

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430110

研究課題名(和文) 新規大腸がんモデルマウス作製とがん悪性化進展機構の研究

研究課題名(英文) Model mouse for malignant colorectal cancer progression

研究代表者

中山 瑞穂 (Nakayama, Mizuho)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：20398225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんの主な死亡原因は転移や再発といった悪性化によるものである。本研究はヒト大腸がん遺伝子異常を反映する大腸がん悪性化進展モデルマウスを作製し、その悪性化進展過程におけるがん細胞の形質変化や、がん微小環境特性とそれを介した転移獲得を明らかにするものである。ヒト大腸がんでは最も遺伝子変異が高頻度に入るApc、TP53変異を入れたマウスの腸管腫瘍では、TP53変異依存的に約350個の遺伝子群が発現上昇し、これらは、自然免疫や炎症に関連しておりがん微小環境形成へと関与していることがわかった。また、WntとNF- κ Bシグナルの亢進はがん細胞の未分化性獲得、不整腺管形成を促進していることもわかった。

研究成果の概要(英文)：p53 is highly mutated in colorectal cancer (CRC), however, the mechanisms of gain-of-function of mutant p53 in malignant progression have not yet been fully understood. We show that wild-type p53 inhibits nuclear accumulation of mutant p53 (R270H), however, relocalization of p53 to nuclei is associated with submucosal invasion and liver metastasis. Moreover, nuclear accumulation of mutant p53 (R270H) causes drastic morphological changes of organoids to complicated glandular architecture, which reflect poorly differentiated histology of in vivo tumors. Furthermore, mutant p53 (R270H) induces expression of wide range of genes through chromatin modification, which results in activation of Wnt/ β -catenin pathways, which may be related to stemness and invasiveness. These results provide a novel mechanism of mutant p53 GOF in malignant progression of CRC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん マウスモデル 転移 再発

1. 研究開始当初の背景

現在、大腸がん患者の約 80%以上は手術技術の進歩によって生存可能になった。しかしながら、転移、再発した大腸がん患者の生存率は依然として低く、今なお 15%にとどまっている。したがって、大腸がんの再発・転移に深く関与するがん遺伝子の同定とその遺伝子を介したメカニズムの究明が大腸がんの再発・転移克服につながる。現在、大腸がん動物モデルとして、AOM/DSS モデルや *Apc* KO マウスが広く使われている。前者の薬剤誘導性の急性炎症は、がんで認められる慢性炎症とは異なる点が多い。一方、*Apc* KO マウスは大腸がん腺腫発生メカニズム解明に有効であったが、がん転移には至らない。ヒト大腸がんにおける転移や再発を適切に反映した動物モデルを確立することが、大腸がん悪性化進展機構の解明のカギとなる。

ヒト大腸がん発生過程では、Wnt シグナル系の恒常的活性化に至る遺伝子変異が大腸がん発生の初期遺伝子異常であることが知られている(図 1)。一方、大規模ゲノム解析から、*Smad4* 変異など TGFβ 経路が抑制されている大腸がんは約 36%、がん抑制遺伝子 *Trp53* 変異により p53 経路が抑制されているものは約 62%であり、両者の抑制は全体の 21%にのぼる (Cancer Genome Atlas Network, *Nature*, 2012)。p53・TGFβ 両シグナル系のダブル抑制が大腸がん悪性化の遺伝的背景と考えられる(図 1)。実際に変異型 *Trp53* (*Trp53*^{R172H} or *R270H*) 発現マウスの表現型はヒトがんに近い (Olive *et al. Cell*, 2004)。さらに、変異型 *Trp53* を腸管上皮細胞で発現させると、ヒトがん組織と同様に NF-κB の活性化や炎症反応が誘発され、さらに腸上皮細胞の浸潤も認められた (Cooks *et al. Cancer Cell*, 2013)。一方、*Smad4* 欠損腸管上皮細胞はがん悪性化を促進する微小環境形成に寄与することが示唆されている (Kitamura *et al. Nat. Genet.*, 2007)。加えて、申請者は TGFβ 型受容体 (*Tgfr2*) KO マウスを使った DSS 大腸炎モデルで、炎症依存的な腸上皮細胞の浸潤を観察している (未発表)。以上、ヒト大腸がん発生・悪性進展の遺伝子異常を基盤に、Wnt シグナル活性化、*Trp53* 変異、TGFβ 抑制を遺伝的背景として導入されたマウスを大腸がん悪性化モデルマウスとして作製し、これら遺伝子異常に

よってもたらされるがん細胞への形質変化、それによって形成されるがん微小環境の特性を解明することが、大腸がん転移・再発機構の解明につながると考えられる。

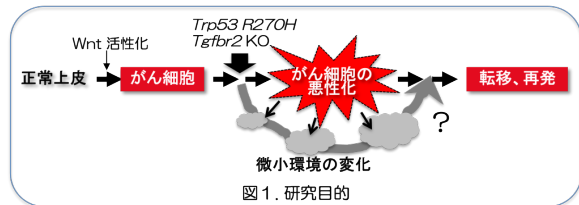


図 1. 研究目的

2. 研究の目的

本研究は、ヒト遺伝子異常を反映する大腸がん悪性化進展モデルマウスを作製するとともに、本モデルを用いてがん細胞の形質変化、がん微小環境特性と浸潤・転移性獲得機構を明らかにし、これにより大腸がんの転移・再発のメカニズム解明を目的とする。以下の研究を実施することによって本研究の目的を達成する。

3. 研究の方法

研究 1) マウス作製 申請者の研究室では大腸がん解析に必要なマウスをすでに樹立または導入しており、これらの交配によって大腸がん悪性化モデルマウスの作製を計画している(図 2)。具体的には、申請者は 2013 年 5 月までに *Apc/Trp53*^{mIEC} マウスの作製を終え、*Apc/Trp53*^{mIEC} *Tgfr2*^{KO} IEC マウスの作製を始めている。

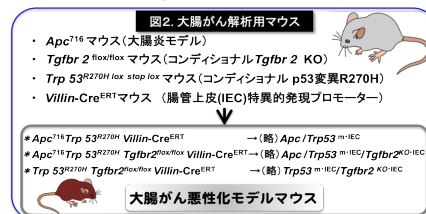


図 2. 大腸がん解析用マウス

研究 2) 各モデルマウスの大腸がん悪性度の解析

Apc^{Min} *Trp53* KO マウスと *Apc*^{Min} マウスの腸管腫瘍に形態学的変化は見られないが (Clarke *et al. Oncogene*, 1995)

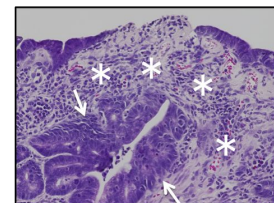


図 3. 結腸ポリープ (H&E 染色) 間質増生 (*) と浸潤性変化 (矢印) がみとめられる。

現在得られている *Apc/Trp53*^{mIEC} マウスの初期大腸腫瘍の病理解析では、悪性化に特徴的な間質増生 (図 3*)

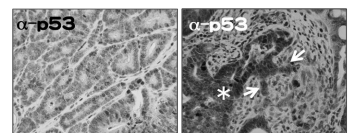


図 4. *Trp53* 変異によってポリープでは p53 タンパク安定化 (*), p53 陽性の浸潤性細胞 (矢印) も見られる。

印) や、腫瘍細胞の局所的な浸潤性変化 (図 3,4 矢印) さらに p53 の安定化 (図 4 * 印) が見られ、すでに悪性化能獲得を示す予備の結果を得ている。他のモデルマウスについても原発巣の腫瘍細胞形態や、腸管粘膜下浸潤、脈管浸潤、リンパ節転移、肝転移などの有無や程度について、病理学的な解析によって明らかにする。

研究 3) 悪性化過程における「腫瘍細胞」の形質変化

各モデルマウスの腫瘍の増殖や浸潤、EMT について免疫組織学的に解析する。また申請者は正常腸管上皮細胞の三次元オルガノイド培養法を、Nick Berker 博士 (IMB, Singapore) の研究室より修得している (図 5)。この手法を用いて個体でみられる形質変化が *in vitro* でも再現されるか解析し、各がん抑制遺伝子変異の組み合わせが、腫瘍細胞形質に及ぼす変化を明らかにする。転移・再発が確認された個体モデルは転移先の腫瘍を培養し、原発巣オルガノイドとの比較をおこなう。

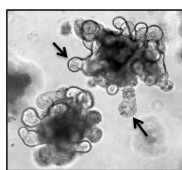


図5 腸管オルガノイド培養1週間目。多くのクリフト(矢印)が出芽している。

4 . 研究成果

Apc, Trp53-R270H 変異を入れたマウス(AP)の腸管腫瘍は、同じく Trp53-null (欠損) マウス(AP-null)の腫瘍と比較して、粘膜下への浸潤腫瘍(Adenocarcinoma)が有意に多く発症した。この悪性化は Trp53-R270H 変異の Gain of Function (GOF)によるものと考えられる。また、この浸潤腫瘍の浸潤先端部の腫瘍細胞では、顕著な Trp53 の核蓄積が観察された。このような病理所見はヒトの悪性化大腸がんでよく観察される。さらに、このマウス原発巣から腫瘍オルガノイドを作成した結果、マトリゲル内での構造は、Apc 変異単独(A)、もしくは AP null オルガノイドと比較し AP オルガノイドは複雑な腺管構造を取ることがわかった。この腺管構造は Invasion assay の能力にも関連しており、薬剤 (SAHA) によって Trp53 の核蓄積を抑制するとオルガノイドの Invasion assay も抑制され、形態も A や AP null オルガノイドと同じような形態となった。さらに、このような腺管構造はヒト大腸がんにおいても、TP53 野生型と比べ TP53-R273H 変異の腫瘍で有意に多く観察された。

さらに AP オルガノイドをマウス皮下へ移植すると Myofibroblast など間質反応を伴った腫瘍を形成し、このような反応は AP null オルガノイドと比較すると顕著であった。オル

ガノイドの発現解析から Trp53-R270H 変異依存的に上昇する約 350 個の遺伝子群を同定した。これらは、自然免疫や炎症に関連しておりがん微小環境形成へ寄与している可能性が示唆された。さらに、Wnt シグナルと NF κB シグナルの相乗的亢進はがん細胞の未分化性獲得、不整腺管形成を促進していることもわかった。

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 2 件)

1. Mizuho Nakayama, Eri Sakai, Kanae Echizen, Yoichi Yamada, Hiroko Oshima, Taesu Han, Rieko Ohki, Satoshi Fujii, Atsushi Ochiai, Sylvie Robine, Dominic Chih Cheng Voon, Tomoaki Tanaka, Makoto Mark Taketo, Masanobu Oshima. Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation. **Oncogene** (in printing, 2017 掲載号未定) [査読有り]
2. Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Taketo MM, and Oshima M. Suppressing TGF β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. **Cancer Res**, 75: 766-776, 2015. [査読有り]
- 3.

[学会発表](計 4 件)

第 75 回日本がん学会 (2016.10/6-8 横浜市) 中山瑞穂、坂井絵梨、越前佳奈恵、大島浩子、Taesu Han、大木理恵子、落合淳志、Dominic Voon、武藤誠、大島正伸

Nuclear localized mutant p53 causes invasion and metastasis by drastic morphological changes of colorectal tumor gland (ポスター発表)

第 74 回日本がん学会 (2015.10/8-10 名古屋市) 中山瑞穂、坂井絵梨、大島浩子、武藤誠、大島正伸

Mutant p53 promotes intestinal tumorigenesis by alteration of tumor cell characteristics in *Apc*^{A716} mice. (ポスター発表)

The 10th International Symposium of the Institute Network “Towards the next generation research for Cancer and Immunology” (2015.7/23 札幌市)

Mizuho Nakayama, Eri Sakai, Hiroko Oshima, Makoto M. Taketo, Masanobu Oshima. Mutant p53 increase invasive adenocarcinoma of intestinal tumors in *Apc*^{Δ716} mice
(ポスター発表)

第 73 回日本がん学会 (2014.9/25-27 横浜市) 中山瑞穂、大島浩子、大島正伸
Progression to malignant adenocarcinoma of intestinal tumors by *p53* mutation in *Apc*^{Δ716} mice. (ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：転移性大腸がんモデル
発明者：大島正伸、中山瑞穂、坂井絵梨
権利者：
種類：
番号：P16-021
出願年月日：平成 28 年 9 月 8 日
国内外の別：国内

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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山瑞穂 (NAKAYAMA Mizuho)
金沢大学・がん進展制御研究所・腫瘍遺伝学
研究分野・助教
研究者番号：20398225

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()