

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04026

研究課題名（和文）リプログラミング技術を応用したがん研究

研究課題名（英文）Dissecting cancer biology with reprogramming technology

研究代表者

山田 泰広（Yamada, Yasuhiro）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70313872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞では、正常由来細胞の特徴を失い、しばしば個体発生過程の前駆細胞に類似した性質を示す。しかしながら、この「細胞脱分化」が発がんの「原因」の一つなのか、単に「結果」なのかについては、明らかにされていなかった。本研究では、リプログラミング技術とマウスの発生工学を駆使した先進的なマウスモデルを作製し、積極的に細胞脱分化を誘導した。発がんモデルと組み合わせることで、脱分化が実際に発がんの原因となることを実験的に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の死因の約1/3はがんによる。なかでも膵癌は有効な治療法がなく最も予後が悪いがんである。本研究では、膵癌発生の新たなメカニズムを提唱した。また、がんの原因は遺伝子変異の蓄積であると考えられているが、本研究により、遺伝子配列の異常のみならず周囲環境の変化に応じたエピゲノム制御の変化が非常に重要であることを示した。さらに、細胞の脱分化に関わるエピゲノムを標的としたがん治療の可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells often exhibit dedifferentiation. However, the causal role of the dedifferentiation on cancer development has not been unequivocally demonstrated. In this project, taking advantage of the reprogramming technology and mouse genetics, we demonstrated that dedifferentiation indeed plays a crucial role in the development of Kras-mediated pancreatic ductal adenocarcinoma. We show that the transient expression of reprogramming factors results in the transient dedifferentiation. Mechanistically, repression of enhancers causes the dedifferentiation, which is similarly observed in pancreatitis. In contrast, the forced maintenance of enhancers inhibits the pancreatitis-induced activation of ERK signaling and development of precancerous lesions in Kras-mutated acinar cells. These results underscore a crucial role of dedifferentiation-associated epigenetic regulations in the initiation of pancreatic cancers.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：発癌

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異の蓄積によりがんが発生する。一方で、様々ながん組織において異常な DNA メチル化やヒストン修飾変化がしばしば観察されることから、発がんにおけるエピゲノム制御機構の寄与が示唆されてきた。しかしその実験的証拠は未だ限られている。体細胞から iPS 細胞への初期化に代表されるリプログラミング技術の発展により、細胞の脱分化及び運命制御が可能となりつつある。リプログラミング過程には、塩基配列の変化は必要としないものの、エピジェネティック修飾状態の変化を伴うことが知られている。本研究では、リプログラミング技術をエピゲノム改変のツールとして利用することで、発がんにおけるエピゲノム制御の意義を「細胞脱分化」「がんの起源細胞」「細胞種特異性」に着目し解析した。さらに、その知見を応用して「がん細胞の運命制御の可能性を提示」し、エピゲノム制御による独創的ながん治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

がん細胞では、正常由来細胞の特徴を失い、しばしば前駆細胞の性質を示すことが観察される。しかしながら、この「脱分化」が発がんの「原因」の一つなのか、単に「結果」なのかについては、明らかにされていない。申請者は、生体内での細胞脱分化によるエピゲノムの改変が小児芽腫に類似した発がんを誘導することを明らかにした(*Cell* 2014)。しかし、成人の発がんにおける細胞脱分化の意義は不明である。

本研究では、申請者らが独自に開発した生体内細胞初期化システム(*Cell* 2014)を用いて、各種発がんにおける細胞脱分化の意義を明らかにすることを目的とした。本研究では、細胞初期化技術を用いて、生体内において積極的に脱分化に関連したエピゲノムの改変を誘導することで、発がんにおける脱分化の意義、分子基盤の解明を目指した。特にリプログラミング初期に引き起こされる「エンハンサーの抑制」に着目して解析を進めた。申請者らが作出した生体内細胞初期化システムを各種発がんモデルに適用し、様々な臓器における発がんにおける脱分化関連エピゲノム制御の意義解明を目指した。エピゲノム解析については、申請者らが開発した最新の DNA メチル化解析技術(*Nature* 2017)などを駆使して網羅的な解析を行い、病理組織学的解析による組織形態変化と統合させ、その意義解明を目指した。

本研究ではリプログラミング技術を応用して、以下の目標を設定した。

- [1] 発がんにおける細胞脱分化に関連したエピゲノム制御機構の役割を明らかにする。
- [2] がん細胞由来 iPS 細胞を応用して、がん細胞の起始細胞を同定する。
- [3] 発がんの細胞種特異性の分子基盤を明らかにする。
- [4] エピゲノム制御を標的としたがん細胞の運命制御の可能性を提示する。

3. 研究の方法

リプログラミング技術とマウスの発生工学を駆使した先進的なマウスモデルを作製し、網羅的なエピゲノム解析および詳細な分子病理学的な解析を行うことで、上記目標の達成を目指した。

4. 研究成果

1. *Kras* 遺伝子変異および *p53* 遺伝子変異のみでは膵がんの発生に不十分であることを示した。独自に *Pdx1-Cre* マウスを作製し、膵臓特異的に *Kras* 遺伝子変異と *p53* 遺伝子変異を持つマウスを作製した。6 週齢マウスにおいて膵臓の組織学的解析を行うと、膵組織の大部分の細胞は両遺伝子変異を有するにも関わらず、ERK の活性化 (pERK) はごく一部にしか観察されず、大部分の細胞は正常の組織形態を保っていることを明らかにした。以上の結果から、*Kras* 遺伝子変異と *p53* 遺伝子変異だけでは膵癌発生に不十分であることを明らかにした。

2. OSKM 発現誘導により速やかに膵腺房細胞のエンハンサーが抑制され、脱分化が誘導できることを示した。

エンハンサー活性が細胞の分化状態を保つことが報告されている。*Pdx1-Cre* マウスを、*tetO-OSKM* マウスと交配することで、膵臓でのみ初期化因子 (OSKM: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を誘導可能なマウスを作製した。OSKM を誘導したマウス膵組織でのエンハンサー活性を、転写解析およびヒストン H3K27ac の ChIP-seq を行うことで検討した。OSKM 発現誘導後 48 時間で、膵腺房細胞のエンハンサー活性が強く抑制されることを明らかにした。エンハンサー活性の抑制は、OSKM 発現停止により速やかにキャンセルされることが分かった。OSKM の一過性誘導は膵腺房細胞のエンハンサー活性を一時的に抑制し、可逆性の脱分化が誘導できることを明らかにした。【目標[1]】

3. 細胞初期化因子誘導と *Kras* 遺伝子変異の組み合わせにより速やかに膵臓がんが発生することを示

した。

膵臓でのみ OSKM 誘導可能なマウスに *Kras* 遺伝子変異を導入した。*Kras* 遺伝子変異細胞における OSKM の一時的な発現誘導の影響を検討した。*Kras* 遺伝子変異を有するマウスにおいて OSKM を 3 日間誘導した。マウスには、pERK の発現亢進および広範な線維化を伴う膵前癌病変(PanIN)や膵管癌(PDAC)が混在する腫瘍が発生した。わずか 10 日間で膵臓組織全体が腫瘍化することをから、OSKM の短期発現誘導と *Kras* 遺伝子変異の組み合わせにより膵臓の腫瘍化には十分であることを明らかにした。2 の結果より、OSKM の発現誘導は腺房細胞のエンハンサー活性を抑制し、細胞脱分化を誘導することから、細胞脱分化と *Kras* 遺伝子変異が膵腫瘍発生に十分であることが示唆された。

4. 膵炎では OSKM 誘導と同様に腺房細胞のエンハンサー活性が抑制されることを示した。

Kras 遺伝子変異を持つマウスに膵炎を誘発すると膵の腫瘍化が促進されることが報告されている。次に膵炎による腺房細胞エンハンサーへの影響を検討した。セルレインによる膵炎誘発モデルにおいてヒストン H3K27ac の ChIP-seq を行った。OSKM 発現誘導後と同様に、膵炎においても膵腺房細胞のエンハンサー活性が速やかに抑制されることを明らかにした。膵炎は細胞脱分化により膵腫瘍化を促進することが示唆された。

5. 膵腺房細胞エンハンサー活性の維持により、膵癌の腫瘍化が抑制できることを示した。

3.の結果から、エンハンサー活性の抑制が *Kras* 遺伝子変異を持つ膵細胞の腫瘍化を引き起こすことが明らかとなった。膵腺房細胞のエンハンサー活性を維持することで、膵腫瘍化が抑制できるかを検討した。エンハンサー活性を維持するために、膵腺房細胞のマスター転写因子である *Ptf1a* および *Mist1* を誘導した状態で *Kras* 遺伝子変異を持つマウスに膵炎を誘導した。コントロール群では速やかに前癌病変が発生したのに対して、*Ptf1a* および *Mist1* を誘導したマウスでは前癌病変の形成が抑制された。膵腺房細胞エンハンサー活性の維持により、膵癌の腫瘍化が抑制できることを明らかにした。【目標[4]】

6. 明細胞肉腫(Clear Cell Sarcoma : CCS)由来の iPS 細胞 (CCS-iPSCs) からキメラマウスの作製に成功した。

CCS のドライバー融合遺伝子である *EWS/ATF1* 融合遺伝子を発現誘導することで作製した CCS のマウスモデルを使用した。このマウスモデルの腫瘍から樹立した CCS 細胞株に細胞初期化因子を導入することで iPS 細胞 (CCS-iPSCs) の樹立に成功した。CCS-iPSCs をマウス胚盤胞に移植することで、CCS の遺伝子配列異常を持ち、かつ薬剤依存的に *EWS/ATF1* 融合遺伝子を発現誘導することが可能な細胞を持つキメラマウスの作製に成功した。このキメラマウスに *EWS/ATF1* 融合遺伝子を再誘導したところ、全身のさまざまな組織で *EWS/ATF1* を発現しているにもかかわらず、皮下組織でしか腫瘍は形成されないことを明らかにした。さらに、*Tpp3* 発現末梢神経細胞が CCS の起始細胞であることを示した。【目標[2]】発がんには遺伝子配列異常だけでなく、細胞・組織ごとに異なるエピジェネティック修飾状態も重要であることが示唆された。

7. CCS-iPSCs を用いて作製したキメラマウスにおいて、腫瘍の形成が認められなかった多くの組織では細胞老化が誘導されることを示した。

CCS-iPSCs を用いて作製したキメラマウスでの発がん過程を詳細に解析した。腫瘍が形成されなかった多くの組織では、細胞老化に関連する遺伝子群が発現しており、さらに細胞増殖も停止していることを示した。一方で腫瘍が形成された皮下組織では細胞老化の回避が起こり、速やかに活発な細胞増殖が誘導されることを明らかにした。【目標[3]】

8. CCS モデルを用いて発がんの細胞種特異性の分子基盤を解明した。

上記 CCS モデルにおいて、がん細胞と同じ遺伝子変異をもつにもかかわらず、細胞老化が誘導され細胞増殖が停止するメカニズムを理解するために、CCS と同じ遺伝子変異をもつキメラマウス胎児由来の線維芽細胞を用いてエピゲノム解析を行った。その結果、*EWS/ATF1* は細胞種ごとに異なるエンハンサー領域にリクルートされることを明らかにした。さらに、CCS の細胞株においてエンハンサー領域を人為的に変化させることによりがん細胞に細胞老化が誘導できることを示した。【目標[3]】これらの結果から、がん細胞のエピゲノム状態を制御して細胞老化を誘導することで新たながん治療法を開発出来る可能性を提示した。【目標[4]】

以上のように、本研究では、リプログラミング技術とマウスの発生工学を駆使した先進的なマウスモデルを作製することで、細胞脱分化に関連したエピゲノム制御が膵癌の発生に重要であることを示した。さらに、CCS モデルを利用して、発がんの細胞種特異性の分子基盤、CCS の起始細胞を明らかにした。いずれのモデルにおいてもエンハンサー領域のエピゲノム制御が発がんおよびがん細胞の維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。エンハンサー活性を標的として、がんの制御法の開発に貢献できる可能性を提示した。研究開始時点での目的は達成できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Komura S, Ito K, Ohta S, Ukai T, Kabata M, Itakura F, Semi K, Matsuda Y, Hashimoto K, Shibata H, Sone M, Jo N, Sekiguchi K, Ohno T, Akiyama H, Shimizu K, Woltjen K, Ozawa M, Toguchida J, Yamamoto T, Yamada Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell-type dependent enhancer binding of the EWS/ATF1 fusion gene in clear cell sarcomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11745-1	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 Terada Yukinori, Jo Norihide, Arakawa Yoshiki, Sakakura Megumi, Yamada Yosuke, Ukai Tomoyo, Kabata Mio, Mitsunaga Kanae, Mineharu Yohei, Ohta Sho, Nakagawa Masato, Miyamoto Susumu, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Human Pluripotent Stem Cell-Derived Tumor Model Uncovers the Embryonic Stem Cell Signature as a Key Driver in Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2608 ~ 2621.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.02.009	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 Yagi Masaki, Kabata Mio, Ukai Tomoyo, Ohta Sho, Tanaka Akito, Shimada Yui, Sugimoto Michihiko, Araki Kimi, Okita Keisuke, Woltjen Knut, Hochedlinger Konrad, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 De Novo DNA Methylation at Imprinted Loci during Reprogramming into Naive and Primed Pluripotency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1113 ~ 1128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.04.008	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

1. 著者名 Sakakura Megumi, Ohta Sho, Yagi Masaki, Tanaka Akito, Norihide Jo, Woltjen Knut, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 519
2. 論文標題 Smrbc1 maintains the cellular identity and the chromatin landscapes of mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 705 ~ 713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.054	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 Shibata Hirofumi, Komura Shingo, Yamada Yosuke, Sankoda Nao, Tanaka Akito, Ukai Tomoyo, Kabata Mio, Sakurai Satoko, Kuze Bunya, Woltjen Knut, Haga Hironori, Ito Yatsuji, Kawaguchi Yoshiya, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04449-5	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 Jo Norihide, Sogabe Yuko, Yamada Yosuke, Ukai Tomoyo, Kagawa Harunobu, Mitsunaga Kanae, Woltjen Knut, Yamada Yasuhiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Platforms of in?vivo genome editing with inducible Cas9 for advanced cancer modeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 926 ~ 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13924	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 Sogabe Yuko, Seno Hiroshi, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 109
2. 論文標題 Unveiling epigenetic regulation in cancer, aging, and rejuvenation with in?vivo reprogramming technology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2641 ~ 2650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13731	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 YAMADA Yosuke, YAMADA Yasuhiro	4. 巻 94
2. 論文標題 The causal relationship between epigenetic abnormality and cancer development: <i>in vivo</i> reprogramming and its future application	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 235 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.94.016	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yasuhiro Yamada
2. 発表標題 Dissecting cancer biology with iPS cell technology
3. 学会等名 3rd Sunrise Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Yamada
2. 発表標題 Dissecting cancer biology with iPS cell technology
3. 学会等名 1st Single Cell Symposium in the Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Yamada
2. 発表標題 Dissecting cancer biology with iPS cell technology.
3. 学会等名 AACR annual meeting 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Yamada
2. 発表標題 Dissecting cancer biology with iPS cell technology.
3. 学会等名 CSHA meeting on Stem Cell Crossroads (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Yamada
2. 発表標題 Dissecting cancer biology with reprogramming technology.
3. 学会等名 European Society for Gene and Cell Therapy (ESGCT) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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