

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07162

研究課題名(和文)大腸がん転移・再発におけるp53遺伝子LOHと不均一性獲得に関する個体モデル解析

研究課題名(英文) Analysis of acquisition of metastasis property by p53 LOH and heterogeneity of tumor cells in CRC mouse model

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんによる死亡の多くは転移や再発など悪性化によるものである。近年のゲノム解析によりドライバー遺伝子は明らかになった一方で、原発巣や転移巣間での遺伝子変異に違いは認められずその分子機構の解明は十分ではない。本研究は多くのがんで共通して発現しているミスセンス変異型p53に着目し、独自に開発したヒト大腸がんドライバー遺伝子変異を持つオルガノイドを用いて、個体レベルで原発巣と転移巣におけるp53遺伝子を調べた結果、ミスセンス変異p53発現腫瘍では多くが野生型p53の消失(LOH)が起きていることを突き止め、さらに、このような細胞が獲得している悪性化形質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんの転移に関わる原因遺伝子はわかっていない。本研究は多くのがんで変異が入っているp53に着目し、大腸がん転移前後のp53遺伝子とそれに伴う腫瘍細胞の悪性形質を調べた。p53に変異が入っただけでは悪性度は低い、これに野生型p53欠損(LOH)が組み合わさることで、高い転移能力を獲得していることが分かった。ヒトのがんで見つかるp53の多くが変異+LOHの組み合わせであることから、このようなp53は転移における責任遺伝子のひとつであることが示唆された。この研究によりp53変異によるがん悪性化の詳細なメカニズムが明らかとなり、また創薬の分野においてもp53はターゲットとして広がり期待される。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of driver gene mutations causes colorectal cancer (CRC). However, it still unknown that which gene is responsible for metastasis. Previously, we generated CRC mouse model which carries four driver gene mutations (Apc, Kras, Tgfbr2, p53; AKTP) and established the organoids from mouse tumor.

This project focused p53 which is the most frequently mutated gene in pan-cancer cohort. We found that LOH of wild type-p53 with mutation cells (AKTPLOH/M), that p53 status is frequently seen in human malignant tumor, are enriched in metastasis legions when AKTP+/M organoids are injected in mouse spleen. Moreover, p53 LOH is required for the dormant cell survival and clonal expansion abilities. RNA seq. analyses revealed that inflammatory and growth factor/MAPK pathways are activated in AKTPLOH/M cells, while the stem cell signature is upregulated in both AKTPNull and AKTPLOH/M cells, indicating p53 LOH promotes mutant p53 driven metastasis through a distinct pathway activation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 悪性化 p53 LOH 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんによる死亡率は他のがんと比べ比較的上位を占め、死亡要因の多くは転移や再発など悪性化によるものである。

よって大腸がんの再発・転移機構の解明は大腸がん克服につながる重要な研究課題である。

近年の大規模なゲノム解析により、大腸がん進行に関与するドライバー遺伝子として、*APC*, *RAS*, *TGFBR2*, *TP53*, *FBXW7*などが明らかにされた (TCGA, *Nature*, 2012)。一方で、原発巣と転移巣間で遺伝子変異に違いは認められず (Vogelstein et al. *Science*, 2013)、転移・再発機構の詳細な分子機構の解明は未だ十分ではないのが現状であった。

申請者は、多くのヒトのがんに共通してみられる p53 ミスセンス変異に着目した。p53 変異は特に悪性化したがんによく発現しているタンパク質で、新規機能獲得 (Gain Of Function ; GOF) による悪性化への関与が示唆されているが、大腸がん悪性化について個体レベルでの詳細な解析はほとんどなかった。そこで、*Apc* と *p53* の複合遺伝子変異マウス (AP マウス) を作製し、その腸管腫瘍 (原発巣) の表現系解析や腫瘍から独自に樹立した細胞やオルガノイドを使った解析から、変異型 p53 依存的に約 350 個の遺伝子が発現誘導されること、また変異型 p53 発現オルガノイドは極めて複雑な腺管構造を形成し浸潤能力も獲得することを発見した。さらに、野生型 p53 が変異型 p53 の細胞内局在を核から細胞質に変化させることを明らかにし、野生型 p53 欠損 (LOH) の重要性も示した (Nakayama et al. *Oncogene*, 2017)。

また、4 種類ドライバー遺伝子 (*Apc*, *Kras*, *Tgfbr2*, *p53*) 複合変異マウス (AKTP マウス) を作製し、腸管腫瘍から樹立したオルガノイド (AKTP オルガノイド) を単一細胞から subcloning すると、得られたクローン細胞はすべて野生型 p53 が欠損 (LOH) していることを発見した。一方で、p53 に変異をもつヒトのがんでは大腸がんを含め、乳がんや子宮がんにおいても 80-90% という高頻度で p53LOH が起きていることが知られる (TCGA, *Nature*, 2012)。

これらの結果は、大腸がんの転移や再発過程では Dormant な状態のがん細胞集団の生存、増殖亢進には p53 ミスセンス変異に加え、野生型 p53 欠損が必要であるとの仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト大腸がんドライバー遺伝子変異を複数もつ大腸がん悪性化モデルマウスの腫瘍から樹立したオルガノイドの移植モデルを用いて、ドライバー遺伝子の複合変異に加え、p53 遺伝子のミスセンス変異と LOH に着目し、大腸がん細胞の転移・再発獲得機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究 1) p53LOH によるがん細胞悪性化形質獲得について

(*in vitro*) AKTP マウスの腸管腫瘍から p53 がヘテロ (+/R270H) のオルガノイド (AKTP^{+/R270H}) を作製し、さらに Subcloning して得られた AKTP^{LOH/R270H} 細胞と、CRISPR-Cas9 により p53 が欠損した AKTP^{Null} 細胞を作製した。また AKT マウス腫瘍から AKTP^{+/+} オルガノイドも樹立した。以上の 4 種類の p53 genotype (+/+, +/R270H, Null, LOH/R270H) をそれぞれもつオルガノイドを用いて悪性化形質 (Anoikis 耐性、クローン化効率など) について調べ p53 genotype との相関関係について考察した。

(*in vivo*) 上記 4 種類の AKTP 細胞を用いて、マウス皮下移植による腫瘍原能力について、またマウス脾臓に移植する大腸がん転移モデルによる転移能力について調べた。また各移植実験に際し、細胞をトリプシンによる単細胞分離、もしくはトリプシンを用いず細胞塊のままの 2 条件での検討もおこなった。

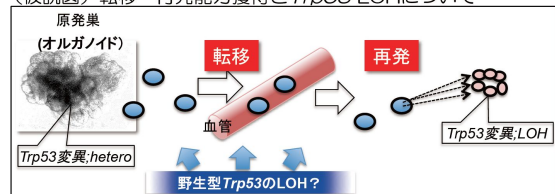
研究 2) 原発巣と転移巣における p53 status の比較

AKTP^{+/R270H} 細胞はマウスの脾臓に移植すると肝臓へ転移するが、肝転移巣と脾臓に形成される腫瘍 (原発巣) での p53 genotype を調べるため、Laser Micro Dissection を用いて組織切片から腫瘍細胞を採取しゲノムを抽出した。また各腫瘍の組織切片やオルガノイドの p53 免疫染色をおこない p53 核蓄積についても調べた。

研究 3) p53 LOH によって誘導される細胞内シグナルの解析

4 種類の p53 genotype-AKTP オルガノイド

(仮説図) 転移・再発能力獲得と *Trp53* LOH について



(AKTP^{+/+}、AKTP^{+/R270H}、AKTP^{Null}、AKTP^{LOH/R270H})について RNA-seq.をおこない IPA およびインフォマティクス解析を行った。

4. 研究成果

研究1) 4種類の p53 genotype-AKTP オルガノイドについて、トリプシン処理した単細胞の条件では Anoikis 耐性、クローン化効率、細胞増殖効率すべてにおいて AKTP^{LOH/R270H} (LOH 細胞) が有意に高い能力を示した。しかしながら、トリプシン処理せずに細胞塊のままの状態だと p53 genotype とこれらの能力に相関性はみられなかった。

一方、トリプシン処理によって単細胞にし、マウス皮下へ移植すると LOH 細胞の腫瘍発生率は他の 3 つの Genotype に比べ有意に多かったが、細胞塊のまま移植すると p53 野生型 (AKTP^{+/+}) を除き、ほぼ変わらなかった。さらに脾臓から肝転移する効率 (転移効率) を比較すると、トリプシン処理した場合 (移植細胞数 300 個)、LOH 細胞のみで肝転移がみとめられた。

研究2) AKTP^{+/R270H} 細胞をマウス脾臓に移植した時の肝転移巣と原発巣 (脾臓の腫瘍) 腫瘍細胞の p53 genotype を比較すると、原発巣ではすべてヘテロ (+/R270H) だったのに対し、肝転移巣では約 50% で LOH が起きていた。また p53 免疫組織染色による核蓄積率も原発巣と比較し、肝転移巣では有意に高かった。

研究3) RNA-seq.による発現解析で得られたデータをもとに IPA をおこない LOH 細胞で特に活性化している pathway を調べた。その結果、野生型 p53 欠損細胞 (AKTP^{Null}、AKTP^{LOH/R270H}) に共通して活性化されているのは Stem cell pathways であった。一方、Inflammatory related pathways と MAPK/Growth factor related pathways は LOH 細胞でのみ活性化されていることがわかった (Fig.)。さらに STRING 解析の結果、この 2 つの相異なる pathway signals はともに Network を形成しているらしいということを示唆する結果も得た。

これらの結果は、大腸がん悪性化における p53 変異と LOH の Combination の重要性として、現在論文投稿中 (in revision) である。

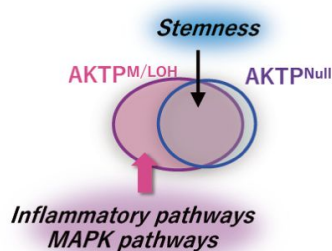


Fig. Activated pathways in the indicated AKTP cell populations

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakayama M and Oshima M.	4. 巻 Epub. ahead of print
2. 論文標題 p53 mutation in colon cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Mol Cell Biol,	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmcb/mjy075.	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 Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Kouyama Y, Niida A, Fujii S, Ochiai A, Nakayama KI, Mimori K, Suzuki Y, Hong CP, Ock CY, Kim SJ and Oshima M.	4. 巻 78
2. 論文標題 Combined mutation of Apc, Kras and Tgfbr2 effectively drives metastasis of intestinal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1334-1346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-3303	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 Mizuho Nakayama, Eri Sakai, Kanae Echizen, Yoichi Yamada, Hiroko Oshima, Tae-Su Han, Rieko Ohki, Satoshi Fujii, Atsushi Ochiai, Sylvie Robine, Dominic Chih-Cheng Voon, Tomoaki Tanaka, Makoto Mark Taketo and Masanobu Oshima	4. 巻 36
2. 論文標題 Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5885-5896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/onc.2017.194	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 Mizuho Nakayama, Chang Pyo Hong, Hiroko Oshima, Eri Sakai, Seong-Jin Kim, Masanobu Oshima	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss of wild-type p53 promotes mutant p53-driven metastasis through acquisition of survival and tumor-initiating properties.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) -	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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nakayama M, Sakai E, Suzuki Y, Oshima H, Oshima M.
2. 発表標題 Combination of gain-of-function mutation and loss of wild-type allele in p53 promotes colon cancer tumorigenicity.
3. 学会等名 第77回日本がん学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuho Nakayama, Eri Sakai, Hiroko Oshima, Kanae Echizen, Satoshi Fujii, Atsusi Ochiai, Keiichi I. Nakayama, Masanobu Oshima
2. 発表標題 Novel model systems for colon cancer progression by accumulation of multiple driver mutations
3. 学会等名 第76回日本がん学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masanobu Oshima, Mizuho Nakayama, Eri Sakai
2. 発表標題 Colon cancer malignant progression by mutant p53 through hyper-activation of Wnt signaling and induction of inflammatory pathway
3. 学会等名 第40回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mizuho Nakayama, Eri Sakai, Hiroko Oshima, Seong-Jin Kim, Patrick Tan, Masanobu Oshima
2. 発表標題 p53-loss of heterozygosity with gain-of function mutation leads to cancer dormancy of intestinal tumors.
3. 学会等名 第78回日本がん学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オルガノイド及びその利用	発明者 大島正伸、中山瑞穂、坂井絵梨	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/32335	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----