

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07254

研究課題名(和文) Apc変異腸管腫瘍におけるMyD88経路の役割解明と治療標的の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the role of MyD88 in Apc mutant intestinal tumor epithelial cells

研究代表者

梶野 リエ (Kajino, Rie)

愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・研究員

研究者番号：20633184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変により初期の大腸がんを再現するマウスモデル(Apc変異マウス)において、MyD88の働きを抑制すると、腸管腫瘍の数が大きく減少する。またこの時、Apc変異を持つ腸管腫瘍細胞の増殖が低下し、細胞死が引き起こされる。Apc変異を持つ腸管腫瘍細胞が細胞死を回避して生き残るためにはMyD88の働きが重要なこと、MyD88の下流ではHIF-1、NF- κ BやWnt経路が働いていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんはがんの中でも患者数が多く、本邦の部位別がん死亡率をみると大腸がんは男性で第3位、女性では第1位であり、効果的な治療法が必要とされている。本研究の成果は、APC変異を持つ大腸がん細胞ではMyD88がアキレス腱となりうることを示しており、MyD88やその下流の因子の働きを阻害する化合物が開発されて臨床で使用できるようになれば、APC変異を持つ多くの大腸がんに対する新しい治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the APC tumor suppressor gene are associated with the onset of adenoma carcinoma sequence in colorectal cancer. Conditional knockout of MyD88 in intestinal epithelial cells reduced the number of intestinal tumors in Apc mutant mice, genetically engineered mouse models of early colorectal cancer. Loss of MyD88 functions in Apc tumor cells resulted in the reduction of proliferation and caused apoptotic cell death. We found that epithelial MyD88 plays essential roles in the survival of the intestinal tumors, and that HIF-1a, NF- κ B and Wnt pathways function downstream of MyD88. Further elucidation of the mechanism is expected to lead to the development of new treatments for colorectal cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Apc変異 大腸がん 合成致死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸がんは、進行度(ステージ)が低ければ外科的治療のみという治療選択が比較的多いが、薬物療法単独および併用の治療が行われる割合はステージ I 期でも 13.0%、II 期で 30.8% と少なくない(国立がん研究センター、2016 年)。抗がん剤治療は、外科的治療後のがん再発予防のため、および外科的治療が困難な進行・再発がんの場合に行われるが、抗がん剤はがん細胞だけでなく正常細胞にも作用するため、血球数の低下等の様々な副作用を生じる。また、特定の分子に作用する分子標的治療薬でも副作用を生じる事が報告されている。重篤な副作用はその後の治療選択を限定し、また生活の質の低下につながるため、正常細胞に悪影響を及ぼすことなく、がん細胞の増殖を抑制する抗がん剤が必要である。

(2) 大腸がんの多くで最初に生じる遺伝子レベルの変化は、*APC (Adenomatous Polyposis Coli)* がん抑制遺伝子の変異と考えられている。*Apc*^{+/716} (以下 *Apc*) 変異マウスは大腸がんマウスモデルとして用いられており、腺腫性ポリープを自然発症するが、この過程には APC 機能欠損による Wnt 経路の活性化に加えて、腸管腫瘍上皮細胞における JNK を介した mTORC1 経路の活性化も必要である。本研究者は、腸管腫瘍における JNK-mTORC1 経路活性化メカニズムの解明を目的とした研究の過程で、「*MyD88* の機能欠損が *Apc* 変異を持つ大腸がん細胞において合成致死を誘導する可能性」を示唆する次の予備的結果を得た。*Apc* 変異マウスで腸上皮細胞特異的に *MyD88* を欠失させると腸管ポリープの数が有為に減少し、また、腫瘍細胞の増殖は低下してアポトーシスが増加したが、正常陰窩への影響は見られなかった。腸管組織より作製したオルガノイド培養において、*MyD88* を欠失させると、腫瘍由来の *Apc* 変異オルガノイドではアポトーシスが引き起こされたが、正常上皮幹細胞由来のオルガノイドでは引き起こされなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*MyD88* の機能欠損が *Apc* 変異を有する大腸がん細胞に合成致死を誘導する分子メカニズムを解明し、同定された関連因子の大腸がん予防・治療標的としての可能性について検討を行い、大腸がん予防・治療法および創薬開発につなげるための基盤情報を得ることである。

3. 研究の方法

(1) 候補因子の探索

MyD88^{F/F};*Villin-Cre*^{ERT2} 変異マウスの腸管正常部位(MV-正常)と、*MyD88*^{F/F};*Apc*;*Villin-Cre*^{ERT2} 変異マウスの腸管腫瘍(MAV-腫瘍)より作成したオルガノイドをタモキシフェン(Tam)処理し、*in vitro*で *MyD88* の欠失を引き起こした。これらのオルガノイドをサンプリングし、TMT プロテオーム解析を実施した。また、*in vivo*との共通変化を見出すためマウスの MV-正常および MAV-腫瘍組織についても同様の解析を実施した。そして、*MyD88* の欠失と *Apc* 変異の有無により変化している因子や経路を探索した。

(2) 候補因子の検討・同定

得られた候補因子について、上記のオルガノイドやマウス腸管組織サンプルを用いたリアルタイム PCR やウェスタンブロットによってその変動を検討し、候補因子を絞りこんだ。続いて、オルガノイドやヒト大腸がん細胞株を用いて阻害剤等により候補因子の合成致死性への影響を検討し、また、マウス腸管組織の免疫組織染色等による検討も行い、関与する因子を同定した。

(3) メカニズムの解明

同定された因子や経路が、*MyD88* の欠失による合成致死メカニズムにどのように関与しているのか、マウス腸管組織サンプル、オルガノイドやヒト大腸がん細胞株を用いて分子生物学的手法により検討した。

(4) 同定因子・経路の治療標的としての評価

同定因子の一つである HIF-1 が *Apc* 変異マウスの腸管ポリープ形成に影響するか検討するため、*HIF-1*^{F/F};*Apc*;*Villin-Cre*^{ERT2} 変異マウスを作出し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) *MyD88* の機能欠損が *Apc* 変異を有する腸管腫瘍細胞に合成致死を誘導するメカニズムに関連する因子・経路として、低酸素関連因子 HIF-1、NF- κ B 経路、Wnt 経路を同定した。

(2) *Apc* 変異マウスで腸上皮細胞特異的に *MyD88* を欠失させると、腸管腫瘍における HIF-1 と HIF-1 標的遺伝子の発現量が減少した(図 1)。また、*HIF-1*^{F/F};*Apc*;*Villin-Cre*^{ERT2} 変異マウス

スで Tam 投与により腸上皮細胞特異的に *HIF-1* を欠失させると、腸管ポリープ形成への影響がみられた（未発表データ）。

(3) *Apc* 変異マウスの腸管腫瘍において、*MyD88* の欠失により、細胞死回避に重要な NF- κ B 経路の構成因子である p65 が抑制された。また、*Apc* 変異マウス腸管腫瘍由来オルガノイドの生育は、NF- κ B 経路の阻害剤処理により抑制された（図 2）。

(4) *Apc* 変異マウスで腸上皮細胞特異的に *MyD88* を欠失させると、腫瘍細胞の増殖を促進する Wnt 経路の転写因子である β -catenin が減少し、Wnt/ β -catenin 標的遺伝子の発現は強く抑制された（図 3）。

以上の結果から、*Apc* 変異を持つ腸管腫瘍細胞が細胞死を回避して生き残るためには *MyD88* の働きが重要なこと、*MyD88* の下流では HIF-1、NF- κ B 経路や Wnt 経路が働いていることが明らかになった。

今後、*MyD88* や本研究で同定した関連因子・経路の働きを阻害する化合物が開発されて臨床で使用できるようになれば、*Apc* 変異を持つ多くの大腸がんに対する新しい治療戦略につながることで期待される。

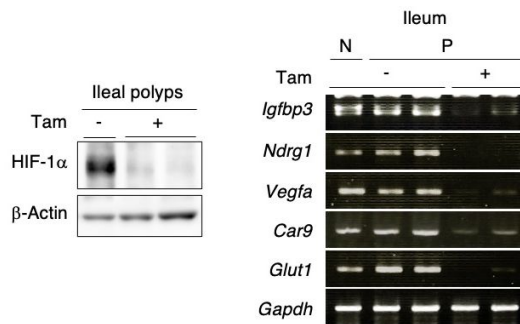


図1 *MyD88^{F/F};Apc;Villin-Cre^{ERT2}*変異マウスの腸管組織におけるHIF-1 α (左)とHIF-1 α 標的遺伝子(右)の発現量

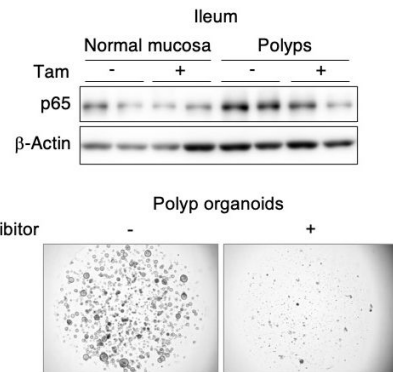


図2 p65の発現量(上)とNF- κ B経路阻害剤処理した*Apc*変異腫瘍オルガノイドの生育(下)

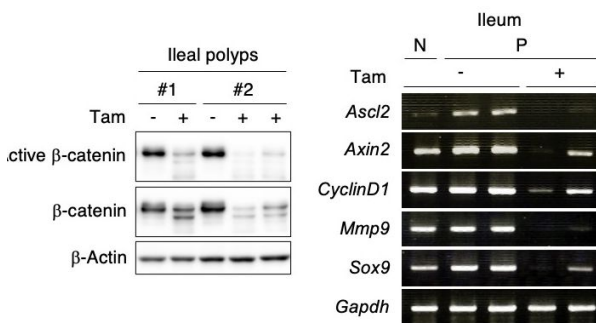


図3 *MyD88^{F/F};Apc;Villin-Cre^{ERT2}*変異マウスの腸管組織における β -catenin(左)とWnt/ β -catenin標的遺伝子(右)の発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kajino-Sakamoto Rie, Fujishita Teruaki, Taketo Makoto Mark, Aoki Masahiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Synthetic lethality between MyD88 loss and mutations in Wnt/ β -catenin pathway in intestinal tumor epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 408 ~ 420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-020-01541-3	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶野リ工、藤下晃章、武藤誠、青木正博
2. 発表標題 Synthetic lethality between Apc mutation and MyD88 loss in intestinal tumor epithelial cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶野リ工、藤下晃章、武藤誠、青木正博
2. 発表標題 Apc変異マウスの腸管腫瘍形成において腸上皮細胞のMyD88が果たす役割の解明
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
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
---------	---------