

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19421

研究課題名（和文）慢性炎症を伴う大腸がん形成に関与する遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and validation of colitis associated cancer driver genes.

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：慢性炎症を伴う大腸がん形成にどのような遺伝子変異や経路が関与するのかを明らかにするために、大腸炎マウスモデルにおいてトランスポゾンを用いたがん関連遺伝子生体内スクリーニングを実施し、炎症関連腫瘍形成に関与する候補遺伝子を同定した。得られた候補遺伝子のがん化能に関し、オルガノイドを用いた実験系にて検証し、2つの遺伝子が腫瘍抑制的に機能することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、炎症関連腫瘍形成に関与する遺伝子を網羅的に同定した。同定した遺伝子のCdkn2aは、炎症刺激によりDNAメチル化を介して不活性化されることをin vitroの実験により示した。慢性炎症はエピゲノム異常を引き起こしてがん促進的に機能することが知られるが、本研究で同定した遺伝子群を詳細に調べることにより、炎症関連腫瘍で機能する遺伝子の特定につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate genes and pathways involved in inflammation-associated colorectal cancer development, we performed a transposon-based in vivo screening of cancer-related genes in a DSS-induced colitis mouse model. We could identify genes that were more frequently mutated in inflammation-associated colon tumors.

The tumor suppressive potential of the candidate colorectal cancer genes was validated in the experimental system using mouse tumor organoids, and two genes were shown to be tumor suppressors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：生体内スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎患者の大腸がん発症リスクは、通常より 1.7-2.4 倍高まることが知られている。大腸炎が引き起こされると、炎症性線維芽細胞やマクロファージ等から $TNF\alpha$ や $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 等の炎症性サイトカインが過剰に分泌される。ノックアウトマウスを用いた様々な遺伝学的研究により、これらサイトカインの刺激は、腸上皮細胞で $NF-\kappa B$ 経路を活性化し腫瘍形成を促進することが示されている。一方で、ヒトがんゲノム解析の研究成果により、大腸炎を伴う大腸がんは、散発性の大腸がん形成と比べ $TP53$ の変異が高頻度に観察されることが報告されており、散発性大腸がんとは異なる発がん分子機構があることが示唆されている。さらに、大腸炎が誘発されるとがんゲノムのメチル化度合いが高くなるという報告もある。最近の研究では、 $TNF\alpha$ と $IL-1\beta$ 添加によりメチル化酵素活性化と脱メチル化酵素不活性化がおきることが、ヒト細胞株において明らかにされ、 $NF-\kappa B$ を介したサイトカインシグナルがゲノムのメチル化を直接誘導できることが示された。このように、慢性炎症を伴うがん形成は、サイトカインシグナルによる増殖刺激に加え、 $TP53$ 経路異常や、エピゲノム異常による新たな分子機構で大腸がん形成が促進されている可能性が示されていた。

2. 研究の目的

慢性炎症を伴うがん形成は、サイトカインシグナルによる増殖刺激やゲノム異常に加え、エピゲノム異常により大腸がん形成が促進されている可能性が示されているが、慢性炎症を伴うがん形成に特異的に機能する分子機構やドライバー遺伝子の全体像はいまだ不明確な状況である。そこで本研究では、*Sleeping Beauty* (SB) 挿入変異誘発法を用いたマウス生体内スクリーニングにより大腸炎と協調的に作用するがんドライバー遺伝子を網羅的に同定することを一つ目の目的とする。さらに、マウスの生体内スクリーニングで得られた結果と、ヒトのゲノム解析で得られた結果を比較し、ヒトとマウスで共通して脱制御を受けている遺伝子を抽出し、機能検証を行うことで大腸がんドライバー遺伝子を同定することを二つ目の目的とする。

3. 研究の方法

SB 挿入変異誘発法は、SB トランスポゾンによる挿入変異をランダムに誘発させ、がん関連遺伝子を網羅的に同定する順遺伝学的手法である。DNA のメチル化はゲノムの広い領域で誘導されることが多く、特定の原因遺伝子を絞り込むことが困難であるが、ヒトのがんで DNA メチル化により不活性化されている遺伝子も SB スクリーニングで捉えることができる。本研究では、SB トランスポゾン転移酵素(SB11)とトランスポゾン(Onc2)を持つマウス、大腸がんを高頻度に見られる遺伝子変異(*Kras* 活性化型点変異など)を保持するマウス、消化管上皮細胞で Cre リコンビネースを発現するマウス(Villin-CreERT2)を交配して複合変異マウスを作成し、このマウスに Dextran Sodium Sulfate (DSS)を投与することで大腸炎を伴う大腸がん形成をモデルする。大腸に炎症を引き起こすと言われている高脂肪食摂取、全身性に炎症反応を惹起する polyIC の投与も検討する。形成された腫瘍ゲノム中のトランスポゾン挿入部位を同定し、がん形成に関与す

る責任遺伝子を網羅的に同定する。

トランスポゾン生体内スクリーニングから同定された遺伝子が、がん化に關与するのか機能検証を行う。マウス大腸オルガノイドにおいて遺伝子改変を行い、免疫不全マウスに移植して腫瘍形成能を評価し、新規大腸がんドライバー遺伝子を同定する。

4. 研究成果

炎症を起こすために、DSS 投与、PolyIC の腹腔内投与、高脂肪食給餌の 3 条件を試した。病理組織標本を作成し、炎症反応が惹起されているかについて評価した。その結果、DSS 投与を 3 回行うことで潰瘍と組織修復を伴う慢性的な大腸炎を安定的に誘導することができる結果を得た。また、PolyIC を SB マウスに週 1 回、6 週間にわたって投与すると、マクロファージの慢性的な活性化が引き起こされ、その結果消化管の腫瘍形成が促進される傾向があることも示された。高脂肪食を与えた場合も、消化管に炎症反応とみられる所見が観察された。それぞれにおいて利点があるため、これら 3 つの条件を使用し大腸がんのモデルマウスを作成することとした。本研究では、DSS を用いた研究について報告する。

大腸上皮細胞でトランスポゾンが活性化したマウスに DSS による大腸炎を誘導したところ、直径 5mm 以上の大きな腫瘍の数が増加した。これら腫瘍ゲノムの解析を行い、候補遺伝子を同定したところ、200 個近くの大腸炎関連腫瘍を同定することができた。その中には、*Trp53* や *Cdkn2a*、アクチビン経路に關連する遺伝子が含まれていた。*CDKN2A* 遺伝子は、人の大腸炎関連腫瘍では

変異がほとんど認められないが、メチル化が高頻度で引き起こされることが報告されている。そこで、炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ を大腸上皮オルガノイドに長期間添加し、培養を続けるとメチル化が引き起こされるかを検証した。その結果、野生型大腸上皮オルガノイドに $TNF\alpha$ を添加して培養を続けると p16 プロモーター領域のメチル化が促進した。同様に、*KrasG12D* 変異を持つ大腸上皮オルガノイドを用いた場合でも、メチル化が亢進した(図 1)。

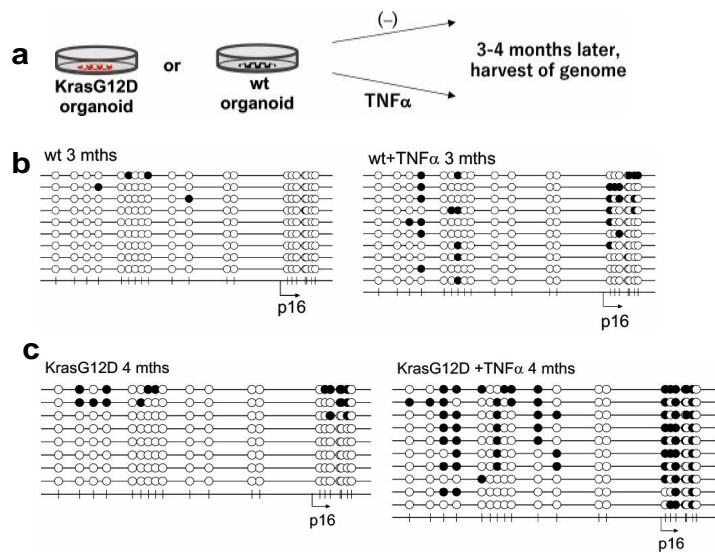


図 1 $TNF\alpha$ 添加で大腸上皮オルガノイドの DNA メチル化が促進した。

これより、 $TNF\alpha$ 刺激を受けた大腸上皮は DNA メチル化が進むことが本研究からも示された。一方で、DNA メチル化に關する酵素は $TNF\alpha$ 添加で顕著な変化が認められなかった(図 2)。これらの結果から、p16 プロモーター領域の DNA のメチル化が促進した細胞が、 $TNF\alpha$ 存在下で生存に有利に働くと考えている。

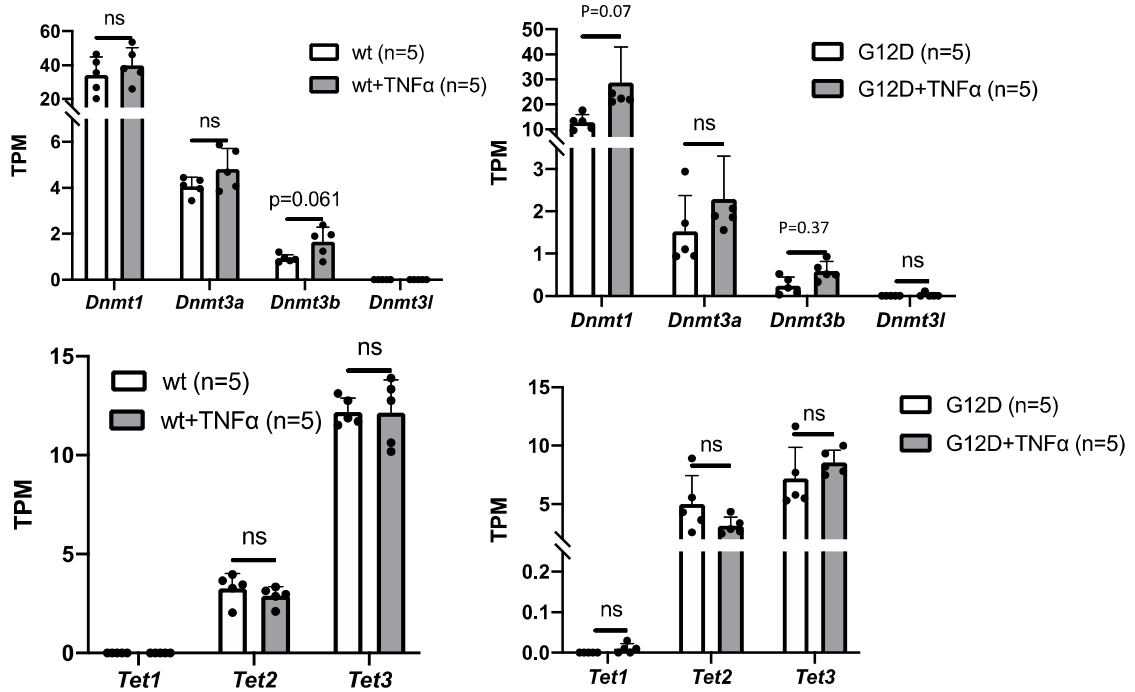
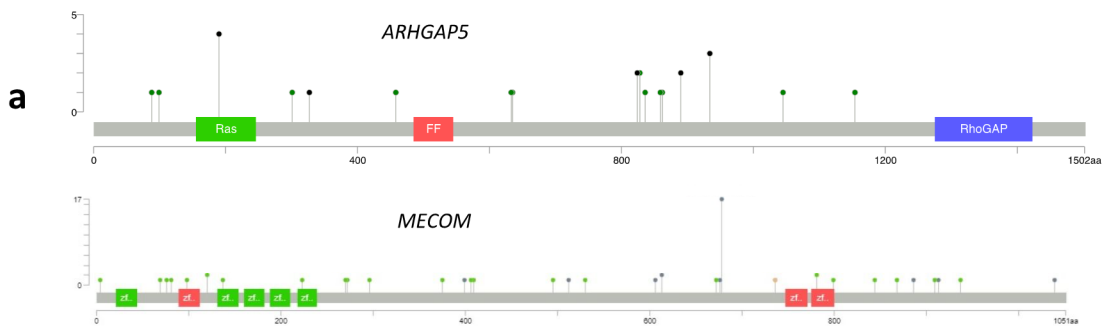


図 2 TNF α 添加の有無で DNA メチル化酵素や脱メチル化酵素の発現に顕著な違いは見られなかった。

生体内スクリーニングで同定した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、共通して変異の認められる遺伝子を抽出したところ、*ARHGAP5*と*MECOM*が含まれていた。どちらの遺伝子もヒト大腸がんでは終止コドンが導入され、腫瘍抑制的に機能していることが示唆された。マウス大腸腫瘍由来オルガノイドにおいて CRISPR-Cas9 にて



b

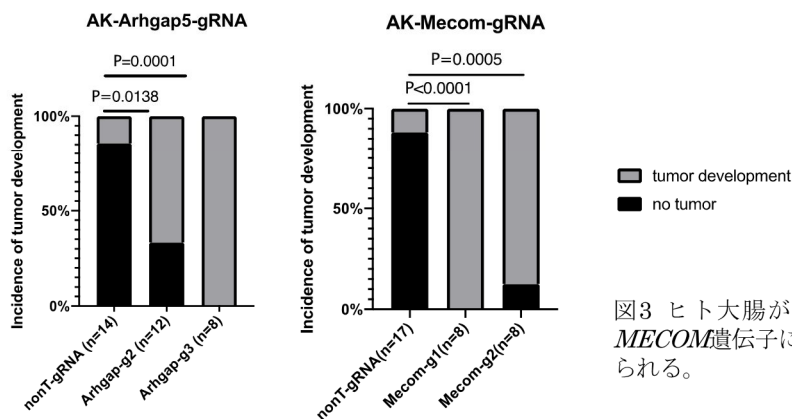


図3 ヒト大腸がんでは*ARHGAP5*と*MECOM*遺伝子には終止コドンが認められる。

Arhgap5 と *Mecom* をノックアウトしマウス皮下に移植したところ、コントロール(non-target gRNA)と比較して腫瘍形成効率が有意に上昇したことより、腫瘍抑制遺伝子として機能することを実験に検証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naoko Iida, Yukari Muranaka, Jun Won Park, Shigeki Sekine, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins, Yuichi Shiraiishi, Masanobu Oshima, Haruna Takeda	4. 巻 31
2. 論文標題 Sleeping Beauty transposon mutagenesis in mouse intestinal organoids identifies genes involved in tumor progression and metastasis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 527-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shimomura Kana, Hattori Naoko, Iida Naoko, Muranaka Yukari, Sato Kotomi, Shiraiishi Yuichi, Arai Yasuhito, Hama Natsuko, Shibata Tatsuhiro, Narushima Daichi, Kato Mamoru, Takamaru Hiroyuki, Okamoto Koji, Takeda Haruna	4. 巻 14
2. 論文標題 Sleeping Beauty transposon mutagenesis identified genes and pathways involved in inflammation-associated colon tumor development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-023-42228-z	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 Yamamoto D, Oshima H, Wang D, Takeda H, Kita K, Lei X, Nakayama M, Murakami K, Ohama T, Takemura H, Toyota M, Suzuki H, Inaki N, Oshima M.	4. 巻 257 (1)
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 J Pathol.	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 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 mutateons 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 698771-698771
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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 下村 奏、服部 奈緒子、飯田 直子、加藤 護、白石 友一、武田はるな
2. 発表標題 大腸炎症関連がんにおける細胞老化経路の関与
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田はるな、下村 奏、飯田 直子、服部 奈緒子、加藤 護、白石 友一
2. 発表標題 SB トランスポゾンスクリーニングを用いた炎症関連がん形成に関与する遺伝子の網羅的同定
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田はるな
2. 発表標題 SB トランスポゾンを用いた生体内スクリーニング
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村中 柚花理、飯田 直子、服部 奈緒子、加藤 護、白石 友一、武田はるな
2. 発表標題 SB トランスポゾンスクリーニングを用いた大腸がん転移に関わる遺伝子の同定
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村 奏、服部 奈緒子、飯田 直子、加藤 護、白石 友一、武田はるな
2. 発表標題 Sleeping Beautyを用いた炎症関連がん遺伝子の網羅的同定
3. 学会等名 第35回発癌病理研究会
4. 発表年 2022年

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