

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08797

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたLrig1による癌幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of cancer stem cell maintenance by Lrig1 using transgenic mice

研究代表者

牧野 俊一郎 (Makino, Shunichiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60745446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではLrig1-GFPマウスを用いて、大腸癌におけるLrig1発現の意義、癌幹細胞性との関連を明らかにすることを目的とした。化学発癌させたLrig1-GFPマウスの腫瘍細胞のシングルセルRNA-seqの結果、Lrig1遺伝子発現と細胞単位で相関を示す遺伝子の抽出とそれらの遺伝子のハブとして機能する可能性のある分子の同定に成功した。さらに、大腸癌細胞株を用いたin vitro実験の結果、Lrig1を発現する静止期の癌幹細胞が細胞障害によって活動期の癌幹細胞にConversionする可能性を示唆するデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は癌の再発・転移の原因と考えられており、癌幹細胞がどのようにしてその性質を維持しているかを明らかにすることは重要な研究課題である。本研究で我々は、Lrig1陽性の静止期癌幹細胞が細胞障害時における活動期癌幹細胞の供給源となり、癌幹細胞の維持に重要な働きを示す可能性を示唆する結果を得た。この成果から癌幹細胞を標的とした新規治療戦略の開発に繋がることが期待され、高い学術的・社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the significance of Lrig1 expression in colorectal cancer and its association with cancer stemness using Lrig1-GFP mice. We analyzed single-cell RNA seq data of tumor cells from chemically induced colorectal cancer in Lrig1-GFP mice. As a result, we identified genes that are correlated with Lrig1 gene expression and one molecule that may function as a hub for those genes. Furthermore, the results of in vitro experiments using colorectal cancer cell lines suggested that quiescent cancer stem cells expressing Lrig1 may be converted to active cancer stem cells by severe cytotoxicity.

研究分野：医学、消化器外科学

キーワード：Lrig1 大腸癌 癌幹細胞性

1. 研究開始当初の背景

正常腸管の組織幹細胞 (Intestinal Stem Cell: ISC) は自己複製能および多分化能を有し、陰窩の底部に存在する。腸管上皮幹細胞として知られる Lgr5 陽性細胞は細胞回転が早く、増殖能が高いため、放射線感受性が高い。大腸組織において、Lgr5 は活動期 (active) の癌幹細胞 ISC (A-ISC) と定義され、新しい腸上皮細胞を供給して腸上皮機能の維持に重要な役割を持っている。Lgr5 は大腸癌においても癌幹細胞の表面マーカーとして知られ、発癌に深く関与することが知られている。大腸癌治療における重要なターゲットとなる可能性のある分子として研究が進められてきたが、Lgr5 を標的としたマウスの癌幹細胞に対する治療では、Lgr5 のノックアウト、あるいは分化細胞マーカーである KRT20 をノックインしても、Lgr5 陽性細胞が新たに供給され、癌幹細胞の根絶を達成することはできなかったと報告された。この新規に供給された Lgr5 陽性細胞の起源の同定を含め、癌幹細胞治療を目標とした研究にはブレイクスルーが求められている。

Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domain 1 (Lrig1) は膜 1 回貫通型蛋白で、腸管上皮幹細胞マーカーとしての機能を持ち、癌抑制遺伝子として EGFR を含む ErbB の発現を負に調節することで、腸管上皮幹細胞の増殖活性を負に制御している。Lrig1 は正常腸管上皮の最底部よりやや高い位置 (+4 position) に位置し、slow cycle で増殖能が低く quiescent な ISC (Q-ISC) と呼ばれる。マウスの正常大腸に放射線を照射すると、陰窩の Lrig1 陽性細胞の割合が増加し、細胞の増殖活性が高まることが報告されており、Lrig1 陽性細胞は組織障害に対して腸管組織の維持に寄与する可能性が示唆されている。Lrig1 をノックアウトすると ErbB1-3 の活性化によって下流に位置する Myc の活性を増加させる。Lrig1 欠失によって十二指腸腺腫が発生すること、また Lrig1 陽性細胞で APC をノックアウトすると大腸ポリープが発生することが報告された。しかしながら、大腸癌における Lrig1 の機能はまだ不明な点が多く、とりわけ癌幹細胞との関連性については十分に解明されていない。

2. 研究の目的

大腸癌において、癌抑制遺伝子としての Lrig1 がどのような機能を果たしており、いかに遺伝子ネットワークと相互作用して癌幹細胞に関与するのかがまだ十分にわかっていない。そこで本研究では、Lrig1 陽性細胞を GFP で可視化できる遺伝子改変マウスを用いて大腸癌における Lrig1 陽性細胞の遺伝子発現様式を解析し、大腸癌における Lrig1 の発現意義と大腸癌幹細胞維持機構における Lrig1 の果たす役割を明らかにすることで、近年注目されている癌幹細胞を標的とした新規治療戦略の開発を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 臨床検体での解析：大腸癌手術症例について、組織中 Lrig1 の発現を mRNA レベル (qRT-PCR)、タンパクレベル (免疫染色) で解析し、正常部と癌部の発現比較を行った。手術切除検体の免疫染色により、Lrig1 の大腸癌患者の予後との関連性を検討した。
- (2) Lrig1-GFP マウスにおける化学発癌：Lrig1 陽性細胞を GFP によって可視化できる Lrig1-GFP マウスにおいて、AOM (アゾキシメタン) の腹腔内投与と DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) の飲水により 6-8 週で化学発癌させた。腫瘍組織から Lrig1 陽性細胞

を分取し、C1 遺伝子増幅装置にて single cell RNAseq により遺伝子発現の定量解析を行い、Lrig1 発現と相関のある遺伝子を探索した。

- (3) In vitro 実験における Lrig1 の機能解析：大腸癌細胞株を用いて、Lrig1 の強制発現モデルを作製した。抗癌剤投与、放射線照射により細胞障害を与えたときの増殖活性、既知の癌幹細胞マーカーの発現解析を行い、コントロールの大腸癌細胞株と Lrig1 を過剰発現させた大腸癌細胞株における結果を比較検討した。

4. 研究成果

- (1) 外科手術で切除された大腸癌組織の正常部および癌部に対して Lrig1 抗体を用いた免疫染色を行った。正常部では陰窩が一部染まり、大腸癌組織では上皮細胞に Lrig1 のタンパク発現が確認された。大腸癌患者 186 例の原発巣より抽出した mRNA を用いて Lrig1 発現量が予後に与える影響について検討を行った。qRT-PCR にて発現量を中央値で 2 群に分類し比較検討を行ったところ、全生存率 OS では差は認めなかったものの無病生存率 DFS では Lrig1 高発現群が有意に予後良好となり、多変量解析においても有意差を認めた。
- (2) Lrig1-GFP マウスを用いた検討では Lrig1 発現の陽性コントロールとなる小脳皮質で GFP が強発現していた。このマウスに AOM (アゾキシメタン) の腹腔内投与と DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) の飲水接種により大腸癌を作製し、腫瘍を蛍光顕微鏡で観察したところ、大腸癌細胞の一部に GFP 陽性細胞を確認した。また、腫瘍を Lrig1 抗体で免疫染色を行ったところ、Lrig1 は腫瘍の基底部の癌細胞に発現し、EGFR はその少し表層側に染色されており、両者は排他的な発現パターンを示した。GFP 陽性癌細胞を FACS で回収して Lrig1 mRNA 発現を qRT-PCR で調べたところ、GFP 陰性細胞と比較して有意な Lrig1 mRNA 発現の増加を確認した。これらの GFP 陽性細胞と陰性細胞をシングルセルレベルで C1 遺伝子増幅器にかけて RNA シークエンスに提出した。その結果、Lrig1 遺伝子発現と細胞単位で相関を示す遺伝子が 5 つ抽出された。さらに、*in silico* 解析にて詳細な検討を行った結果、Lrig1 陽性細胞で発現が上昇している遺伝子のハブとして機能する可能性がある遺伝子として、ヒストンのメチル化を認識するエピジェネティック分子を同定した。
- (3) 放射線や抗癌剤暴露後に Lrig1 発現細胞が active な幹細胞としての性質を示すようになるのかという点に着目して検討を進めた。2 種類の大腸癌細胞株 SW480, Caco2 に Lrig1 を過剰発現させて作製した OE 株において、実際に Lrig1 が過剰発現しているかについて Western Blotting, Flow cytometry にて確認した。Western Blotting を行った結果、Lrig1 OE 株において、Lrig1 のタンパク発現が NC 株 (Empty vector 導入株) と比較して増加していることが確認できた (図 1)。

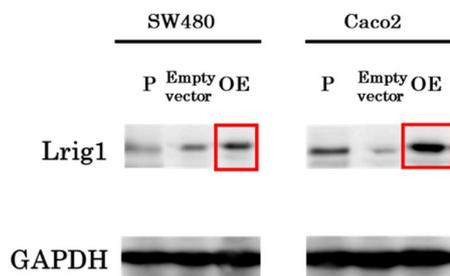


図 1:

Lrig1 OE 株において、Lrig1 のタンパク発現量が NC 株と比較して上昇していた。

Flow cytometry を用いて Lrig1 を発現している細胞の割合を確認した結果、SW480 の OE 株は NC 株と比較して約 58%、Caco2 の OE 株は約 66%、Lrig1 陽性細胞が増加していた。

- (4) コントロールの大腸癌細胞株と Lrig1 を過剰発現させた大腸癌細胞株に放射線や抗癌剤を暴露し、細胞増殖活性の変化を検討した。その結果、放射線暴露により、コントロール細胞では細胞増殖能が低下したのに対し、Lrig1 過剰発現細胞では逆に細胞増殖能が増加することが明らかとなった (図 2)。抗癌剤暴露によっても同様の結果が得られた。

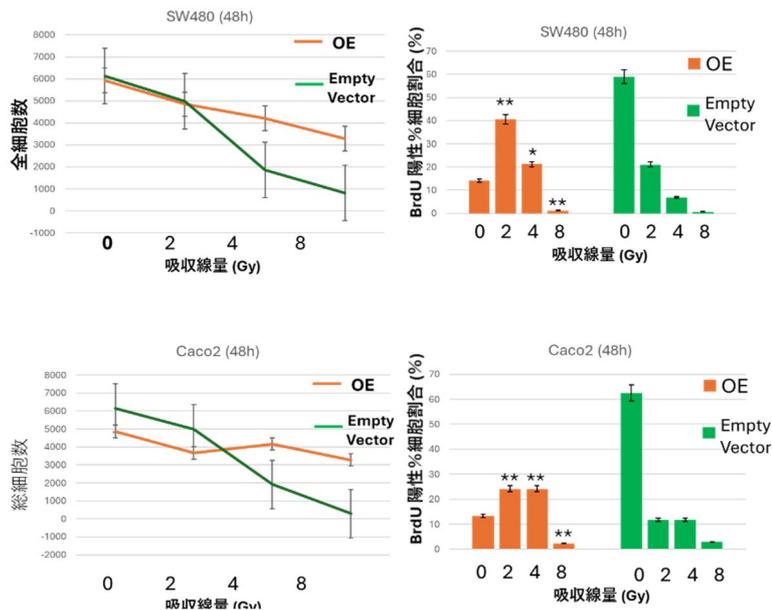


図 2:
Lrig1 OE 株では放射線暴露によって細胞増殖能が増加した。

- (5) コントロールの大腸癌細胞株と Lrig1 を過剰発現させた大腸癌細胞株に放射線や抗癌剤を暴露し、Lrig1 発現の変化、活動期癌幹細胞マーカーである Lgr5 発現の変化を検討した。その結果、Lrig1 過剰発現細胞では放射線暴露により Lrig1 発現が低下し (図 3)、LGR5 の発現上昇が認められた (図 4)。抗癌剤暴露によっても同様の結果が得られた。

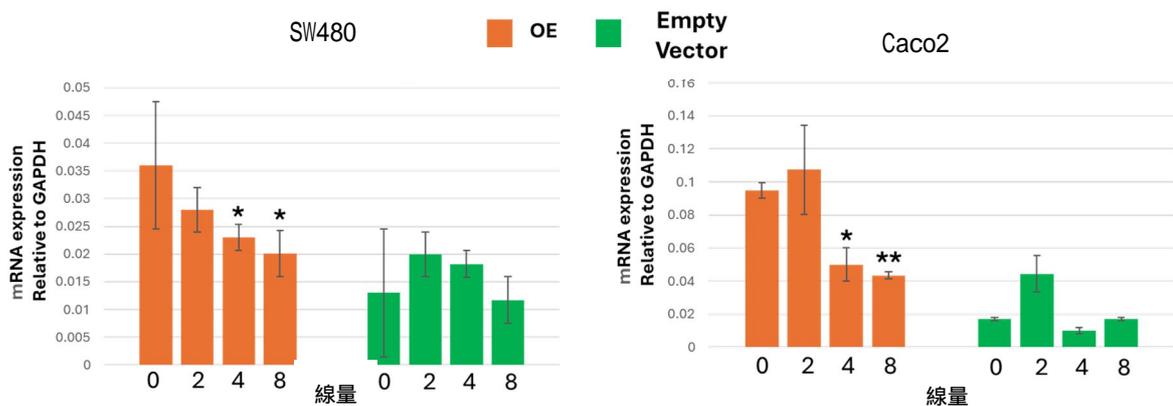


図 3: Lrig1 過剰発現細胞では放射線暴露により Lrig1 発現が低下した。

Legend: ■ OE ■ Empty Vector

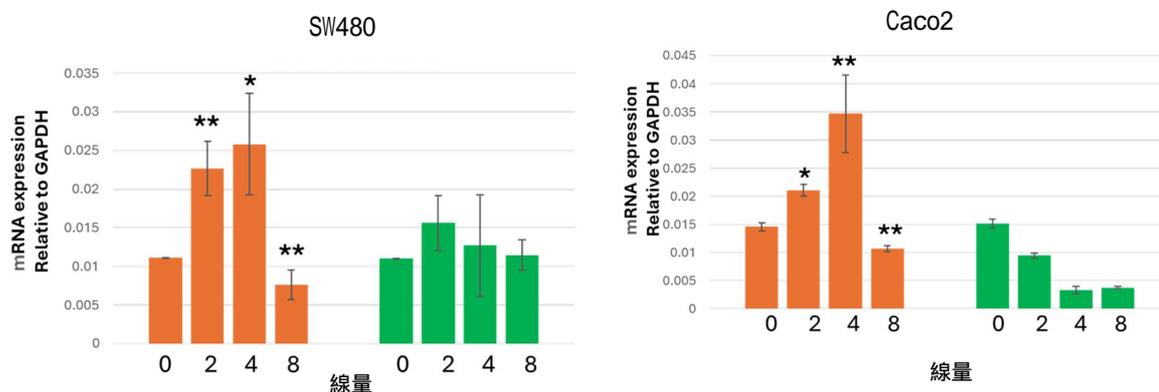


図 4: Lrig1 過剰発現細胞では放射線暴露により Lgr5 発現が増加した。

(考察) 正常大腸組織で Lrig1 を発現する静止期の組織幹細胞の動向と同じく、大腸癌細胞でも Lrig1 陽性細胞は、通常状態では癌細胞の静止に働くが、抗癌剤や放射線によって癌細胞の存続が危うくなる状況では、増殖性を獲得し、Lrig1 レベルを下げ Lgr5 レベルを上昇させるというステム性の conversion (静止期から活動期へ) が起きている可能性が示唆された。そのメカニズムのひとつとして、Lrig1 マウスより見出したエピゲノム調節因子が関与する可能性を捉えつつあり引き続き探索を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	
研究分担者	高橋 秀和 (Takahashi Hidekazu) (10528508)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	横山 雄起 (Yokoyama Yuhki) (60615714)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	小泉 雅彦 (Koizumi Masahiko) (90186594)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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