

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03586

研究課題名(和文)大腸がんの形成及び治療薬抵抗性獲得に関わるドライバー遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of colorectal cancer driver genes involved in cancer development and therapeutic resistance.

研究代表者

武田 はるな (Takeda, Haruna)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：80647975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,500,000円

研究成果の概要(和文)：以前の研究において、マウス生体内で大腸がんドライバー候補遺伝子スクリーニングを行い、候補遺伝子を同定した。本研究では、候補遺伝子のがん化能検証を行う実験系を確立し、新規大腸がんドライバー遺伝子を同定することを目的とした。Apc機能欠損型変異とKras活性化型点変異を保持する大腸腫瘍由来のオルガノイドにおいて、CRISPR-Cas9システムにより候補遺伝子をノックアウトし、免疫不全マウスに移植した。これにより腫瘍形成の有無で、候補遺伝子のがん化能を評価する実験系を確立することができた。この実験系を用いて、候補遺伝子29個のがん化能検証を行い、3つの新規大腸がん抑制遺伝子を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のオルガノイドを用いたがん化能検証実験系は、多くの組織に適用可能であり、急速に進むがんゲノム解読研究から明らかにされる多くの変異遺伝子が、がん形成に寄与する変異であるかを生体内で効率的に検証する方法として利用できる。今後のがん研究は、ゲノム解読によって同定された変異遺伝子の機能検証を行う方向に展開していくと考えられ、本研究で確立した方法が、がんの機序解明に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide. In our previous study, we performed genome-wide Sleeping Beauty transposon-based mutagenesis screening in mice and provided comprehensive datasets of candidate CRC driver genes. However, functional validation for most candidate CRC driver genes has not been performed. Here, we describe a platform for functionally validating CRC driver genes that utilizes CRISPR-Cas9 in mouse intestinal tumor organoids in xenograft models. We used genetically defined benign tumor-derived organoids carrying mutations in Apc and Kras. These studies showed that Acvr1b, Acvr2a and Arid2 could function as tumor suppressor genes in CRC. This experimental system can also be applied to mouse intestinal organoids carrying other sensitizing mutations as well as organoids derived from other organs, which could further contribute to identification of novel cancer driver genes and new drug targets.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん マウスモデル がんドライバー遺伝子 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

1) ドライバー遺伝子の同定

がんゲノム解読の研究により、がん組織が保持する数多くの遺伝子変異が同定された。しかしながら、変異のある遺伝子にはパッセンジャー遺伝子とドライバー遺伝子が混在しており、両者の区別をつけることが困難な状態であるためドライバー遺伝子の全体像は不明確な状態となっている。どの遺伝子変異が真にがん形成に寄与しているか、そしてどのようにがん形成に関与しているかについては、いまだ不明な点が多い。申請者は SB 挿入変異誘発法により、マウス生体内において 1310 個の大腸がん形成に関わる候補遺伝子(Takeda *et al.*, *Nature Genet.*, **47**, 2015)を同定した。ヒトのがん組織で変異が認められる遺伝子のデータベースとの比較を行い、マウスとヒトで共通して変異の認められる遺伝子を抽出した。本研究ではこれらヒトのがん組織で変異が見つかる遺伝子の中でも、特にがん抑制候補遺伝子と考えられるものに着目し、がん化機能の検証を網羅的に行うことでドライバー遺伝子の抽出を行う。がん抑制遺伝子は、がんにおいて変異のある遺伝子の 9 割以上を占めており、細胞増殖・分化の制御などシグナルネットワークにおいて中心的な役割を担っている。消化器がんに関しても、フレームシフトや終止コドン変異により遺伝子機能を損失している遺伝子が多いなど、がん抑制遺伝子の寄与は大きい。がん抑制遺伝子の機能検証をするにはノックアウトマウスを作成し、がん形成へ促進的な影響を及ぼすかを解析することが確実であるが、多くの遺伝子を検証するには非効率であるため、本研究では腸上皮細胞の三次元培養(オルガノイド)法を用いる。

2) 治療薬耐性能を与える遺伝子のスクリーニング

抗がん剤投与後のがんの再発が臨床の現場では問題となっている。大腸がんに関しては細胞増殖を抑える薬剤である 5-フルオロウラシルや分子標的治療薬である EGFR 阻害薬が用いられているが、投与後に再発するがん細胞はどのような遺伝子変異を獲得し、どのようなシグナル経路が脱制御されているのか、大腸がんに関しては不明な点が多い。抗がん剤に対する抵抗性を獲得する過程にはがん組織内の遺伝学的不均一性が関与していると考えられているが、遺伝学的に不均一な細胞集団を人為的にモデルできるシステムが無かったため、詳細な解析はされていない。抗がん剤投与によって引き起こされる微小環境の変化ががん細胞の遺伝子変異プロファイルの変化にどのような影響を与えるかを解明できれば、複数の薬剤を投与することでがんの再発を抑えることにつながる。SB トランスポゾン挿入変異誘発法を用いたシステムは、遺伝子変異をランダムに、かつゲノムワイドに誘発し続けることができるシステムであるので、これを用い、治療薬抵抗性を示す遺伝子をスクリーニングすることを第二の目的とする。

2. 研究の目的

1) これまでの研究において同定してきた大腸がんドライバー候補遺伝子に関し、特に Wnt と TGF β 経路に関与するかに着目しながらがん化能検証実験を行い、ドライバー遺伝子を抽出することを目的とする。そのために、消化管上皮オルガノイド培養法や CRISPR システム、生体マウスを用いた実験系を確立し、がん化能検証を行う。

2) 薬剤投与によって引き起こされるがん微小環境の変化が、大腸がん細胞の遺伝子変異選択圧へどのような影響を与えるかを解明することを目的とし、Sleeping Beauty (SB) トランスポゾン挿入変異誘発法を用い、大腸がん治療薬に対する耐性を獲得させる遺伝子群をスクリーニングで同定することにより、新しい治療法の確立へと結びつける。

3. 研究の方法

1) 消化管上皮細胞をオルガノイド培養し、ドライバー候補遺伝子 10 個に対する gRNA ライブラリーを作成し導入することで、遺伝子のホモノックアウト細胞を作成する。これを増殖因子非存在下で培養し、免疫不全マウスの皮下へ移植する。腫瘍組織に濃縮された gRNA を同定し、ドライバー遺伝子の同定へと結びつける。これらドライバー遺伝子に関し、さらに個別検証、機能解析を行い、新規がん形成メカニズム解明、新規治療標的の同定へと結びつける。

2) SB トランスポゾン挿入変異誘発法を用いて、大腸がん治療薬やシグナル阻害剤に対する耐性を与える原因となる遺伝子群をスクリーニングで同定することにより、大腸がんの治療抵抗性獲得メカニズムをゲノムレベルで明らかにする。

4. 研究成果

1) がんドライバー候補遺伝子のがん化能を検証するために用いる細胞は、遺伝子変異ができるだけ少なく、且つ遺伝学的背景が明確なものが理想であるため、遺伝的背景が均一なマウス消化管上皮腫瘍由来のオルガノイドを用いた。不死化させやすくするために、ヒトの大腸がんで高頻度に観察される遺伝子変異である *Apc*

機能欠損型変異と *Kras* 活性化型点変異を保持する大腸腫瘍由来のオルガノイド(AK オルガノイド)を用いた(図1A)。まず、AK オルガノイドに Cas9 を導入し、恒常的に Cas9 を発現するオルガノイドを樹立した(図1B,C,D)。多数のがん抑制遺伝子を効率的にノックアウトするために、CRISPR-Cas9 システムを用い、複数の候補遺伝子に対する gRNA ライブラリを作成して導入し、その後免疫不全マウスに移植した(図1E)。この結果、腫瘍形成の有無により候補遺伝子のがん化能を評価する実験系を確立することができた。この実験系を用いて、3種類の gRNA ライブラリを作成し、合計 29 個

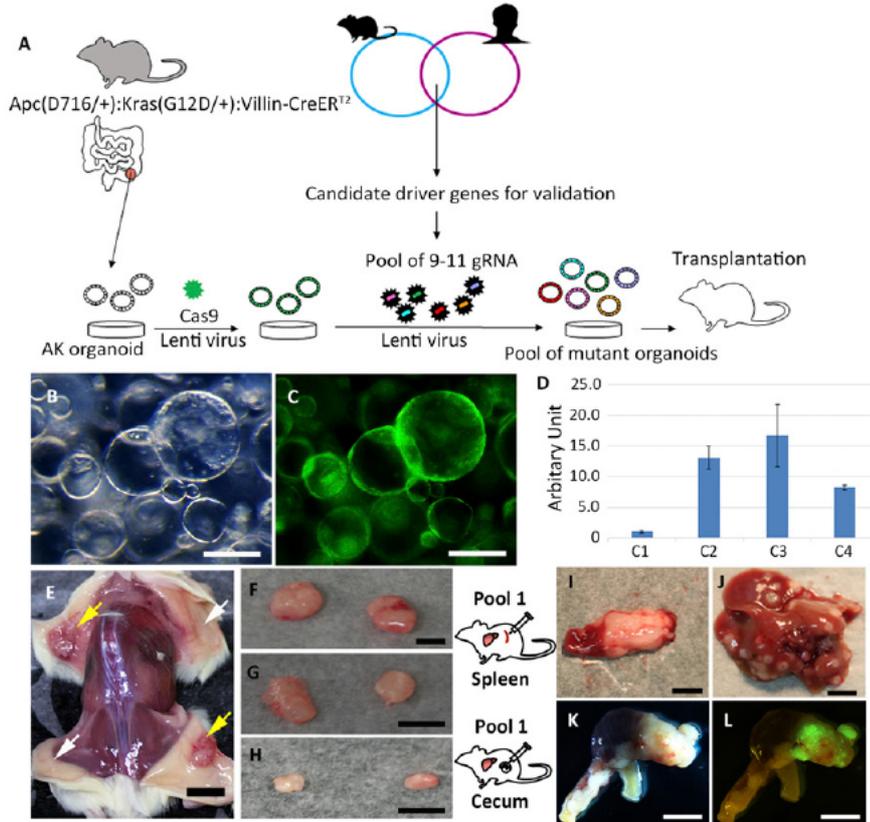


図1 マウスオルガノイドを用いたがん化能検証実験系の樹立。A. AKオルガノイドとCRISPR-Cas9を用いた実験デザイン。B. Cas9とGFPを発現するプラスミドをAKオルガノイドに導入し、その後クローニングして恒常的発現株を樹立した。AK-Cas9の明視野画像。C. AK-Cas9におけるGFPの発現を可視化。D. クローンごとのCas9の発現をRT-qPCRで比較した。E. gRNAプールを導入したAK-Cas9オルガノイドは腫瘍を形成したが(黄色矢印)、gRNAプールを導入しない場合は、腫瘍を形成しなかった(白色矢印)。F-H. 3種類のgRNAプールを作成し、腫瘍形成を誘導した。gRNAプール1(F)、gRNAプール2(G)、gRNAプール3(H)。I. J. gRNAプール1を脾臓に移植すると、肝転移が形成された。K. L. gRNAプール1を盲腸に移植すると腫瘍が形成された。スケールバー: B, C, 250 μ m; E, 1 cm; F-L, 5 mm.

の候補遺伝子のがん化能検証を行った(図1F,G,H)。この結果、3つの新規大腸がん抑制遺伝子を同定することに成功した。さらに、皮下移植だけでなく、脾臓や盲腸に移植することで転移関連遺伝子のスクリーニングも行えることをさらに見出した(図1I,J,K,L)。

同定した3つの遺伝子のうち2つは、TGF β スーパーファミリーに属するアクチビン受容体をコードする遺伝子であった。同じスーパーファミリーに属する TGF β 経路は、大腸がん形成において重要な働きをするシグナル経路であるため、アクチビン経路と TGF β 経路の関連性を、ヒト大腸がんで認められる遺伝子変異のデータベースを用いて解析すると、TGF β 受容体とアクチビン受容体の変異が共起的であることが明らかにされた。この事実を実験的に検証するために *Apc* と *Kras* に加え TGF β 受容体(*Tgfbr2*)に変異が導入された AKT オルガノイドを用いてアクチビン受容体をノックアウトし、マウスに移植した。その結果、腫瘍形成能が促進したことより、2つのシグナル経路の遮断は協調的に作用し、腫瘍形成に関与していることを示した。これらの結果をまとめて論文発表した。

2) SB 挿入変異が誘発したマウス大腸上皮細胞よりオルガノイドを樹立した。これを EGF や Rspo1 等の増殖因子非存在下で培養することで、不死化させた。その後、5-フルオロウラシル等の抗がん剤や大腸がんで活性化するシグナル経路阻害剤を添加し、耐性となるオルガノイドを得ようとした。しかしながら、耐性となる細胞の割合が少なく、ゲノム回収の段階まで進むことが困難であった。耐性細胞を得ることが難しい理由として、SB 挿入変異導入による耐性能獲得前に、薬剤の効果による細胞死が引き起こされてしまう可能性が考えられた。今後は、より悪性度の高い細胞へとオルガノイドを誘導する、細胞数を増やし挿入変異がゲノムワイドに起きている状況で薬剤を添加する、マウス生体内でのスクリーニングに切り替える等の条件検討を行うことを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 1. Takeda H, Kataoka S, Nakayama M, Ali MAE, Oshima H, Yamamoto D, Park JW, Takegami Y, An T, Jenkins NA, Copeland NG, Oshima M.	4. 巻 116
2. 論文標題 CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 15635-15644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1904714116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 武田はるな	4. 巻 4
2. 論文標題 CRISPR-Cas9と消化管由来オルガノイドを用いた大腸がんドライバー遺伝子の機能検証	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 消化器病学サイエンス	6. 最初と最後の頁 55-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Haruna, Kiyokawa Etsuko	4. 巻 7
2. 論文標題 Activation of Erk in ileal epithelial cells engaged in ischemic-injury repair	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	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） 10.1038/s41598-017-16714-6	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 1. Sarah P. Short, Jumpei Kondo, Whitney G. Smalley-Freed, Haruna Takeda, Michael R. Dohn, Anne E. Powell, Robert H. Carnahan, Mary K. Washington, Manish Tripathi, D. Michael Payne, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland, Robert J. Coffey and Albert B. Reynolds	4. 巻 127
2. 論文標題 p120-Catenin is an obligate haploinsufficient tumor suppressor in intestinal neoplasia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 4462-4476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 マウス消化管腫瘍由来のオルガノイドとCRISPR-Cas9を用いたがん化能検証実験系の確立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes
3. 学会等名 2. Duke-NUS joint symposium, Kanazawa, Ishikawa, Japan（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 マウス消化管腫瘍由来のオルガノイドとCRISPR-Cas9を用いたがん化能検証実験系の確立
3. 学会等名 3. 蛋白研セミナー，大阪大学 微生物病研究所 谷口記念講堂（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruna Takeda
2. 発表標題 Sleeping Beauty transposon mutagenesis identifies genes involved in colorectal cancer progression
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンを用いた大腸がん形成に関与する遺伝子の同定
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 Sleeping Beauty transposon mutagenesis identified genes involved in colorectal cancer progression
3. 学会等名 国立遺伝学研究所国際シンポジウム 2018, Genome Editing and Functional Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 Sleeping Beautyトランスポゾンを用いた大腸がん形成に関与する遺伝子の同定
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruna Takeda
2. 発表標題 CRISPR-Cas9 screening in organoids identified Acvr2a, Acvr1b and Arid2 as colorectal tumor suppressor genes
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 Sleeping Beauty トランスポゾンを用いた大腸がん悪性化に関与する遺伝子の同定
3. 学会等名 第一回 日本医学会連合Rising Starリトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 マウスモデルを用いた大腸がんドライバー遺伝子の同定と機能評価
3. 学会等名 共同利用・共同研究拠点シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 Identification of driver genes promoting colorectal tumorigenesis
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 Identification of colorectal cancer driver genes
3. 学会等名 XVIth KICancer & StratCan Retreat（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立がん研究センター内の研究内容に関するページ
https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/molecular_genetics/index.html

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
---------	---------