

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03522

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた順遺伝学的手法による新規大腸がん治療標的の同定と機能検証

研究課題名(英文) Identification and functional validation of novel therapeutic targets for colorectal cancer using forward genetic approaches in mice

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) 9,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん治療標的の探索を進めるために、SBトランスポゾンを用いた生体内スクリーニングと、合成致死性を利用したCRISPRスクリーニングを行った。SBスクリーニングについては、炎症微小環境で形成される大腸がん形成に関与すると考えられる候補遺伝子を複数同定し、そのうちの2つについてオルガノイドを用いた機能検証を行った。CRISPRスクリーニングについては、効率よく標的遺伝子を同定するために実験方法を一部変更した。そのため、より良いCRISPRスクリーニング系を確立することができ、ゲノムの回収までを終えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の大腸がん死亡者数は、がんの死因数の中で第2位を占める。悪性度が高い大腸がんへの有効な治療薬はほとんど無く、新規治療標的遺伝子の同定が必要となっている。慢性炎症は大腸がん悪性化に促進的に働くため、本研究のSBスクリーニングで同定した炎症関連がん候補遺伝子は、悪性度の高い大腸がんの新規治療標的となる可能性がある。また、これら候補遺伝子の機能解析を行うことで、悪性化機構解明につながる可能性がある。本研究で確立したCRISPRスクリーニングから同定される候補遺伝子は、大腸がんを観察される高頻度な遺伝子異常を標的とできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To explore therapeutic targets for colorectal cancer, we performed in vivo screening using SB transposons and CRISPR screening based on synthetic lethality. For the SB screen, we identified several candidate genes that could be involved in inflammation-associated colorectal cancer development, and functionally verified two of them. For CRISPR screening, we partially modified the experimental method in order to efficiently identify target genes. We finished preparing cell lines, introducing the CRISPR library and collecting genome.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：生体内スクリーニング 大腸がん マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界の大腸がん死亡者数は、がんの死因数の中で第2位を占める。悪性度が高い大腸がんへの有効な治療薬はほとんど無く、新規治療標的遺伝子の同定が必要となっている。大腸がんにおいて、炎症や線維化を伴うケースは全体の1/4を占め、生存率の低さと相関することから(Guinney *et al.*, *Nat Med*, 1350-, 2015)、炎症反応が大腸がんの悪性化に大きく影響していることが示唆されている。消化管の炎症には、TNF α などのサイトカインが関与し、細胞増殖刺激を与えることが報告されている。しかしながら、炎症反応がどのような影響を腫瘍細胞に与えているのかについては、適切なモデル系が少ないために解析が進んでおらず不明な点が多い。この点を明らかにできれば、大腸がん悪性化機構解明につながり、悪性度の高い大腸がんの新規治療標的の同定へと結びつく。

APC 遺伝子は Wnt 経路の負の制御因子であり、消化管上皮幹細胞の維持に重要な役割を果たしている。APC の機能欠損型変異は大腸がんの80%以上で観察されることから、大腸がん形成・進展において重要な役割を果たす遺伝子変異であることが示される。これまでに、数種の Wnt 経路阻害剤が報告されているが、正常細胞への副作用も大きく臨床応用されていない。大腸がん形成にはがん抑制遺伝子の変異が関与している場合がほとんどであり、キナーゼ阻害剤のようながん遺伝子の機能阻害という方法をとることが難しい。がん抑制遺伝子機能欠損がドライバーとなって引き起こされるがんの場合、標的探索に合成致死の概念を用いた手法が用いられる。そこで本研究では、APC 遺伝子が欠損したがん細胞に網羅的 CRISPR-Cas9 ライブラリを導入し、APC 欠損細胞の維持に必要な不可欠な遺伝子を網羅的に同定し、治療標的の同定に結びつける。

2. 研究の目的

本研究では、次の2つの観点から大腸がん治療標的探索を進める。

(1) 炎症を伴う大腸がんは予後の悪さと相関がある。炎症関連大腸がん形成に関与する遺伝子を、トランスポゾン挿入変異誘発法を用いた網羅的探索により明らかにし、候補遺伝子の機能検証を行うことで大腸がんの新規治療標的を同定する。

(2) 大腸がんの8割が APC 機能欠損変異を保持することに着目し、APC 機能欠損細胞において合成致死となる遺伝子を、CRISPR-Cas9 にて網羅的に探索し、大腸がんの新規治療標的となりうる遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) これまでの研究において申請者は、Sleeping Beauty (SB) と呼ばれるトランスポゾンを用いた挿入変異誘発法を利用し、マウス生体内でがん形成に関与する遺伝子の網羅的同定を行ってきた(Takeda *et al.*, *Nat Genet.* 47, 2015; Takeda *et al.*, *PNAS.* 113 2016)。この手法は、変異原性を持つトランスポゾンをマウス体細胞中で活性化させて挿入変異を引き起こし、がん形成を誘発させる順遺伝学的手法である。SB トランスポゾンは継続的に活性化されているため、新たな挿入変異が誘発され続け、その結果遺伝学的に不均一な細胞集団を作成することができる。これらの細胞集団を生体内で競合させ腫瘍形成を誘導できることから、実際のがんの遺伝学的特性をよくモデルした実験系であるということが出来る。がん関連候補遺伝子を同定するには、形成された腫瘍ゲノム中のトランスポゾン挿入部位を決定し、高頻度挿入部位近傍に位置する遺伝子を同定する。本研究ではこの手法を、「大腸炎モデルマウス」に適用し、炎症関連腫瘍形成を再現する。大腸に慢性炎症を起こすためには、デキストラン硫酸塩(DSS)を飲水投与する。

スクリーニングを行うマウスを作成するために、トランスポゾンを保持するトランスジェニックマウス(Onc2)と、トランスポゾン転移酵素の cDNA が Rosa26 領域に条件付きにロックインされたマウス(SB11)、消化管上皮細胞特異的に Cre 組み換え酵素を発現するマウス(Villin-CreER^{T2})を交配させ、複合変異マウスを作成する。腫瘍形成効率をあげるために、人の大腸がんで高頻度に変異のある Kras 活性化型点変異や、機能欠損型 TGF- β 受容体を発現するマウスも用いる。この複合変異マウスに DSS を飲水から投与し、炎症を誘発させる。DSS 非投与群も準備する。マウスの生存率や消化管の腫瘍数を、DSS の有無で差があるかを比較する。腫瘍組織を2等分し、ゲノム解析用、病理組織用とする。腫瘍からゲノムを抽出し、ゲノム解析を行うことで候補遺伝子を同定する。候補遺伝子の中から、ヒト大腸がんで変異が認められ、がん抑制的に機能すると予測されるものに対して特に着目し、オルガノイドを用いた機能検証を行う。具体的には、腫瘍由来オルガノイドに Cas9 を導入し恒常的に Cas9 を発現するクローンをすでに樹立済みであるので、このオルガノイドに gRNA を導入することで目的遺伝子をノックアウトしてマウスに移植し、腫瘍形成を評価することで、がん抑制候補遺伝子の生体内でのがん機能検証を行う。

(2) APC に変異のある大腸がん細胞株を用いる。CRISPR-Cas9 を用いた機能損失スクリーニングには、Cas9 高発現株を用いると効率が良いので、Cas9 をレンチウイルスにて導入し高発現

株を樹立する。この細胞に、ヒトの全遺伝子を標的としたゲノムワイド gRNA ライブラリをレンチウイルスにて導入する。gRNA ベクターに薬剤耐性遺伝子が組み込まれているので、薬剤セクションを行い、その後免疫不全マウスの皮下に移植して腫瘍を形成させる。移植前の細胞と腫瘍組織それぞれよりゲノムを抽出し、gRNA の頻度解析を行う。具体的には、gRNA 配列を組み込んであるベクター領域近傍を PCR 増幅し、PCR 産物を次世代シーケンサーで解読することで、それぞれの gRNA 配列のリードカウントを計測する。gRNA が腫瘍組織に残存する場合は、その gRNA が標的とする遺伝子の機能損失が腫瘍形成に寄与している可能性が高い。一方、gRNA が腫瘍組織から消失する場合には、その gRNA が標的とする遺伝子の機能損失が細胞の生存を阻害している可能性が高いと考えられるので、腫瘍組織中から消失した gRNA が標的とした遺伝子を候補遺伝子として同定する。

4. 研究成果

(1) SB スクリーニングを行うために、複合変異マウス(SB11/+;Onc2/+;Villin-CreERT2/+)を作成した。腫瘍形成効率を上げるために、ヒト大腸がんを高頻度に観察される Kras の活性化型点変異(KrasG12D)や、TGF- β 2型受容体 (Tgfr2) 欠損変異等も導入した。これら複合変異マウスである K-SB マウス(SB11/+;Onc2/+;KrasG12D/+;Villin-CreERT2/+)や、KT-SB マウス(SB11/+;Onc2/+;KrasG12D/+;Tgfr2flox/+;Villin-CreERT2/+)を用いて、2.5% DSS を 5 日間投与し、これを 2 週間おきに 3 回繰り返すことで慢性炎症を持続させ炎症関連がんを作成した。まず炎症がマウス大腸で誘発されているかについて、病理標本を作成し検討した。DSS 投与後 3 日目の大腸粘膜は、腺管構造が消失し、上皮が剥離している様子が観察された。投与後 7 日目では、潰瘍が観察され、投与後 2 週間では再生上皮が粘膜を覆っている様子が観察された。これらのことから、DSS 誘導性大腸炎が引き起こされていると結論づけた。この条件を用い、K-SB マウスや KT-SB マウスに大腸炎を誘導したところ、30 週齢を超えたマウスに脱肛、貧血等の症状が見られた。大腸を解剖すると、大腸腫瘍を形成していた。これまでに 30 個ほどの腫瘍を採取しゲノムサンプルと病理組織サンプルを得たが、腫瘍の半数程度が悪性度の高い腫瘍であり、中には浸潤・転移を示した腫瘍も頻度は少ないが観察された。マウスの寿命は DSS 誘導性大腸炎を引き起こすと短くなる傾向があり、また、直径 5 mm 以上の大きな腫瘍の形成頻度が高くなる傾向があった。

次に、DSS 投与マウスに形成された腫瘍(DSS 腫瘍)と DSS 非投与マウスに形成された腫瘍(対照腫瘍)からゲノムを抽出し、候補遺伝子を同定した。実験系が適切に動いているかをまず見るために、小規模実験を行なった。最も高頻度に変異が見られた遺伝子は、DSS 腫瘍、対照腫瘍共に *Apc* であり、8 割近くの腫瘍で変異が観察された。このことから実験系は適切に機能していることが示された。さらに規模を広げてゲノム解析を進め、DSS 腫瘍で高頻度に変異の認められる遺伝子を探索したところ、p53 経路に關与する遺伝子など複数の遺伝子が炎症関連がん遺伝子として同定された。次に、これらがなぜ DSS 腫瘍特異的に高頻度に変異が認められるかの分子機序解明を行った。

マウス大腸上皮細胞に炎症性サイトカインを添加し培養を続けると、形態の変化が観察された。この状態のオルガノイドを用いて RNA-seq を行ったところ、複数の大腸上皮幹細胞マーカーの発現上昇等が観察されるなど、細胞状態の変化が観察された。これは、ChIP-seq や 1 細胞発現解析からも確認され、炎症性サイトカイン添加により大腸上皮細胞の可塑性が誘導されることが明らかにされた。この細胞状態の変化が、がん化において異なる遺伝子変異を選択する原因となっていることが考えられた。今後、大腸上皮可塑性とがん悪性化の観点から解析を深める予定としている。

同定された候補遺伝子を、ヒト大腸がん変異遺伝子データベースと比較し、ヒトとマウスで共通して変異の認められる遺伝子を抽出した。その中でも、がん抑制遺伝子として機能すると予想されるが、大腸がん形成において機能未知なもの 2 つを選び検証実験を行った。まず、これら遺伝子を標的とする gRNA のベクターを作成し、レンチウイルスにて Cas9 を発現するマウス大腸腫瘍由来オルガノイドに導入した。目的通りノックアウトされているかをシーケンスにより確認し、その後免疫不全マウスの皮下に移植した。ノックアウトしない場合は、皮下腫瘍は形成されないが、ノックアウトした場合腫瘍形成が誘導されたことより、これら遺伝子はがん抑制遺伝子として機能することを実験的に検証した。これらは、大腸がんの新規治療標的となる可能性がある。

(2) 当初は APC 変異大腸がん細胞株を用いてスクリーニングを行う予定としていたが、がん抑制遺伝子異常がんにおける合成致死標的を探索するための実験系は、同一の遺伝学的背景におけるノックアウト細胞株と野生型細胞株を準備し、両方で CRISPR によるノックアウトスクリーニングを行い、消失する gRNA を比較する方法が最適のようであった。そこで、実験方法を一部変更し、細胞株樹立をまず行うことにした。大腸がん細胞株を用いて APC の発現状態を調べ、野生型 APC が発現している細胞を抽出し、ノックアウト細胞を共同研究により樹立した。一方で、網羅的 CRISPR ライブラリのレンチウイルスを作成し、細胞への感染条件を確定させた。この条件を用い、APC 野生型細胞とノックアウト細胞の両方に対して CRISPR ライブラリを導入し、ゲノムを回収した。gRNA セクションの方法も、当初の計画はマウス皮下に移植し

腫瘍形成を誘導した後に回収する予定としていたが、APC 欠損細胞で生存に必須の遺伝子を見つけることが目的であるので、細胞培養でのセレクションに変更した。現在は、シーケンス解析を行うライブラリを作成している。本項目は、実験方法を一部変更したため、当初の計画よりも遅れているが、より最適化された方法を用いているため、バックグラウンドを抑え確実に候補遺伝子が同定できる方法となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daisuke Yamamoto, Hiroko Oshima, Dong Wang, Haruna Takeda, Kenji Kita, Xuelian Lei, Mizuho Nakayama, Kazuhiro Murakami, Takashi Ohama, Hirofumi Takemura, Mutsumi Toyota, Hiromu Suzuki, Noriyuki Inaki and Masanobu Oshima	4. 巻 257
2. 論文標題 Characterization of RNF43 frameshift mutations that drive Wnt ligand- and R-spondin-dependent colon cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 39-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5868	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 Haruna Takeda	4. 巻 12
2. 論文標題 A Platform for Validating Colorectal Cancer Driver Genes Using Mouse Organoids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in genetics	6. 最初と最後の頁 698771-698777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.698771.	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 Murakami Kazuhiro, Terakado Yumi, Saito Kikue, Jomen Yoshie, Takeda Haruna, Oshima Masanobu, Barker Nick	4. 巻 118
2. 論文標題 A genome-scale CRISPR screen reveals factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2016806118	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, Jenkins Nancy A., Copeland Neal G.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of cancer driver genes using Sleeping Beauty transposon mutagenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) 10.1111/cas.14901	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

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転移モデルの樹立
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村 奏、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炎関連がん遺伝子の同定
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruna Takeda
2. 発表標題 Identification of colorectal cancer driver genes by Sleeping Beauty mutagenesis
3. 学会等名 The 39th Sapporo International Cancer Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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			
米国	MD Anderson cancer center			