

Hnrnp11 が転移のどの段階を抑制するのか検討するため、まず *in vitro* でのマトリゲル浸潤能への関与を調べた。*Hnrnp11* をノックダウンすることにより、CMT93 細胞の浸潤能は有意に亢進した (図 2)。ヒト大腸がん細胞株 SW480 を用いても同様の結果が得られた。

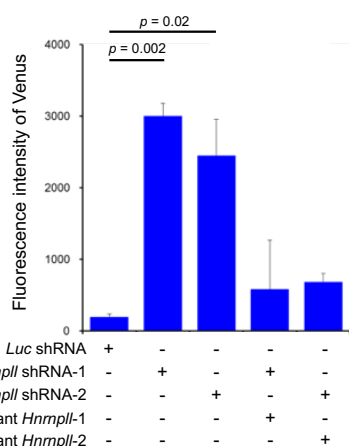


図 2. *Hnrnp11* のノックダウンは CMT93 細胞の *in vitro* でのマトリゲル浸潤能を亢進させる。sh1/2 : *Hnrnp11* に対する shRNA。

Hnrnp11 のノックダウンによる浸潤促進機序
Hnrnp11 は T および B リンパ球において分化を制御する pre-mRNA の選択的スプライシングに関与することが知られていた。*Hnrnp11* によって選択的スプライシングが調節される

pre-mRNA を同定するために、RNA-immunoprecipitation を行い、69 個の候補を得たが、その中でも T リンパ球を用いた RNA-IP によって *Hnrnp11* が結合することが示されていた CD44 に着目した。CD44 はヒトでは 10 個、マウスでは 9 個のバリエーションを持つ (図 3A)。CMT93 および SW480 細胞で HNRNPLL をノックダウンすると、大腸がんの転移に関与することが知られる v6 エクソンをもつ CD44 の発現が mRNA、タンパクレベルの両方で亢進した (図 3B, C)。

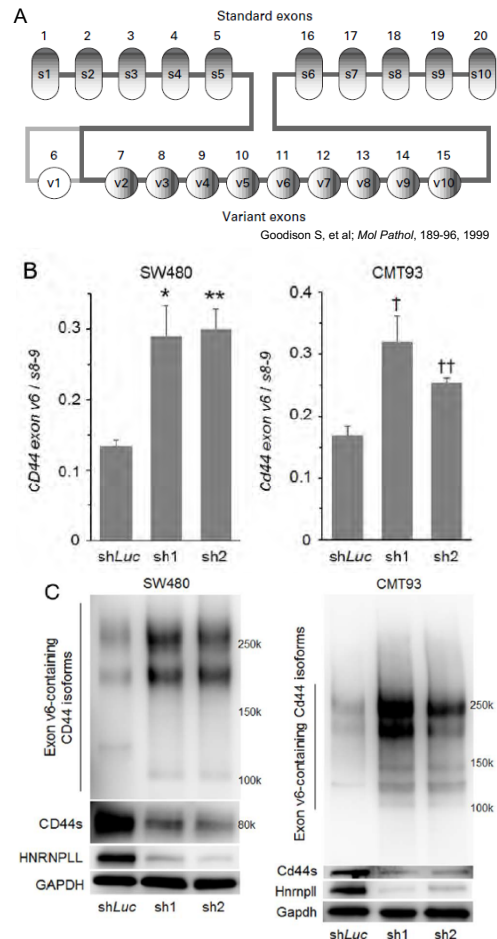


図 3. *Hnrnp11* のノックダウンは CD44v6 の発現を上昇させる。A. CD44 のエクソン・イントロン構造。B. qRT-PCR。C. ウェスタンブロット。sh1/2 : *Hnrnp11* に対する shRNA。p=0.036 (*), 0.015 (**), 0.042 (†), and 0.017 (†) (B)。

HNRNPLL と上皮間葉転換の関係

同一患者由来の大腸がん原発巣と転移巣における HNRNPLL の発現を免疫染色により調べたところ、両者の間に発現レベルの差は認められなかった。HNRNPLL の発現が一過性に変動する可能性を考え、SW480 大腸がん細胞に *in vitro* で上皮間葉転換 epithelial-mesenchymal transition (EMT) を引き起こしたところ HNRNPLL の発現は顕著に低下し、CD44v6 の発現が上昇した (図 4)。さらに直腸がん臨床検体を用いた免疫染色により、E-cadherin を高発現する腫瘍塊中心部のがん

細胞は HNRNPLL を強く発現するが、E-cadherin の発現が低い浸潤先端部のがん細胞では HNRNPLL の発現が低下していた (図 5)。

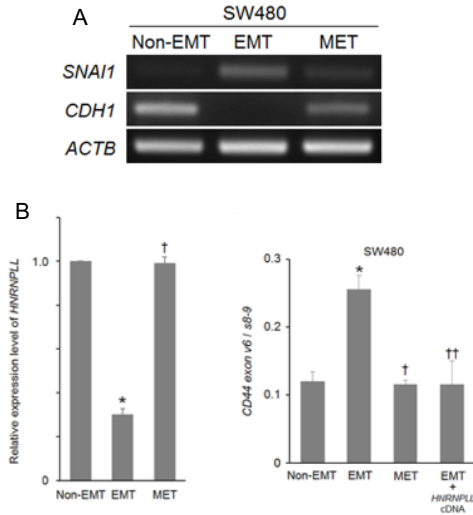


図 4. EMT を引き起こした大腸がん細胞では上皮マーカー CDH1 (E-cadherin) の発現低下および間葉マーカー SNAI1 (Snail) の発現上昇 (A) に伴って、*Hnrnp11* の発現が低下し、*CD44v6* の発現が上昇する (B)。

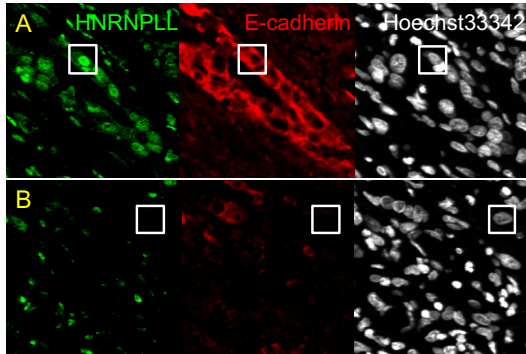


図 5. 直腸がん原発巣臨床検体を用いた免疫染色。(A) 腫瘍塊中心部。(B) 浸潤先端部。

HNRNPLL による細胞増殖亢進機能とその機序
大腸がん細胞株 SW480 で *HNRNPLL* をノックダウンすると細胞増殖が低下、逆に *HNRNPLL* を強制発現すると細胞増殖が促進し、S/G2/M 期の割合がそれぞれ減少・増加した (図 6)。

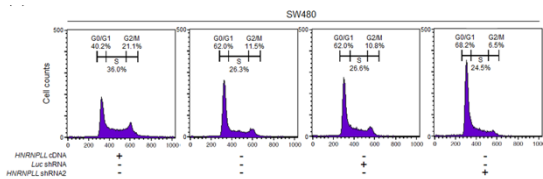


図 6. HNRNPLL を強制発現またはノックダウンした SW480 細胞の細胞周期解析。

同細胞および *HNRNPLL* をノックダウンした SW480 細胞の RNAseq をおこなったところ、DNA 複製因子 *PCNA*、*RFC3*、*FEN1* の発現が

HNRNPLL によって上昇することを見出した。これら 3 つの遺伝子のどれをノックダウンしても HNRNPLL による細胞増殖促進が抑制された (図 7)。

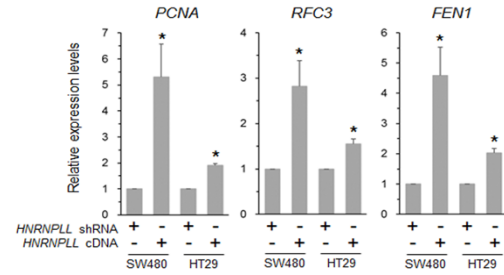


図 7. qRT-PCR 解析. HNRNPLL を強制発現させた細胞とノックダウンした細胞との比較。

HNRNPLL は *PCNA*、*RFC3*、*FEN1* の pre-mRNA および mRNA に結合し、転写阻害剤添加下で mRNA レベルの低下を抑制したことから、HNRNPLL はこれらの mRNA の安定化を介して発現を上昇させることが示唆された (データ不掲載)。

以上の結果から、HNRNPLL が大腸がんの新しい転移抑制因子であること、HNRNPLL は少なくとも部分的には *CD44* の選択的スプライシングを調節することで大腸がん細胞の浸潤を制御すること、大腸がん細胞の上皮間葉転換において HNRNPLL の発現が低下し *CD44v6* の発現が上昇することが明らかとなった。さらに HNRNPLL は DNA 複製因子をコードする mRNA の安定性を高めることで大腸がん細胞の増殖を正に制御していることも分かった。

2) トランスポゾンを用いた転移抑制因子の同定

6-8 週齢の VB 及び LB マウスにタモキシフェン 0.1mg を 1 回腹腔内投与したところ、VB マウスは投与後 2 ヶ月前後で衰弱し始め、十二指腸から空腸を埋め尽くす程の腫瘍が形成された。一方、LB マウスでは、投与後 5 ヶ月で 100 個程のポリープが回腸を中心に確認できた。LB マウスでは半年近く生存できたため、まず LBAP マウスを優先的に繁殖させ、タモキシフェンを投与したところ、4 ヶ月前後で衰弱し始めたが、ポリープの数や大きさは対照となる LB と差が認められず、一部のポリープで、腫瘍上皮細胞の浸潤像や血管内侵入像が確認できたが遠隔転移は認められなかった。一方、腫瘍 DNA の解析から PiggyBac トランスポゾンの転移自体は確認できたことから、LBAP マウスを用いた転移関連遺伝子の探索は、時間的制約 (浸潤・転移に必要な変異が蓄積する期間) の点から困難と考えられた。

そこで、大腸がんで高頻度に変異が認められる 3 つの遺伝子の変異マウス

(*Kras*^{LSLG12D}/*p53*^{lox/lox}/*Smad4*^{lox/lox} マウス: KPS マウス) と *Villir-cre*^{ERT2} マウスとを導入して VBAPKPS マウスを作成した。タモキシ

フェンを投与しなかった VBAPKPS マウスでは、CreERT2 が逸脱的に活性化したために全個体で少数の腸管腫瘍が形成されており、さらに 44% (26/59 匹) の個体で肝臓に転移を認めた (図 8)。一方、*Kras* 変異を持たない VBAPPS マウスでは転移が認められず (0/27 匹)、大腸がん転移において *Kras* 変異が重要であることが示唆された。

これら肝転移巣の由来を検討するため、腸がん原発巣、肝臓転移巣、及び正常な膵臓、肝臓、小腸、大腸における GATA4、GATA6、Olfm4、PDX1、CDX2 の発現を免疫染色により調べたところ、CDX2 の発現が腸正常部、原発巣そして肝転移巣で認められ、肝転移巣は腸がん由来と考えられた。残念ながらトランスポゾン挿入領域の系統的な解析は本研究期間中に間に合わなかったが、この系を用いて転移制御因子を同定するための準備は完了した。

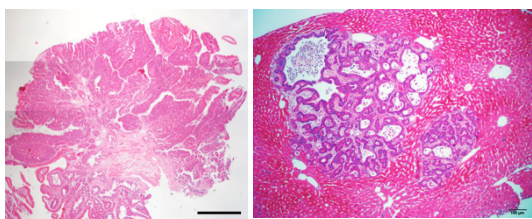


図 8. VBAPKPS マウスの原発腫瘍 (左) と肝転移巣 (右) の H&E 染色。

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 6 件)

- ① Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, Aoki M. HNRNPLL stabilizes mRNAs for DNA replication proteins and promotes cell cycle progression in colorectal cancer cells. *Cancer Sci*, 査読有, in press
- ② Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, Aoki M. HNRNPLL, a newly identified colorectal cancer metastasis suppressor, modulates alternative splicing of CD44 during epithelial-mesenchymal transition. *Gut*, 査読有, 68(6):1103-1111, 2018, doi:10.1136/gutjnl-2016-312927.
- ③ Fujishita T, Kojima Y, Kajino-Sakamoto R, Taketo MM, Aoki M. Tumor microenvironment confers mTOR inhibitor resistance in invasive intestinal adenocarcinoma. *Oncogene*.

査読有, 36(46):6480-6489, 2017, doi: 10.1038/onc.2017.242.

- ④ Satoh K, Yachida S, Sugimoto M, Oshima M, Nakagawa T, Akamoto S, Tabata S, Saitoh K, Kato K, Sato S, Igarashi K, Aizawa Y, Kajino-Sakamoto R, Kojima Y, Fujishita T, Enomoto A, Hirayama A, Ishikawa T, Taketo MM, Kushida Y, Haba R, Okano K, Tomita M, Suzuki Y, Fukuda S, Aoki M, Soga T. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *PNAS*, 査読有, 114(31): 8289-8294, 2017, doi: 10.1073/pnas.1620915114.
 - ⑤ Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung NL, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M. Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma. *Cancer Res*, 査読有, 76(9): 2612-2625, 2016, doi: 10.1158/0008-5472.
 - ⑥ Fujishita T, Kajino-Sakamoto R, Kojima Y, Taketo MM, Aoki M. Antitumor activity of the MEK inhibitor trametinib on intestinal polyp formation in *Apc* Δ 716 mice involves stromal COX-2. *Cancer Sci*, 査読有, 106(6): 692-699, 2015, doi: 10.1111/cas.12670.
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 佐久間圭一朗、HNRNPLL は大腸がん細胞の EMT と MET における形質変化に関与する、第 76 回日本癌学会学術総会、2017
 - ② 藤下晃章、腸管腫瘍の薬剤抵抗性獲得における EGF 受容体の役割、第 76 回日本癌学会学術総会、2017
 - ③ 青木正博、shRNA ライブラリースクリーニングによる新規大腸がん転移抑制因子の同定、新学術領域研究 学術領域支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会、2017
 - ④ 青木正博、新規大腸がん転移抑制因子 HNRNPLL は上皮間葉転換において CD44 の選択的スプライシングを制御する、第 26 回日本がん転移学会学術集会、2017
 - ⑤ 青木正博、大腸がんの新規転移抑制因子 HNRNPLL は上皮間葉転換における *CD44* の選択的スプライシングを制御する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016
 - ⑥ 佐久間圭一朗、新規大腸がん転移抑制因

子 HNRNPLL によってスプライシングを受ける遺伝子の同定、第 75 回日本癌学会学術総会、2016

- ⑦ 藤下晃章、がん微小環境は浸潤性腸がんの mTOR 阻害薬抵抗性獲得に関与する、第 75 回日本癌学会学術総会、2016
- ⑧ 青木正博、Identification of HNRNPLL as a novel metastasis suppressor of colorectal cancer、第 41 回内藤コンファレンス、2016
- ⑨ 青木正博、shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングによる新規大腸がん転移抑制因子 HNRNPLL の同定、第 20 回日本分子標的治療学会学術集会、2016
- ⑩ Aoki M. An in vivo shRNA screen identifies HNRNPLL as a novel colorectal cancer metastasis, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016
- ⑪ 青木正博、マウスモデルを用いた大腸がん浸潤・転移の予防・治療標的の探索、第 74 回日本癌学会学術総会、2015
- ⑫ 佐久間圭一朗、大腸がん転移抑制因子候補 HNRPLL は上皮間葉転換によって負の制御を受ける、第 74 回日本癌学会学術総会、2015
- ⑬ 佐久間圭一朗、shRNA ライブラリーを用いた大腸がん転移抑制遺伝子のゲノムワイドスクリーニング、第 73 回日本癌学会学術総会、2014

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

報道関連情報

雑誌論文②の研究成果は平成 29 年 4 月 12 日発行の中日新聞および読売新聞 (中部版) の

朝刊に記事として取り上げられました。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 正博 (AOKI, Masahiro)
愛知県がんセンター(研究所)・
分子病態学部・部長
研究者番号：60362464

(2) 研究分担者

佐久間 圭一朗 (SAKUMA, Keiichiro)
愛知県がんセンター(研究所)・
分子病態学部・室長
研究者番号：90402891

小島 康 (KOJIMA, Yasushi)
愛知県がんセンター(研究所)・
分子病態学部・主任研究員
研究者番号：30464217

藤下 晃章 (FUJISHITA, Teruaki)
愛知県がんセンター(研究所)・
分子病態学部・主任研究員
研究者番号：50511870

梶野 リエ (KAJINO, Rie)
愛知県がんセンター(研究所)・
分子病態学部・研究員
研究者番号：20633184

(3) 連携研究者

竹田 潤二 (TAKEDA, Junji)
大阪大学・医学研究科・教授
研究者番号：50163407

(4) 研究協力者

()