

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22558

研究課題名(和文) TGF-betaによる大腸がん抑制作用から悪性化誘導へのスイッチ制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of colon cancer suppression and malignant progression by TGF-beta signaling

研究代表者

大島 正伸(Oshima, Masanobu)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：40324610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- β は上皮細胞の分化誘導により大腸がん発生に対してがん抑制性に作用する。一方で、TGF- β はがん細胞の上皮間葉転換(EMT)誘導により悪性化を誘導する。本研究では、TGF- β ファミリーのアクチビンに着目し、ドライバー変異を導入したマウス腸管腫瘍オルガノイドを用いて研究を実施した。アクチビンは良性腫瘍細胞のオルガノイド形成を抑制したが、Kras変異により悪性化形質を獲得したオルガノイドは耐性を示し、さらにp53変異を持つ転移性オルガノイドに対してはEMT様形態変化を誘導した。したがって、Krasとp53変異の蓄積がTGF- β に対する反応スイッチ制御に関わると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- β はがん細胞のEMT誘導により転移形成に関与すると考えられることから、その阻害薬ががん悪性化に対する治療薬として期待されている。一方で、TGF- β には上皮細胞の分化誘導機能による、がん抑制性の作用が知られており、TGF- β シグナルの亢進ががん予防に作用すると考えられる。このように相反するTGF- β シグナルの機能について、本研究ではアクチビンに着目した研究を推進し、がん細胞に導入されたドライバー遺伝子変異に依存した制御の可能性を明らかにした。この結果は、がん発生と悪性化の分子機構の解明に貢献し、TGF- β 阻害薬等による将来の治療戦略の確立にも重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：TGF- β signaling suppresses proliferation of intestinal epithelial cells, while it induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colon cancer cells. Thus, TGF- β plays either of tumor suppressor or tumor promoter role. However, the underlying mechanism has not been elucidated. In this study, we have examined the role of activin, one of TGF- β family cytokines, using mouse intestinal tumor-derived organoids that carried driver mutations in various combinations. Notably, activin treatment suppressed organoid formation of benign tumor cells, while malignant cells with Kras activation mutation showed resistance to activin-induced cell death. Moreover, metastatic cells with p53 mutation showed EMT-like morphological changes and invasion to collagen gel upon activin stimulation. These results suggest that accumulation of driver mutations in Kras and p53 is a possible switching for responses to TGF- β .

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：TGF- β アクチビン 大腸版 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

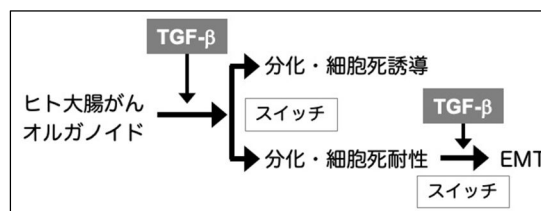
1. 研究開始当初の背景

TGF- β シグナルは腸管粘膜上皮細胞の細胞分化と増殖抑制を誘導し、大腸がんのがん抑制遺伝子として機能する。TGF- β II型受容体の *TGFBR2* や下流のエフェクター分子である *SMAD4* 遺伝子変異が、約30%の大腸がんで認められる。申請者は、TGF- β 経路の遮断が腸管腫瘍細胞の粘膜下浸潤を誘導することを、マウスモデル実験により示した (Oshima *et al*, *Cancer Res*, 2015)。一方でTGF- β は上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を誘導する重要な因子であり、がん細胞の悪性化に作用することが知られている。このように、TGF- β は大腸がん悪性化の抑制と促進の双方を誘導する因子であることが示されているが、このような、がんの発生と悪性化に対して相反する反応を制御するスイッチ機構は未だ不明である。また、がん抑制遺伝子として知られる p53 遺伝子の変異は約50%の大腸がんで認められ、その半数以上ではアミノ酸置換型のミスセンス変異であり、R172H や R270H などを含む変異型 p53 が発現する。近年の研究により、変異型 p53 は新たな機能を獲得し (Gain-of-function, GOF) それががん促進に作用すると考えられている。申請者らも、GOF型変異 p53 の発現が、腸管腫瘍細胞の浸潤能獲得を誘導することをマウスおよびオルガノイド解析で明らかにした (Nakayama *et al*, *Oncogene*, 2017)。しかし、p53GOF 変異による悪性化の分子機構については未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では「TGF- β シグナルに対するがん細胞の反応性が、分化・細胞死誘導から EMT・悪性化誘導にスイッチする制御機構に、どのようにドライバー遺伝子変異が関与するのか探索する」。これまでに、がん細胞の TGF- β に対する反応の制御機構についての研究報告は少なく、本研究の推進により、p53 遺伝子を含むドライバー遺伝子変異に依存した、TGF- β シグナルの「がん抑制」から「がん促進」への転換に関する制御機構の解明を目指す。

本研究計画の立案と推進にあたり、これまでにヒト大腸がんから樹立したオルガノイドを用いた研究で、以下の予備的結果を得ている。すなわち、ヒト大腸がん由来オルガノイドをコラーゲンゲル中で培養し、TGF- β 刺激すると、(1)細胞死が誘導される、(2)生存するが形態変化せずに増殖を続ける、(3)生存して EMT 様の形態変化が誘導される、の3種類に分類された。すなわち、図にしめすように、TGF- β 刺激による「分化・細胞死」の誘導に対するスイッチ機構と、「分化・細胞死」耐性を獲得した上での、TGF- β による EMT 誘導に対するスイッチ機構の2カ所での制御の存在が考えられた。そこには、ドライバー遺伝子変異の蓄積の影響が想定されるため、本研究では、これまでに樹立したドライバー遺伝子変異を異なる組み合わせで導入したマウス腸管腫瘍由来オルガノイドを用いた解析を実施した。



3. 研究の方法

これまでに、大腸がんドライバー遺伝子 *Apc* (A)、*Kras* (K)、*Tgfbr2* (T)、*Trp53* (P)、*Fbxw7* (F) の5種類に異なる組み合わせで変異を導入したマウスを作製し、各マウスモデルに発生した腸管腫瘍からオルガノイドを樹立した。本研究では、A、AK、AKP、AKT、AKTP、AKTPFの各遺伝子型オルガノイドを使って以下の実験を実施した。これらのオルガノイドに含まれる p53 遺伝子変異は R270H の機能獲得型 (GOF型) 変異である。また、*Tgfbr2* 変異を導入したオルガノイドは、TGF- β シグナルが遮断されるため、本研究は TGF- β ファミリーサイトカインのアクチビンに対する反応性を解析した。TGF- β とアクチビンは異なる受容体を介して、細胞内では Smad2/3/4 を介した共通のシグナル活性化に関与する。

(1) アクチビン発現と大腸がん予後の相関解析

データベース解析により、アクチビン発現と大腸がん患者の生存率との相関について明らかにする。さらに、AKTP細胞のマウス脾臓移植により発生させた肝臓転移巣におけるアクチビン発現細胞を、レーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いた RT-PCR により特定する。

(2) アクチビンによる分化・細胞死誘導に対する耐性獲得と遺伝子変異の解析

各遺伝子型のオルガノイド培養をアクチビン刺激し、細胞生存および増殖の抑制作用について、オルガノイドの形成効率により解析する。さらに、特定の遺伝子変異とアクチビン耐性機構の相関が認められた場合、阻害薬等による耐性獲得に関する検証実験を行い、TGF- β ファミリーサイトカインによる分化・細胞死誘導に対する耐性獲得に関するドライバー変異を特定する。

(3) アクチビンによる EMT 誘導における遺伝子変異の解析

各遺伝子型オルガノイドの中で、アクチビンによる分化・細胞死誘導に耐性を獲得した遺伝子型のオルガノイドに対して、アクチビン刺激によるコラーゲンゲル中での EMT 様構造変化について解析する。アクチビンに対する作用を検証するため、アクチビン受容体遺伝子をゲノム編集で欠損したオルガノイドを作製し、同様の実験を実施する。以上の実験により TGF- β ファミリーサイトカインによる EMT 誘導に関するドライバー変異を特定する。

4. 研究成果

(1) アクチビン発現と大腸がん予後の相関解析

データベース解析の結果、大腸がん組織でアクチビン発現の高い集団と低い集団に分けて生存率を解析した結果、高発現集団の生存率が、低発現集団に比べて低下していた。また、AKTP 細胞をマウス脾臓に移植すると肝臓転移巣が形成される。この転移巣の未固定凍結切片を作製し、LMD により腫瘍細胞と間質細胞を分けて採取し、アクチビン発現を RT-PCR で解析した結果、間質細胞で有意に高い発現を確認した。以上の結果から、転移巣では間質が産生するアクチビンががん細胞を刺激しており、その発現量が高いと予後が悪いことからアクチビンは悪性化進展に作用する可能性が考えられた。

(2) アクチビンによる分化・細胞死誘導に対する耐性獲得と遺伝子変異の解析

A、AK、AKP、AKT、AKTP、AKTPF の各遺伝子型オルガノイドをアクチビン刺激すると、A のオルガノイドで形成効率が顕著に低下した。また、他の遺伝子型オルガノイドの形成効率はアクチビン非刺激群と同様であった。AK を含むアクチビン耐性オルガノイドは、すべて Kras 変異が導入されていることから、Kras 変異が分化・細胞死誘導に対する耐性獲得に作用したと考えられた。

この結果を検証するため、Kras の下流で活性化する MEK の阻害薬、trametinib 存在下で同様の培養実験を実施した結果、MEK 阻害下では Kras 変異を有する腫瘍細胞でもアクチビン刺激によりオルガノイド形成効率が低下した。以上の結果から、Kras の活性化変異がアクチビンによる細胞分化と細胞死の誘導作用に対して耐性獲得に作用すると考えられた。

(3) アクチビンによる EMT 誘導における遺伝子変異の解析

AK、AKP、AKT、AKTP、AKTPF の各遺伝子型オルガノイド培養をアクチビン刺激して培養した結果、AKTPF で顕著なオルガノイドの形態変化を認めた。E-cadherin 抗体を用いた免疫染色の結果、アクチビン刺激により、オルガノイドから周囲に向かって管腔構造を失った腫瘍細胞のクラスターが突起状の構造を形成しながらコラーゲンゲル中を浸潤する像が認められた。一方で、E-cadherin の発現は認められたため、いわゆる EMT ではなく EMT 様構造と定義した。アクチビン刺激による EMT 様構造変化は、AKP、AKTP 細胞でも認められたため、p53 変異がアクチビン存在下での EMT 誘導に重要なドライバー変異と考えられた。さらに、CRISPR/Cas9 システムにより AKTPF 細胞でアクチビン受容体遺伝子を欠損させると、アクチビンによる EMT 様構造変化は顕著に抑制され、アクチビンシグナルが EMT を誘導したことを検証した。

ヒト大腸がんでは認められる p53 変異の多くは GOF 型であり、本研究で用いたオルガノイドの *Trp53* 変異もヒトがん細胞で高頻度に認められる GOF 変異型である。したがって、GOF 型の変異 p53 が EMT 様構造変化誘導に重要と考えられた。

以上の研究成果から、がん細胞は、Kras 活性化型変異の導入により TGF- β ファミリーサイトカインが誘導する細胞分化と細胞死誘導に対する耐性を獲得し、さらに p53 の GOF 変異が導入されると、TGF- β ファミリーサイトカインによる EMT 様構造変化が誘導されることが明らかとなった。それぞれのドライバー遺伝子変異によるスイッチ制御の分子機構の解明が、今後の重要な研究課題として考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong ZWE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, and Oshima M.	4. 巻 156
2. 論文標題 Interleukin 1 upregulates microRNA-135b to promote inflammation-associated gastric carcinogenesis in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1140-1155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2018.11.059.	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 該当する
1. 著者名 Echizen K, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, and Oshima M.	4. 巻 38
2. 論文標題 NF- κ B activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4250-4263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0702-0.	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 Takeda H, Kataoka S, Nakayama M, Ali MAE, Oshima H, Yamamoto D, Park JW, Takegami Y, An T, Jenkins NA, Copeland NG, and 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 Proc Natl Acad Sci USA	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 該当する
1. 著者名 Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, Voon DC, Kimura T, and Oshima M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1873-1886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201801176R.	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 Nakayama M, and Oshima M.	4. 巻 11
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 267-276
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 Nakayama M, Hong CP, Oshima H, Sakai E, Kim SJ, and Oshima M.	4. 巻 11
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 2333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16245-1.	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 該当する

1. 著者名 Kok SY, Oshima H, Takahashi K, Nakayama M, Murakami K, Ueda HR, Miyazono K, and Oshima M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Malignant subclone drives metastasis of genetically and phenotypically heterogenous cell clusters through fibrotic niche generation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21160-0.	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11件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Nakayama M, Sakai E, Oshima H, Tan P, Oshima M.
2. 発表標題 p53-loss of heterozygosity with p53 gain-of-function mutation leads to cancer dormancy of intestinal tumors.
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 Sau Yee Kok, Oshima H, Sakai E, Nakayama M, Oshima M.
2. 発表標題 Mechanism for intestinal tumor metastasis by polyclonal origins.
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 Oshima H, Maeda Y, Tsuji T, Oshima M.
2. 発表標題 Regulation of Foxo3a localization in gastric cancer 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 Oshima M.
2. 発表標題 Biological mechanism of polyclonal metastasis of colorectal cancer.
3. 学会等名 50th Commemorative International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oshima M.
2. 発表標題 Multistep tumorigenesis and polyclonal metastasis of colon cancer.
3. 学会等名 24th Annual Meeting of the Korean Society of Cancer Prevention (KSCP) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大島正伸
2. 発表標題 炎症とがん転移
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oshima M.
2. 発表標題 How genetic alterations promote malignant progression of colon cancer?
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama M, Hong CP, Oshima H, Sakai E, Kim SJ, Oshima M.
2. 発表標題 Loss of wild-type p53 promotes colon cancer metastasis that express gain-of-function mutant p53.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oshima H, Kok SY, Takahashi K, Nakayama M, Miyazono K, Oshima M.
2. 発表標題 Polyclonal metastasis of colon cancer subclones through fibrotic niche generation.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oshima M.
2. 発表標題 Gain-of-function mutation of p53 for malignant progression of cancer.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oshima M.
2. 発表標題 Polyclonal metastasis of intestinal cancer.
3. 学会等名 The 4th NanoLSI Symposium / International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 大島 正伸、編者：清宮 啓之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 344（94-104頁担当）
3. 書名 進化するがん創薬	

1. 著者名 先端モデル動物支援プラットフォーム（AdAMS）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320（114頁担当）
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学がん進展制御研究所主要遺伝学研究分野 HP
http://genetics.w3.kanazawa-u.ac.jp

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
研究協力者	大島 浩子 (Oshima Hiroko) (80362515)	金沢大学・がん進展制御研究所・准教授 (13301)	
研究協力者	中山 瑞穂 (Nakayama Mizuho) (20398225)	金沢大学・がん進展制御研究所・准教授 (13301)	

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