

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：72609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10558

研究課題名(和文) 大腸がん転移を規程する間質細胞の因子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of genes regulating metastasis in cancer stroma of colorectal cancer.

研究代表者

関谷 剛男 (Sekiya, Takao)

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究所所長(移行)

研究者番号：70142651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんの浸潤・血管新生・転移の成立には、間質細胞であるリンパ球、マクロファージ、線維芽細胞などのがん微小環境と癌細胞との相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、不明な点が数多く存在する。本研究の目的は間質細胞の大腸がん転移における役割を明らかにすることである。我々はゼブラフィッシュを用いた大腸がん転移モデルとトランスポゾンを用いた挿入変異導入系の確立および間質細胞における大腸がん転移促進・抑制遺伝子の同定および機能解析を試みているが、有望な候補因子は見いだせていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がん患者の死因の多くは、遠隔転移に起因する割合が最も高く、大腸がんの死因の約1/3を占めるが、現段階では、遠隔転移の早期診断法や有効な治療法もない。その理由の一つは、大腸がん転移メカニズムが解明されていないためである。つまり、転移メカニズムの解明は、転移の早期診断法や有効な治療法を開発するための有益な情報となる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the interaction between stromal cells and cancer cells plays an important role for metastasis in colorectal cancer. However, their molecular mechanisms are largely unknown. In this study, the purpose is to clarify the role of stromal cells in colorectal cancer metastasis. We tried to establish a colorectal cancer metastasis model using zebrafish and an insertion mutation transduction system using transposon, and to identify and perform functional analysis of the genes for colorectal cancer metastasis promoting or suppressing in stromal cells. However, we have not identified the genes yet.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ヒト大腸がん がん転移 間質細胞 ゼブラフィッシュ 転移抑制促進遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がん転移の分子メカニズムの解明は治療戦略を考える上で重要な位置を占めている。大腸がん患者の死因の多くは、遠隔転移に起因する割合が最も高いが、現段階では、遠隔転移の早期診断法や有効な治療法もない、その理由の一つは、大腸がん転移メカニズムが解明されていないためである。つまり、転移メカニズムの解明は、転移の早期診断法や有効な治療法を開発するための有益な情報となる。

大腸がんは、APC 遺伝子の両方のアリルへの変異により腫瘍の形成がはじまり、さらに、KRAS 遺伝子、SMAD4 遺伝子、TP53 遺伝子、PIK3CA 遺伝子への変異と、多段階的に遺伝子変異が積み重なることにより転移につながると考えられており、実際、これら 5 つの遺伝子変異が大腸がんで高頻度に認められることが明らかになっている (Fearon E. R. & Vogelstein B, cell 1990; Muzny DM et al, Nature 2012)。しかしながら、最近、これら 5 つの遺伝子変異だけでは大腸がんは転移に至らないことが示されている (Sato T et al, Nature Medicine 2015)。これは大腸がんの転移には、がん細胞自身の遺伝子変異の他に重要な因子が存在することを示唆する結果である。

近年、様々ながん種で周囲に存在する間質細胞ががん転移を促進することが明らかにされている。大腸がん転移においてもがん細胞と周囲の間質細胞との相互作用が転移を促進していることが明らかにされており、現在までに、間質細胞における TGF- β グナルの亢進が大腸がん転移に重要な役割を果たすことが明らかにされているが、それ以外の因子は不明である (Calon A et al, Nature genetics 2015)。

2. 研究の目的

本研究は、ゼブラフィッシュを用いた大腸がん転移モデルとトランスポゾンを用いた挿入変異導入系を用いて、間質細胞における大腸がん転移促進・抑制遺伝子の同定および機能解析を行い、間質細胞の大腸がん転移における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. ゼブラフィッシュを用いた大腸がん転移モデルの作製

1) 蛍光染色した大腸がん細胞株の作製

ゼブラフィッシュを用いた大腸がん転移モデルを作製するに当たって、大腸がん細胞の移動(転移)をモニタリングしなければならない。そこで、蛍光染色液を用いた大腸がん細胞株の蛍光染色法を検討した。

2) 蛍光染色した大腸がん細胞株のゼブラフィッシュへの移植

ゼブラフィッシュは受精後 48 時間以内では免疫機構が不完全なため、ヒトがん細胞移植に対する拒絶反応を示さない。蛍光染色した大腸がん細胞株を受精後 48 時間以内のゼブラフィッシュに移植した。移植箇所は卵黄嚢、Duct of cuvier (卵黄にある血管構造)を考えているが、まず、技術的に簡便な卵黄嚢への移植を検討した。

2. トランスポゾンを導入したトランスジェニックゼブラフィッシュの作製

1) トランスポゾンベクターの有無を確認するためのレポーター遺伝子を導入したベクターの作製

本研究では、トランスポゾンが遺伝子のの上流に挿入された場合にはその過剰な発現を誘導でき、遺伝子の内部に挿入された場合にはその機能を欠損させることができるように設計されているベクターを利用した。本ベクターの導入の有無の確認をするために必要なレンズ特異的に赤色蛍光を発色するベクターの作製を行った。

2) トランスポゾンとレポーター遺伝子のゼブラフィッシュへの導入

上記のトランスポゾンベクターとレポーター遺伝子を導入したベクターをゼブラフィッシュに導入した。ゼブラフィッシュへの遺伝子導入は、1 細胞期の受精卵にマイクロインジェクション法を用いて行った。

3. 間質細胞特異的にトランスポザーゼを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの作製

1) 間質細胞特異的にトランスポザーゼを発現させるベクターの構築

がん間質細胞は、繊維芽細胞、および T 細胞、B 細胞、マクロファージ、好中球、骨髄由来炎症抑制細胞など骨髄由来の細胞から構成されている。我々は、間質細胞のなかでもゼブラフィッシュにおいて、早期に成熟するマクロファージや好中球などの骨髄球系細胞に着目する。骨髄球系細胞で特異的に発現する遺伝子は spi1 である (Ward AC et al, Blood 2003)。本研究では、spi 1 プロモーターおよびトランスポザーゼを用いて間質組織中の骨髄球系細胞特異的にトランスポザーゼを発現するためプラスミドベクターの構築を行った。

2) 間質細胞特異的にトランスポザーゼを発現するプラスミドのゼブラフィッシュへの導入

Spi1 プロモーター制御下でトランスポザーゼを発現するプラスミドをゼブラフィッシュへ導入する。ゼブラフィッシュへの遺伝子導入は、1 細胞期の受精卵にマイクロインジェクション法を用いて行った。また、染色体への遺伝子導入効率を上げるために、メダカ由来のトランスポゾン (tol2) の mRNA を同時に導入した。

4. 研究成果

1. ゼブラフィッシュを用いた大腸がん転移モデルの作製

1) 蛍光染色した大腸がん細胞株の作製

今回は、HCT116、HT29、SW480 の大腸がん細胞株を、蛍光染色液である Vybrant cell-Labeling solution で染色した。染色液の濃度は 5 μ M にし、染色時間を検討した。その結果、HCT116 は 20 分、HT29 と SW480 は 25 分で十分な染色がみられた。

2) 蛍光染色した大腸がん細胞株のゼブラフィッシュへの移植

蛍光染色した大腸がん細胞株を受精後 48 時間以内のゼブラフィッシュに移植した。移植箇所は卵黄嚢、インジェクションに使用した細胞数は 250 および 500 にした。

ゼブラフィッシュに導入した HCT116、HT29、SW480 の細胞増殖、細胞移動、生存率ともに以下のような傾向を示した。

細胞増殖

- ・インジェクション後 3 日まで細胞増殖が見られた。
- ・インジェクション後 4 日以降は、変化がないか若干の減少傾向がみられた。

細胞移動

- ・インジェクション後 3 日までに（若干）細胞移動が見られた
- ・しかし、劇的な細胞移動（転移）は見られなかった。

生存率

- ・細胞数を 250 から 500 にすると生存率が下がる傾向があった。

今回用いた細胞株は劇的な転移を示さなかった。今後、大腸がん細胞株以外の細胞株についても検討を行い、がん転移モデルに適した細胞株を得て、本モデルを完成させたい。

2. トランスポゾンを導入したトランスジェニックゼブラフィッシュの作製

1) トランスポゾンベクターの有無を確認するためのレポーター遺伝子を導入したベクターの作製

トランスポゾンベクターのゲノムへの導入の有無の確認をするために必要なレンズ特異的に赤色蛍光を発色するベクターは、赤色蛍光タンパク質を発現するベクターのプロモーター部分をレンズ特異的に発現する alpha-a crystallin プロモーター (Kurita R et al, Dev Biol, 2003) に入れ替えて作製した。

2) トランスポゾンとレポーター遺伝子のゼブラフィッシュへの導入

上記のトランスポゾンベクターとレンズ特異的に赤色蛍光タンパク質を発現するベクターを導入したゼブラフィッシュを作製し、現在、F0 世代の個体を得ることができた。

今後、得られた個体と野生型のゼブラフィッシュと交配し、目的遺伝子の生殖系列への伝達を確認できたのちに、目的遺伝子のコピー数を算出し、コピー数の多い個体を選抜する。

3. 間質細胞特異的にトランスポザーゼを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの作製

1) 間質細胞特異的にトランスポザーゼを発現させるベクターの構築

我々は、間質細胞のなかでも骨髄球系細胞に着目する。骨髄球系細胞で特異的に発現する遺伝子は spi1 である。本研究では、spi1 プロモーターにトランスポザーゼを繋いで、骨髄球系細胞特異的にトランスポザーゼを発現するためプラスミドベクターを作製した。

2) 間質細胞特異的にトランスポザーゼを発現するプラスミドのゼブラフィッシュへの導入

Spi1 プロモーター制御下でトランスポザーゼを発現するプラスミドおよび染色体への遺伝子導入効率を上げるために、メダカ由来のトランスポゾン (tol2) の mRNA を同時に導入し、目的のトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。現在、F0 世代の個体を得ることができた。

今後、得られた個体と野生型のゼブラフィッシュと交配し、目的遺伝子の生殖系列への伝達を確認したのちに、トランスポゾンベクターとレンズ特異的に赤色蛍光蛋白質を発現するベクターを導入したゼブラフィッシュと交配して骨髄球系細胞特異的に挿入変異を導入できるゼブラフィッシュを作製する。本ゼブラフィッシュを用いて、大腸がん転移モデルを作製し転移抑制・促進因子を同定およびその機能解析を行っていく予定である。

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 6件）

1. 著者名 Takakuwa Kazuya, Mogushi Kaoru, Han Min, Fujii Tomoaki, Hosoya Masaki, Yamanami Arina, Akita Tomomi, Yamashita Chikamasa, Hayashida Tetsu, Kato Shunsuke, Yamaguchi Shigeo	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel diagnostic system to evaluate epidermal growth factor receptor impact as a prognostic and therapeutic indicator for lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63200-7	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 Shigeo Yamaguchi, Tomoaki Fujii, Yuki Izumi, Yuki Fukumura, Min Han, Hideki Yamaguchi, Tomomi Akita, Chikamasa Yamashita, Shunsuke Kato and Takao Sekiya	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification and characterization of a novel adenomatous polyposis coli mutation in adult pancreaticoblastoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 10818-10827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24017	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 Tsuneo Ikenoue, Yumi Terakado, Chi Zhu, Xun Liu, Tomoyuki Ohsugi, Daisuke Matsubara, Tomoaki Fujii, Shigeru Kakuta, Sachiko Kubo, Takuma Shibata, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichiro Iwakura & Yoichi Furukawa	4. 巻 8
2. 論文標題 Establishment and analysis of a novel mouse line carrying a conditional knockin allele of a cancer-specific FBXW7 mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19769-1	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 Fujii T, Tsunesumi S, Sagara H, Munakata M, Hisaki Y, Sekiya T, Furukawa Y, Sakamoto K, Watanabe S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Smyd5 plays pivotal roles in both primitive and definitive hematopoiesis during zebrafish embryogenesis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/srep23899	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 Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, FukushimaN, Maeda S, Koike K, Furukawa Y.	4. 巻 6
2. 論文標題 A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/srep23899	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 Kawai M, Komiyama H, Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama N, Sato C, Ueyama T,	4. 巻 12
2. 論文標題 Impact of chromosome 17q	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 4773-4778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3892/ol.2016.5271	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 劉 洵, 池上 恒雄, 寺門 侑美, 朱赤, 大杉友之, 松原 大祐, 藤井 智明, 角田 茂, 久保 幸子, 柴田 琢磨, 山口 貴世志, 岩倉洋一郎, 古川 洋一
2. 発表標題 癌で高頻度に見られる新規FBXW7癌特異的変異条件的ノックインマウスの樹立と解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 祐毅 山口 茂夫 藤井 智明 韓 敏 野崎 由美 山下 親正 加藤 俊介
2. 発表標題 成人臍芽腫に見られた新規Adenoma polyposis coli (APC)遺伝子変異の機能解析
3. 学会等名 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoaki Fujii, Shin-ichiro Tsunesumi, Hiroshi Sagara, Miyo Munakata, Yoshihiro Hisaki, Takao Sekiya, Yoichi Furukawa, Kazuhiro Sakamoto, and Sumiko Watanab
2. 発表標題 Expression and functional analysis of Smyd5 in zebrafish
3. 学会等名 American Society for Cell Biology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 池上 恒雄、寺門 侑美、藤井 智明、松原 大祐、山口 貴世志、古川 洋一
2. 発表標題 癌で高頻度に見られるFBXW7変異の条件的ノックインマウスの樹立
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016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
研究分担者	中村 幸男 (Nakamura Yukio) (00549488)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師 (13601)	
研究分担者	藤井 智明 (Fujii Tomoaki) (10511420)	公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・部長(移行) (72609)	