

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07440

研究課題名（和文）大腸がん自然転移モデルを利用した転移関連遺伝子の探索

研究課題名（英文）Identification of metastasis-related genes using a spontaneous colorectal cancer metastasis model.

研究代表者

藤下 晃章 (Fujishita, Teruaki)

愛知県がんセンター（研究所）・がん病態生理学分野・主任研究員

研究者番号：50511870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がんによる死亡の大半は他臓器への転移によることから新機軸の予防・治療法の開発が待たれている。本研究では、大腸がんを自然発症し約20%の低頻度だが肝臓に自然転移する遺伝子改変マウスと、このマウスにPiggyBacトランスポゾンを導入した肝転移の頻度が約2倍に上昇するマウスモデルの開発に成功した。これらのマウスモデルの解析により転移に関与する遺伝子やシグナル伝達経路の同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は大腸がんの発症から浸潤・転移といった大腸がんの悪性化に必要な遺伝子を、大腸がんを自然発症し遠隔臓器へ転移するモデルを開発することで、生体レベルで明らかにした。さらに遺伝子変異外にも転移で活性化するシグナル経路について同定できたことから、本研究成果はこれまで困難とれてきた転移能を獲得した大腸がんに対して新たな治療方法の開発に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Since the majority of deaths from colorectal cancer are caused by metastasis to other organs, the development of novel prevention and treatment is required. In this study, we succeeded in developing a genetically engineered mouse model in which colorectal cancer develops and metastasizes spontaneously to the liver at a low frequency of approximately 20%, and a mouse model in which the frequency of liver metastasis increases approximately twofold by introducing PiggyBac transposon into this mouse model. By analyzing these mouse models, metastasis related genes and signaling pathways were identified.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 浸潤・転移 マウスモデル

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において大腸がんは罹患数が最も多いがん種であり、死亡数も第二位である。早期発見や外科的切除技術の発達により遠隔転移のない大腸がんの予後は比較的良好である。一方、転移能を獲得した大腸がんは治療困難となる症例が多く、大腸がんによる死因の約9割が浸潤・転移によるものであることから、新機軸の治療薬開発が求められている。

臨床検体を用いた網羅的なゲノム変異解析や遺伝子発現解析などが精力的に行われ、大腸がんのおよそ90%はWnt経路活性化やp53の変異など僅か数個の遺伝子変異だけで転移能を獲得していることが示唆された(引用文献)。このことは大腸がんは、変異に基づいた治療標的となる分子やシグナル経路が限られていることを示唆している。

これまでに大腸がん転移研究が基礎・臨床を合わせ様々なレベルで行われ、治療標的となる転移ドライバーの候補遺伝子・シグナル経路が多数報告されてきたが、転移性大腸がんの画期的な治療薬の開発にはつながっていない。これらの研究の殆どは大腸がん細胞株を用いた移植実験によるもので、がんの発生から浸潤までの過程や免疫応答の関与を排除したモデルであることから、実際の大腸がんをどこまで反映しているのかは不明である。

一方、遺伝子改変により、自然に大腸がんを発生し転移するモデルマウスが殆ど存在しないため、生体レベルで大腸がんの発生から浸潤・転移という一連のプロセスを解析し、治療標的を探索することは依然として困難であった。

### 2. 研究の目的

大腸がんを自然に発症し遠隔臓器へ転移するマウスモデルを作成するため、ヒト大腸がんを高頻度に変異が認められる *Ctnnb1* 活性化変異(=Wnt経路活性化変異)、*Kras* 活性化変異、*Trp53* 不活性化変異および *Smad4* 不活性化変異を併せ持つマウス(CKPSマウス)を作成した。このマウスは腸に浸潤性の腺がんを発症し、およそ20%の個体で肝臓への転移が認められた。このマウスモデルを用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析や質量分析装置によるプロテオーム解析により、生体レベルでの大腸がんの転移関連分子の同定を試みているが、現在の解析手法では組織を構成する細胞集団の比率に影響を受け、さらに発現量の多い分子が優先的に検出されるため、発現量が少なくても転移に必要な分子が検出されない可能性も懸念されている。またこのマウスモデルの肝転移の頻度は20%程度であることから、転移には4つの遺伝子変異以外に更なる要因が必要であることが示唆された。

本研究課題では、CKPSマウスの解析に加え、トランスポゾンを利用した機能的スクリーニングを実施することで個体レベルでの転移促進または抑制する遺伝子の探索を行い、大腸がんの転移メカニズムの解明と、転移性大腸がんの新たな治療標的の同定を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1)大腸がん自然転移マウスモデルの作成

CKPSマウスは *Ctnnb1*<sup>fl<sub>ox</sub>(ex3)</sup>(*Ctnnb1* 活性化変異)、*Kras*<sup>LSL-G12D</sup>(*Kras* 活性化変異)、*Trp53*<sup>fl<sub>ox</sub>/fl<sub>ox</sub></sup>(p53 不活性化変異)、*Smad4*<sup>fl<sub>ox</sub>/fl<sub>ox</sub></sup>(*Smad4* 不活性化変異)及び Villin-Cre<sup>ERT2</sup>(腸管上皮特異的に Cre-ERT2 を発現する)マウスをそれぞれ交配し、作成した。同時に CKP、CKS 及び CPS マウスも作成し、転移について評価した。

#### (2)PiggyBac トランスポゾンマウスの作成

CKPSマウスに ATP1-S2(PiggyBac トランスポゾン)マウス、さらに TSPB (PiggyBac トランスポゼース)マウスを交配することにより、大腸がんマウスのゲノムに PiggyBac トランスポゾンを導入した(CKPSATマウス)。PiggyBac トランスポゾンには挿入された遺伝子の部位や方向により、近傍の遺伝子の発現を上昇(CAGプロモーター)または抑制させる配列(polyA)が含まれている(図1、引用文献)。このCKPSATマウスの腫瘍形成数及び転移について評価した。

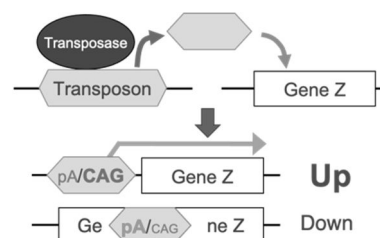


図1.PiggyBac トランスポゾンシステムの概略図

#### (3)トランスポゾン挿入部位の同定

CKPSATマウスの腸管原発巣、肝転移巣及び正常部組織におけるトランスポゾン挿入部位について、splinkerette PCRを応用した semiquantitative transposon insertion site sequencing (QiSeq)プロトコール(引用文献)を参考に、次世代シーケンサーを用いてトランスポゾン共通挿入部位 CISs (Common Integration Sites)を同定する。

#### (4)候補遺伝子の検証

同定された遺伝子について、The Cancer Genome Atlas(TCGA)などの大腸がん(COADやREAD)データベースをもとに臨床での発現と予後との相関を踏まえた上で、候補遺伝子の絞り込みを行

う。CKPS マウスから樹立した大腸がん細胞(CKPS 細胞)に siRNA による候補遺伝子のノックダウンを行い、細部増殖に対する影響を評価する。転移形成能を評価するため候補遺伝子の CRISPR-Cas9 によるノックアウトまたは発現ベクターによる過剰発現を行い、作成した細胞をマウス脾臓へ移植し、肝臓への転移巣形成数を評価する。

#### 4. 研究成果

(1)CKP 及び CKPS マウスは転移性大腸がんを発症する。

CKPS 及び CKP、CKS、CPS マウスを作成し大腸がんの発症及び転移の頻度を検証した。CKP 以外のマウスは浸潤性の腺がんを 100%の個体で発症した(図 2A-D)。CKPS マウスはおよそ 20%の個体で肝臓への転移が認められたが、CKS や CPS では転移は認められなかった(図 2A)。一方、CKP は浸潤性の腺がんを発症する個体は 30 %程度であったが、3%と低い頻度であるが肝臓へ転移する個体が観察された(図 2A)。これらの結果から、大腸がんの転移には Ctnnb1 や Apc など WNT 経路の活性化変異、Kras の活性化変異及び p53 の不活性が少なくとも必要であることが示された。またこの CKPS マウスの転移メカニズムについてはがん幹細胞が関与することを報告した(引用文献)

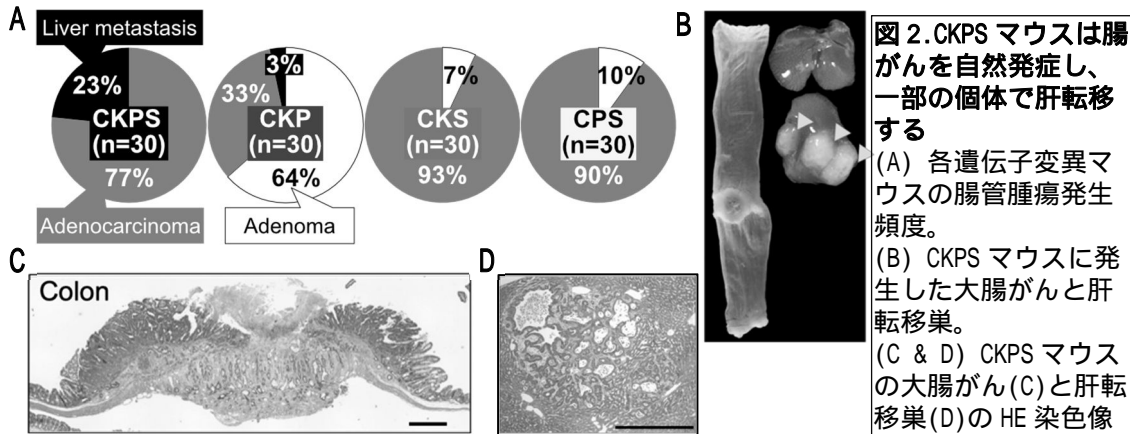


図 2. CKPS マウスは腸がんを自然発症し、一部の個体で肝転移する (A) 各遺伝子変異マウスの腸管腫瘍発生頻度。 (B) CKPS マウスに発生した大腸がんと肝転移巣。 (C & D) CKPS マウスの大腸がん(C)と肝転移巣(D)の HE 染色像

(2) PiggyBac トランスポゾンマウスは肝転移の頻度が上昇した。

CKPSAT マウスは CKPS マウスと同様 100%の個体で浸潤性の腺がんを発症した。CKPS マウスと比較してこの CKPSAT マウスの腫瘍発生数も増加傾向が認められ(図 3) 生存期間も短縮しているが(生存期間中央値 CKPS: 148 日, CKPSAT: 114 日) 肝転移の頻度はおよそ 46%へ上昇した(14/30 匹)。これらの結果からトランスポゾンが肝転移を促進させる遺伝子に影響している可能性が示唆された。

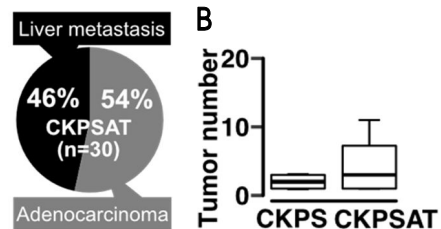


図 3. CKPSAT マウスは肝転移の頻度が上昇した (A)腸管腫瘍発生頻度 (B) CKPSAT 及び CKPS マウスの腫瘍発生数

(3) トランスポゾン挿入部位の同定

4 匹の CKPSAT マウスの腸腫瘍原発巣及び肝転移巣とそれぞれの正常組織を採取し、トランスポゾン挿入部位を QiSeq プロトコールにより同定した。1 匹の CKPSAT マウスについてはトランスポゾンの移動は認められなかったが、残りのマウスではトランスポゾンが移動した近傍の遺伝子が多数同定された(表 1)。3 匹のマウスの採取した肝転移巣において、高頻度に同定された 4 つの遺伝子について検証を行った。

マウス	組織	挿入部位	リード数
1	正常腸組織	15	524, 526
	原発巣	75	756, 650
	肝転移巣	102	612, 904
2	正常腸組織	4	1, 061, 846
	原発巣	6	1, 036, 752
	肝転移巣	4	1, 058, 251
3	正常腸組織	29	258, 829
	原発巣	882	684, 167
	肝転移巣	845	758, 770
4	正常腸組織	44	206, 556
	原発巣	452	504, 721
	肝転移巣	608	506, 482

(4) 候補遺伝子の検証

遺伝子 A のノックアウトは大腸がんの転移を抑制する。

受容体型チロシンキナーゼである遺伝子 A に対してトランスポゾンが発現を上昇させる部位に挿入されている。この遺伝子 A の発現が高い大腸がん細胞は高い転移能を有することが既に報告されている。この遺伝子 A について CRISPR-Cas9 によるノックアウト (KO) 細胞を樹立し、移植モデルにおける肝転移巣形成能を評価した。 $1 \times 10^4$  の細胞をそれぞれ移植したところ、遺

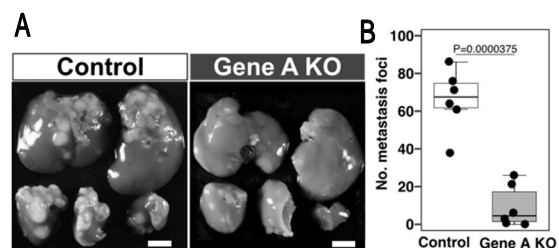


図 4. 遺伝子 A は肝転移を制御する 遺伝子 A-KO 細胞及びコントロール細胞の肝転移実体写真(A)と 転移巣形成数(B)

伝子 A をノックアウトした CKPS 細胞の肝転移巣の数は対照群と比較して、有意に低下した(図 4)。これらの結果は遺伝子 A が転移に関わることが確認されたこと、そしてこのスクリーニングが機能していることを示している。

遺伝子 B は大腸がん細胞の増殖を制御する。

残る 3 つの遺伝子 B(トランスポゾン：発現上昇)、C(発現抑制)、D(発現抑制)については転移との関係を示す報告がこれまでに殆どなかったことから、siRNA によるノックダウンを実施し、大腸がん細胞の増殖に対する影響を評価した。siRNA により B 及び B のホモログ(BH)をノックダウンしたところそれぞれ増殖抑制が認められ、同時にノックダウンしたところ更なる抑制効果が認められた(図 5)。一方、遺伝子 C 及び D をノックダウンしたところ、増殖に対する影響は確認できなかった。

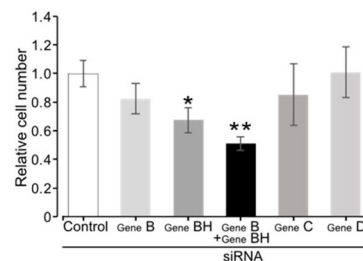


図 5. 遺伝子 B のノックダウンは細胞増殖を抑制する

遺伝子 B は大腸がん転移を制御する。

翻訳制御分子である遺伝子 B に対して CRISPR-Cas9 によるノックアウトもしくは shRNA によるノックダウンを試みたが、増殖を強く抑制することから、どちらの細胞も作成することはできなかった。そのため遺伝子 B を過剰発現させた CKPS 細胞を作成し、肝転移が促進する可能性を検証した。1x10<sup>3</sup> の細胞をそれぞれ移植したところ、過剰発現細胞で転移巣形成数が増加した。これらの結果から遺伝子 B は大腸がんの増殖・生存や転移を調節していることが示された。

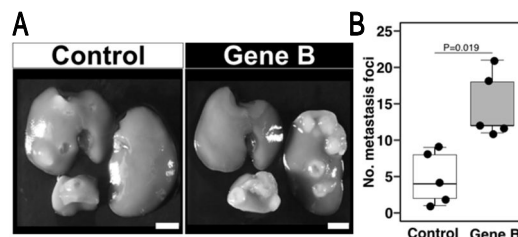


図 6. 遺伝子 B は肝転移を制御する  
遺伝子 B 過剰発現細胞及びコントロール細胞の肝転移実体写真(A)と 転移巣形成数(B)

#### < 引用文献 >

Yaeger R, et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell*, 2018, 33(1):125-136.

Rad R, et al. PiggyBac transposon mutagenesis: a tool for cancer gene discovery in mice. *Science*, 2010, 330(6007):1104-1107.

Friedrich MJ, et al. Genome-wide transposon screening and quantitative insertion site sequencing for cancer gene discovery in mice. *Nat Protoc.* 2017, 12(2):289-309.

Fujishita T, et al. The cAMP/PKA/CREB and TGF /SMAD4 Pathways Regulate Stemness and Metastatic Potential in Colorectal Cancer Cells. *Cancer Res.* 2022, 82(22):4179-4190.

## 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 1件）

1. 著者名 Tanigawa Seisuke, Fujita Mitsugu, Moyama Chiami, Ando Shota, Ii Hiromi, Kojima Yasushi, Fujishita Teruaki, Aoki Masahiro, Takeuchi Hayato, Yamanaka Takumi, Takahashi Yoshinobu, Hashimoto Naoya, Nakata Susumu	4. 巻 28
2. 論文標題 Inhibition of Gli2 suppresses tumorigenicity in glioblastoma stem cells derived from a de novo murine brain cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 1339 ~ 1352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-020-00282-5	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 Rie Kajino-Sakamoto, Teruaki Fujishita, Makoto Mark Taketo, Masahiro Aoki	4. 巻 40
2. 論文標題 Synthetic lethality between MyD88 loss and mutations in Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in intestinal tumor epithelial cells	5. 発行年 2021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 -

1. 著者名 Hisanori Isomura, Ayumu Taguchi, Taisuke Kajino, Naoya Asai, Masahiro Nakatochi, Seiichi Kato, Keiko Suzuki, Kiyoshi Yanagisawa, Motoshi Suzuki, Teruaki Fujishita, Tomoya Yamaguchi, Masahide Takahashi, Takashi Takahashi	4. 巻 112
2. 論文標題 Conditional Ror1 knockout reveals crucial involvement in lung adenocarcinoma development and identifies novel HIF-1 regulator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1614-1623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14825	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 Fujishita Teruaki, Kojima Yasushi, Kajino-Sakamoto Rie, Mishiro-Sato Emi, Shimizu Yasuhiro, Hosoda Waki, Yamaguchi Rui, Taketo Makoto Mark, Aoki Masahiro	4. 巻 82
2. 論文標題 The cAMP/PKA/CREB and TGF $\beta$ /SMAD4 Pathways Regulate Stemness and Metastatic Potential in Colorectal Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4179 ~ 4190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-22-1369	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青木正博、武藤誠、藤下晃章
2. 発表標題 ALCAM (CD166)は大腸がん幹細胞の幹細胞性と転移能に寄与する
3. 学会等名 がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木正博、武藤誠、藤下晃章
2. 発表標題 Identification of drivers of cancer stemness using a mouse model of spontaneously metastasizing colorectal cancer
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 藤下晃章
2. 発表標題 転移性大腸がんマウスモデルを用いた転移関連分子の同定
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤下晃章、梶野リエ、三城恵美、武藤誠、青木正博
2. 発表標題 Transposon-based screening of metastasis-related genes in a colorectal cancer mouse model
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木 正博、武藤 誠、藤下 晃章
2. 発表標題 Tumor microenvironment-related pathways critical for stemness and metastatic potential of colorectal cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------