

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07585

研究課題名(和文) p53変異/欠損による大腸がん微小環境ネットワーク形成に関する個体モデル解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of communications in tumor micro-environment constructed by tumor cells carrying gain-of-function p53 mutation and p53 null mutation in colorectal cancer

研究代表者

中山 瑞穂 (Nakayama, Mizuho)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：20398225

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)：p53変異は唯一多くのがんで共通したドライバー遺伝子であり、ミスセンス変異p53には新たながん促進機構が備わっていることが知られる。

本研究は大腸がんドライバー遺伝子の一つでもあるp53変異に着目し、独自に開発したヒト大腸がんドライバー遺伝子変異を持つマウス腸管腫瘍オルガノイドを用いて、個体レベルでp53変異と悪性化の関係性を解析した。肝転移モデルにより原発巣と転移巣におけるp53遺伝子変異を調べた結果、転移巣では多くの腫瘍で野生型p53の消失(LOH)が起きていることを突き止めた。さらに、この変異p53/野生型p53 LOH細胞が獲得している悪性化形質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんの転移に関わる原因遺伝子はわかっていない。本研究は多くのがんでミスセンス変異が入っているp53に着目し、大腸がん転移前後のp53遺伝子とそれに伴う腫瘍細胞の悪性形質を調べた。p53にミスセンス変異が入っただけでは悪性度は低いが、これに野生型p53欠損(LOH)が組み合わさることで、高い転移能力を獲得していることが分かった。ヒトのがんで見つかるp53の多くがミスセンス変異+LOHの組み合わせであることから、このようなp53は転移における責任遺伝子であることが示唆された。この結果はp53変異によるがん悪性化メカニズムの理解を深め、p53を標的とする創薬開発にも貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of driver gene mutations causes colorectal cancer (CRC). However, it still unknown that which gene is responsible for metastasis. Previously, we generated CRC mouse model which carries four driver gene mutations (Apc, Kras, Tgfbr2, p53; AKTP) and established the organoids from mouse tumor.

This project focused p53 which is the most frequently mutated gene in pan-cancer cohort. We found that LOH of wild type-p53 with p53 mutant (R270H) cells (AKTP-LOH/R270H) are enriched in metastasis legions when AKTP+/R270H organoids are injected into mouse spleen. Moreover, p53 LOH is required for the dormant cell survival and clonal expansion abilities. RNA seq. analyses revealed that inflammatory and growth factor/MAPK pathways are activated in AKTPLOH/R270H cells, while the stem cell signature is upregulated in both AKTPNull and AKTPLOH/R270H cells, indicating p53 LOH promotes mutant p53 driven metastasis through a distinct pathway activation.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：変異p53 大腸がん LOH

1. 研究開始当初の背景

大腸がんによる死亡要因の多くは転移や再発など悪性化によるものであり、再発患者の5年生存率は14%ほどと未だ有効な治療方法がない。そのため大腸がんの再発・転移機構の解明は大腸がん克服につながる重要な研究課題である。

近年の大規模なゲノム解析により、大腸がん進行に関与するドライバー遺伝子として、*APC*, *KRAS*, *TGFBR2*, *TP53*, *FBXW7*などが明らかにされた (TCGA, *Nature*, 2012)。一方で、原発巣と転移巣間で遺伝子変異に違いは認められず (Vogelstein et al. *Science*, 2013)、転移・再発機構の詳細な分子機構の解明は未だ十分ではないのが現状であった。

申請者は、多くのヒトのがんに共通してみられる p53 ミスセンス変異に着目した。p53 変異は特に悪性化したがんによく発現がみとめられ、変異型 p53 に備わっているとされる新規機能獲得 (Gain Of Function ; GOF) による悪性化への関与が示唆されているが、大腸がん悪性化について個体レベルでの詳細な解析はほとんどなかった。そこで、申請者らは *Apc* と *p53* の複合遺伝子変異マウス (AP マウス) を作製し、その腸管腫瘍 (原発巣) の表現系解析や腫瘍から独自に樹立した細胞やオルガノイドを使った解析をおこなった。その結果、変異型 p53 依存的に約 350 個の遺伝子が発現誘導され、その中には Wnt シグナルの顕著な活性化や NF κ B などの自然免疫・炎症性シグナルの活性化が誘導されていることを見出した。また変異型 p53 発現オルガノイドは極めて複雑な腺管構造を形成し浸潤能力も獲得していることを発見した。さらに、変異型 p53 の細胞内局在に野生型 p53 欠失 (LOH) が重要であることも示した (Nakayama et al. *Oncogene*, 2017)。

次に申請者らは、4 種類の大腸がんドライバー遺伝子 (*Apc*, *Kras*, *Tgfbr2*, *p53*) 複合変異マウス (AKTP マウス) を作製し、各遺伝子変異の組み合わせとがんの悪性度 (浸潤、転移) の相関関係を個体モデルで明らかにした (Sakai, Nakayama et al. *Cancer Res.*, 2018)。興味深いことに腸管腫瘍から樹立したオルガノイド (AKTP^{+M} オルガノイド) を単一細胞にして subcloning すると、得られたクローン細胞はすべて野生型 p53 が欠失 (LOH) していた (AKTP^{M/LOH})。p53 に変異をもつヒトのがんでは大腸がんを含め、乳がんや子宮がんにおいても 80-90% という高頻度で p53LOH が起きていることが知られる (TCGA, *Nature*, 2012)。これらの結果から大腸がんの転移や再発過程ではミスセンス変異 p53-GOF と野生型 p53 欠失 (LOH) の組み合わせが重要であるとの仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、変異型 p53 の GOF と野生型 p53 の LOH による欠失の組み合わせ (p53GOF/LOH) が、大腸がんの悪性化にどのように寄与しているのかを大腸がん悪性化モデルマウスの腫瘍から樹立した AKTP オルガノイド細胞を用いて、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究1) 変異型 p53-GOF/LOH が誘導するがん悪性化形質獲得について

申請者らが作製した *Apc*, *Kras*, *Tgfbr2*, *p53* の4重変異を持つ AKTP マウスの腸管腫瘍から p53 がヘテロ (+/R270H) のオルガノイド (AKTP^{+/R270H}) を樹立し、さらに Subcloning して得られた AKTP^{LOH/R270H} 細胞と、CRISPR-Cas9 により p53 を欠失した AKTP^{Null} 細胞を作製した。また AKT マウス腫瘍から AKTP^{+/+} オルガノイドも樹立した。以上4種類の p53 genotype (+/+, +/R270H, Null, LOH/R270H) のオルガノイドを用いて悪性化形質やレポーターアッセイによる細胞内シグナル活性 (Wnt, NFκB, Notch など) について調べた。

上記4種類の AKTP 細胞を用いて、マウス脾臓にオルガノイド移植し肝臓への転移能力を検証する転移モデル実験をおこなった。この際、シングルセルレベルでの転移能力を調べるために、細胞数を最小 (300 個) まで減らした条件でおこなった。

研究2) 変異型 p53-GOF/LOH が及ぼす転移巣形成効率と間質の特徴

AKTP^{+/R270H} 細胞によって形成された肝転移巣と移植部位である脾臓に形成される腫瘍 (原発巣) での p53 遺伝子背景を調べるため、Laser Micro Dissection を用いて腫瘍切片から腫瘍細胞のみを採取しゲノムを抽出した。ゲノムは PCR により野生型 p53 と変異型 p53 を同定した。肝転移巣組織は線維化マーカーである αSMA やマッソントリクローム染色をおこなった。

研究3) 変異型 p53-GOF/LOH 特異的に誘導される遺伝子群の特徴について

4種類の異なる p53 genotype-AKTP オルガノイド (AKTP^{+/+}, AKTP^{+/R270H}, AKTP^{Null}, AKTP^{LOH/R270H}) について RNA-seq をおこない IPA による Upstream 解析を行った。

4. 研究成果

研究1) AKTP^{+/+}, AKTP^{+/R270H}, AKTP^{Null}, AKTP^{R270H/LOH} の4種類のオルガノイドについて、トリプシン処理後のシングルセルの条件ではクローン増殖効率は AKTP^{R270H/LOH} (M/LOH 細胞) が有意に高い能力を示した。しかしながら、トリプシン処理せずに細胞接着がある程度維持された状態では、p53 遺伝子型に違いはなかった。また Matrigel やコーゲンゲル中での細胞増殖率も M/LOH 細胞で高かったが、アガロースゲル内では増殖できなかったことから、足場依存的増殖であることが示唆された。またこのことは転移巣における AKTP^{R270H/LOH} 細胞の増殖には細胞外マトリックスの存在が重要であることが考えられた。

また、細胞内シグナルを調べた結果、Wnt pathway が M/LOH 細胞で非常に高かった。もともとすべての細胞は *Apc* Δ716 変異を持つ細胞であるにもかかわらず、M/LOH 細胞のみこのような結果が出たことは、Wnt シグナルの過剰な活性化は p53-GOF/LOH の特性で

あると考えられた。

一方、トリプシン処理によるシングルセルの状態、300 個の細胞で肝転移モデルをおこなったところ、M/LOH 細胞が唯一肝転移することがわかった。この肝転移巣では、増殖マーカーや未分化マーカー (Sox17) の発現もみとめられた。

研究 2) AKTP^{+/R270H} 細胞をマウス脾臓に移植した時の肝転移巣と原発巣 (脾臓の腫瘍) 腫瘍細胞の p53 genotype を比較すると、原発巣ではすべて移植した細胞と同様、ヘテロ (+/R270H) だったのに対し、肝転移巣では約 50% で LOH が起きていた。このことは、AKTP^{+/R270H} 細胞が肝転移巣を形成する過程で野生型 p53 が欠失することが生存に有利であることを示唆する結果である。

研究 3) RNA-seq による発現解析で得られたデータをもとに IPA をおこない M/LOH 細胞で特に活性化している pathway を調べた。その結果、野生型 p53 欠失細胞 (AKTP^{Null}、AKTP^{LOH/R270H}) に共通して活性化されているのは Stem cell pathways であった。一方、Inflammatory related pathways と MAPK/Growth factor related pathways は M/LOH 細胞でのみ活性化されていることがわかった。これらの結果は、大腸がん悪性化における変異型 p53 の GOF と LOH の Combination の重要性として、Nature Communications (2020)11:2333 に発表した。

通常、野生型 p53 は MDM2 によるタンパク質分解を受け低い濃度に維持されているが、がんにおける変異型 p53 の特徴としてタンパク質蓄積があげられる。しかし興味深いことに実際のヒト CRC 検体や我々が作製した大腸がんモデルマウスでは、p53 免疫染色による陽性細胞は不均一に局在する。これはがん細胞であっても変異型 p53 が野生型 p53 と同様にタンパク質分解を受けていることを示唆している。申請者はこの変異型 p53 タンパク発現の不均一性に着目し、p53 タンパク分解がん細胞を AKTP^{Null} として用い、AKTP^{LOH/R270H} 細胞との相互作用を調べた。その結果、両者の細胞間で Ptgs2 を介した Wnt シグナル活性化機構があることを示す結果を見出した。現在この結果について論文作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Mizuho Nakayama, Chang Pyo Hong, Hiroko Oshima, Eri Sakai, Seong-Jin Kim, Masanobu Oshima	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 1-14
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山瑞穂
2. 発表標題 大腸がん転移機構に関わる遺伝子変異と微小環境の形成について—マウスオルガノイドモデルによる検証—
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakayama M, Oshima H, Oshima M.
2. 発表標題 The mechanisms of Wnt hyperactivation in intestinal tumor cells that carry gain-of-function p53 mutation
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 Nakayama M, Oshima H, Oshima M.
2. 発表標題 Gain-of-function mutant p53 hyperactivates Wnt signaling in colon cancer cell
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuho Nakayama, Chang Pyo Hong, Hiroko Oshima, Eri Sakai, Seong-Jin Kim, Masanobu Oshima
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

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中山瑞穂、大島浩子、大島正伸	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 5
3. 書名 病理と臨床「がんゲノム医療時代の分子腫瘍学」	

1. 著者名 中山瑞穂、大島正伸	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学「臨床実装が進む次世代がんバイオマーカー」	

1. 著者名 中山瑞穂、大島浩子、大島正伸	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学増刊「がん微小環境に1細胞レベルで挑む」	

〔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
---------	---------