

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：87123

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19577

研究課題名（和文）機能獲得型変異 p53 が制御する癌幹細胞化の解明と治療戦略の確立

研究課題名（英文）Establishment of therapeutic strategies based on the understanding of cancer stemness regulated by gain-of-function mutant p53

研究代表者

前原 喜彦（maehara, yoshihiko）

公立学校共済組合九州中央病院（臨床研究センター）・臨床研究センター・主任研究員

研究者番号：80165662

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）：本研究は機能獲得型p53が癌幹細胞の特性決定に起因するという従来とは全く異なる視点からの新規癌幹細胞形成モデルの提唱に挑戦した。まずp53変異細胞株パネルをゲノム編集技術により構築した。RNA-seq解析により機能獲得型p53変異細胞における遺伝子発現プロファイルの変化が認められた。さらに遺伝子オンロジーエンリッチメント解析により、p53欠損型と機能獲得型との間には特徴的な変動因子が検出されp53機能獲得型変異体における癌幹細胞性の検証に有用であると考えられた。さらにp53変異細胞株パネルを用いた検証で、ヌクレオシドアナログFTDは機能獲得型p53遺伝子の影響を受けずに殺細胞効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したp53変異細胞株パネルは、p53遺伝子変異以外の要因を排除するために野生型p53遺伝子をもつHCT116細胞を親株としてゲノム編集技術により樹立されたアイソジェニックな細胞パネルである。これはp53ステータスの違い（野生型、欠損型、機能獲得型）がもたらす影響を解析する研究に対して有力なツールとなる。機能獲得型p53変異は放射線やある種の抗がん剤耐性に寄与することが報告されるが、本細胞パネルによる検証ではヌクレオシドアナログ系抗がん剤FTDは機能獲得型p53変異の影響を受けずに殺細胞効果を発揮することが示され、p53ステータスの違いが治療効果におよぼす影響の予測に有用である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to propose a novel model of cancer stem cell formation, in which gain-of-function p53 is responsible for determining the characteristics of cancer stem cell.

First, we generated a panel of p53 mutant cell lines using genome editing system, and RNA-seq analysis revealed altered gene expression profiles in gain-of-function p53 mutant cells. Furthermore, gene ontology enrichment analysis revealed a characteristic variation between p53-deficient and gain-of-function mutants, which may be useful to verify the cancer stemness of p53 gain-of-function mutants. Further validation using a panel of p53 mutant cell lines showed that the nucleoside analogue FTD had a cytotoxic effect without the influence of the gain-of-function p53 gene.

研究分野：外科系臨床医学，消化器外科学

キーワード：機能獲得型p53変異 p53変異細胞株パネル 遺伝子発現プロファイル エピゲノム異常

1. 研究開始当初の背景

再発と転移は化学療法、放射線治療そして根治的外科手術などの癌治療を行ったにもかかわらず起きてしまい、癌治療法の発展がめまぐるしい現在においてもなお癌の克服を難しくさせている。それらが癌病態の悪性化を進展させる原因のひとつに抗癌剤治療に抵抗性を示す癌幹細胞があげられる。癌化の過程における癌幹細胞化のメカニズムのひとつにゲノム変異およびエピゲノム異常が関与すると考えられている。癌幹細胞におけるエピゲノム異常が癌幹細胞性をもたらす初期イベントとなることが強く示唆されるが、初期の癌化における癌幹細胞性の獲得や癌化した後の癌の進展にともなう癌幹細胞化においてどのような鍵因子が関与するのかについて厳密に解析された研究は驚くほど少ない。

幹細胞のふるまいに癌抑制遺伝子 p53 が重要な因子として関わると報告されている。p53 は DNA 損傷、老化、癌遺伝子活性化、低酸素などのストレスに応答して活性化することで、さまざまな遺伝子を転写誘導する。さらに p53 は癌で最も高頻度に変異を認める遺伝子であり、癌化において p53 機能喪失が重要であることは明らかである。ごく最近の研究において p53 研究における新たな展開が示された。臨床の癌組織における p53 はそのほとんどがアミノ酸置換をとらなうミスセンス変異であることが知られているが、いくつかのミスセンス変異体はあたかも‘癌遺伝子’のように癌の進行をむしろ加速するようにふるまうことが報告された (Zhu et al. *Nature* 2015)。すなわち、p53 ミスセンス変異体がクロマチン制御因子の発現上昇を誘導し、その結果ゲノムワイドにクロマチン制御を変化させることでエピゲノム異常を起こすことで癌の増殖を亢進させることが示された。このような p53 機能獲得型変異体は、癌抑制遺伝子としての本来の機能を欠失するのみならず p53 が本来転写標的とする遺伝子を誘導せず、別の遺伝子を発現誘導することが示されている。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、癌治療を行ったにもかかわらず起きてしまう再発と転移のメカニズムとして p53 機能獲得型変異体により癌幹細胞化が促進される可能性を考えている。本研究はそれらを制御することで革新的な癌治療戦略を見いだすことを目的とした。大腸癌患者由来の臨床検体による大型コホートを用いて p53 機能獲得型変異と癌幹細胞ステータスの関連性を明らかにするための研究へとつなげるため、p53 機能獲得型変異体による癌幹細胞化促進への関与の有無を検証するための基礎検討を行う。

3. 研究の方法

p53 機能獲得型変異体における遺伝子発現プロファイルの変化と癌幹細胞化の検証

p53変異細胞株パネルにおけるp53機能獲得性の検証

ゲノム編集技術により p53 ノックアウト、および異なる 2 種類の p53 機能獲得型変異 (R175H; 立体構造変異, R248Q; DNA 結合性変異) のノックイン細胞を樹立する (図 1)。それぞれの p53 ステータスの細胞株に特徴的な発現プロファイルを見いだす。方法としては、この細胞株パネルを用いて RNA 次世代シーケンス (RNA-seq 解析) により得られる網羅的な遺伝子発現データから、さらに遺伝子オントロジーエンリッチメント解析 (GO 解析) により p53 野生型あるいはノックアウトと比較して機能獲得型変異において癌幹細胞マーカー因子の変動を解析する。

p53変異細胞株パネルを用いた抗がん剤への細胞応答の検証

p53 ステータスの違いが幹細胞性の獲得にどのように寄与するのかは未だ不明である。p53 機能獲得型ミスセンス変異は放射線やある種の抗がん剤への耐性に寄与することが報告されており、本研究で樹立した p53 変異細胞株パネルを用いて、抗がん剤に対する細胞応答と感受性を p53 野生株、欠損株、機能獲得型ミスセンス変異株の間で比較する。これらの観察は二次元培養のみならず、三次元培養によるスフェロイドモデルや樹立した p53 変異細胞株パネルをマウスに移植するマウスゼノグラフトモデルにて生体内の微小環境においても検証する。

4. 研究成果

p53 変異細胞株パネルの樹立

一般的に p53 ミスセンス変異の解析に関する報告の多くが異なるがん種から樹立された多様な細胞株間での比較によって行われている。しかしながら、これらの解析方法では細胞株間の異なる遺伝的バックグラウンドの影響や、p53 ミスセンス変異タンパク質の長期発現に適応した細胞株の二次的な遺伝子発現プロファイルの変化による影響を除外できない。そこで p53 が野生型であり染色体安定性が維持されている HCT116 細胞を親株とし、ゲノム編集技術により p53 欠損細胞、および異なる 2 種類の p53 機能獲得型ミスセンス変異 (R175H; 立体構造変異, R248Q; DNA 結合性変異) のノックイン細胞を樹立した。親株に対して、樹立した p53 欠損株および機能獲得型ミスセンス変異株の特性を検証したところ、下流因子であるの p21 や MDM2 の遺伝子発現の低下や種々の抗がん剤に対する p21 蓄積の不全が認められ、またすでに論文報告されている変異 p53 特異的な転写因子 ETS2 との結合が、今回樹立された機能獲得型ミスセンス変異株でも再現された。また RNA 次世代シーケンス (RNA-seq) 解析による網羅的な遺伝子発現プロファイルの比較を階層型クラスタリングや主成分分析にて行ったところ、

p53 の野生株、欠損株、機能獲得型ミスセンス変異株の間には明確な違いが観察された(図 2)。特に p53 欠損と機能獲得型ミスセンス変異細胞の間には特徴的な変動因子

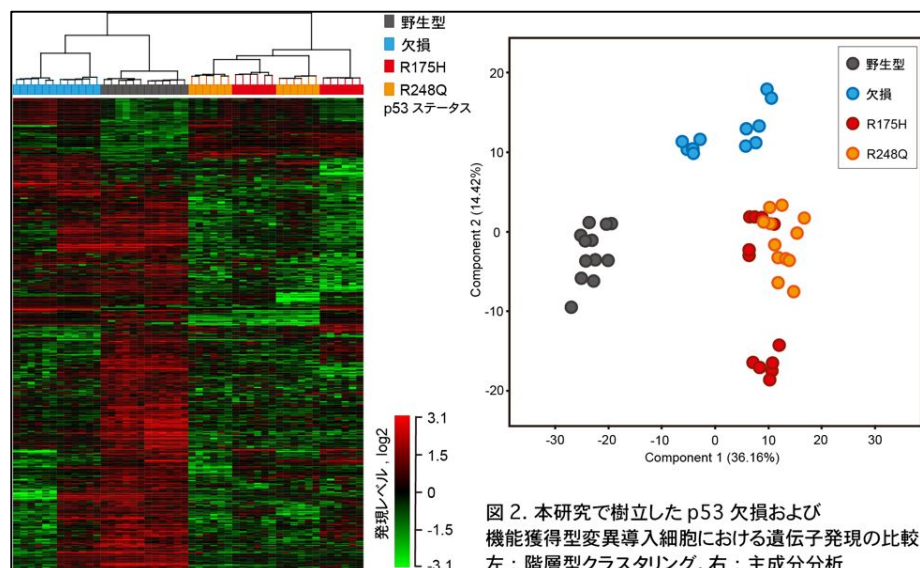


図 2. 本研究で樹立した p53 欠損および機能獲得型変異導入細胞における遺伝子発現の比較
左: 階層型クラスタリング, 右: 主成分分析

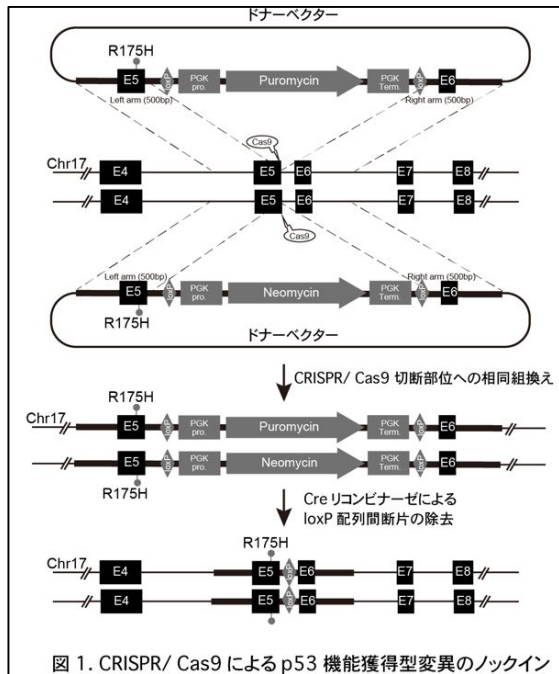


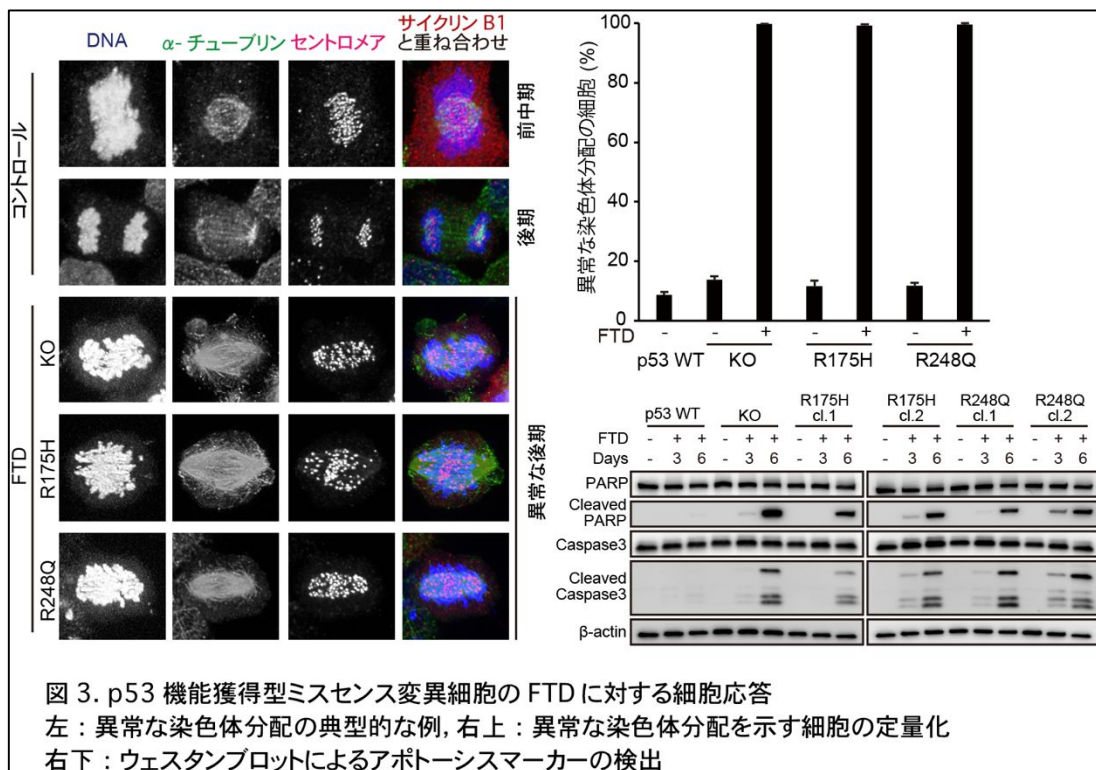
図 1. CRISPR/ Cas9 による p53 機能獲得型変異のノックイン

が検出され、アミノ酸代謝をはじめとするがん代謝に関わる遺伝子発現の増加が認められた。したがって今回樹立した p53 変異細胞株パネルは本研究のモデル細胞として p53 機能獲得型ミスセンス変異体による癌幹細胞化促進への関与の有無を検証するために有用であることが示唆された。

p53 変異細胞株パネルを用いた抗がん剤への細胞応答の検証

p53 機能獲得型ミスセンス変異は放射線やある種の抗がん剤への耐性に寄与することが報告されている。そこで異なる細胞株間の遺伝的バックグラウンド違いの影響を排除するために、本研究で樹立した p53 変異細胞株パネルを用いて p53 機能獲得型ミスセンス変異が抗がん剤への細胞応答におよぼす影響を検証した。

検証にはヌクレオシドアナログ系抗がん剤であるトリフルリジン(以下 FTD)を用いた。FTD はこれまでの報告より p53 ステータスにより細胞応答が大きく異なる抗がん剤であり、FTD により与えられる DNA 複製ストレスは p53 が野生型の場合は p53-p21 経路の活性化とそれに伴う分裂期スキップ(G2 期から分裂期を経ずに G1 期へ移行する現象)を起こして細胞老化が誘導される。一方で p53 欠損細胞ではそのような細胞応答は起こらず G2 期から分裂期へ進行するが、大規模な染色体ブリッジを伴う染色体不均等分配を起こした後に G1 期において異常な核構造を形成して、その後にアポトーシスによる細胞死を起こす。放射線やある種の抗がん剤で見られるような p53 機能獲得型ミスセンス変異が原因となる耐性が FTD においても起こるかを検証した。その結果、p53 機能獲得型ミスセンス変異細胞の FTD に対する細胞応答は p53 欠損細胞と類似しており、分裂期への移行と染色体分配異常およびその後の核構造の異常が誘導された。さらにアポトーシスによる細胞死の誘導も認められた(図 3)。



マウスゼノグラフトモデルによる p53 機能獲得型ミスセンス変異細胞の FTD に対する感受性の検証

p53 変異細胞株パネルを用いた二次元培養における観察では、p53 機能獲得型ミスセンス変異細胞は p53 欠損細胞と同様に、FTD による細胞死誘導が観察された。そこで生体内の微小環境においてもそのような特徴を維持しているか三次元培養によるスフェロイドモデルやマウスゼノグラフトモデルを用いて FTD による腫瘍増殖抑制効果を観察した。その結果、p53 野生型や欠損型と同様に、p53 機能獲得型ミスセンス変異型においても腫瘍増殖抑制効果が認められた。このことは、ヌクレオシドアナログ FTD が p53 ステータスの違いによる遺伝子発現プロファイルの変化に影響を受けることなく殺細胞効果を与えることが示された。

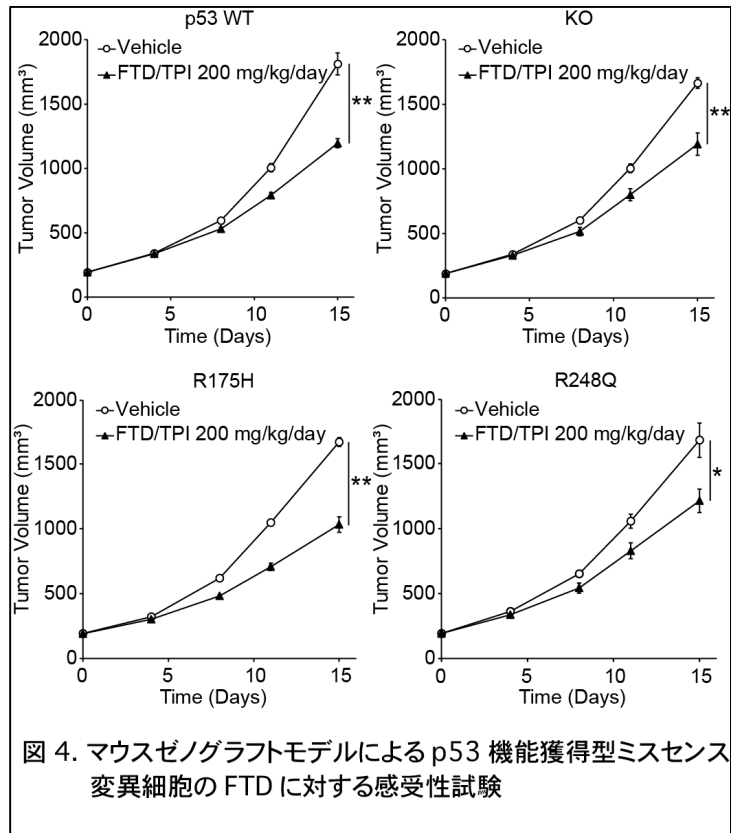


図 4. マウスゼノグラフトモデルによる p53 機能獲得型ミスセンス変異細胞の FTD に対する感受性試験

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takeshi Wakasa; Kentaro Nonaka; Akihito Harad; Yasuyuki Ohkawa; Chie Kikutake; Mikita Suyama; Takashi Kobunai; Kenta Tsunekuni; Kazuaki Matsuoka; Yuki Kataoka; Hiroaki Ochiwa; Kazutaka Miyadera; Takeshi Sagara; Eiji Oki; Shigehiro Ohdo; Yoshihiko Maehara; Makoto Iimori; and Hiroyuki Kitao	4. 巻 -
2. 論文標題 The anti-tumor effect of trifluridine via induction of aberrant mitosis is unaffected by mutations modulating p53 activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	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） なし	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 Maehara Y, Oki E, Ota M, Harimoto N, Ando K, Nakanishi R, Kawazoe T, Fujimoto Y, Nonaka K, Kitao H, Iimori M, Makino K, Takechi T, Sagara T, Miyadera K, Matsuoka K, Tsukihara H, Kataoka Y, Wakasa T, Ochiwa H, Kamahori Y, Tokunaga E, Saeki H, Yoshizumi T, Kakeji Y, Shirabe K, Baba H, Shimada M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Lineage of drug discovery research on fluorinated pyrimidines: chronicle of the achievements accomplished by Professor Setsuro Fujii	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 613 ~ 624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-023-02326-w	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 Kuboki Y, Terazawa T, Masuishi T, Nakamura M, Watanabe J, Ojima H, Makiyama A, Kotaka M, Hara H, Kagawa Y, Sugimoto N, Kawakami H, Takashima A, Kajiwara T, Oki E, Sunakawa Y, Ishihara S, Taniguchi H, Nakajima TE, Morita S, Shirao K, Takenaka N, Ozawa D, Yoshino T.	4. 巻 128
2. 論文標題 Trifluridine/tipiracil+bevacizumab (BEV) vs. fluoropyrimidine-irinotecan+BEV as second-line therapy for metastatic colorectal cancer: a randomised noninferiority trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1897 ~ 1905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-023-02212-2	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 Qiu Shichao, Iimori Makoto, Edahiro Keitaro, Fujimoto Yoshiaki, Matsuoka Kazuaki, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko, Mori Masaki, Kitao Hiroyuki	4. 巻 113
2. 論文標題 CD44v3,8 10 is essential for Slug dependent <i>vimentin</i> gene expression to acquire TGF β 1 induced tumor cell motility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2654 ~ 2667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15353	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 Mori T, Okamoto Y, Mu A, Ide Y, Yoshimura A, Senda N, Inagaki-Kawata Y, Kawashima M, Kitao H, Tokunaga E, Miyoshi Y, Ohsumi S, Tsugawa K, Ohta T, Katagiri T, Ohtsuru S, Koike K, Ogawa S, Toi M, Iwata H, Nakamura S, Matsuo K, Takata M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Lack of impact of the <scp>ALDH2</scp> rs671 variant on breast cancer development in Japanese <scp>BRCA1</scp> /2 mutation carriers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6594 ~ 6602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5430	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北尾洋之、野中謙太郎、飯森真人、沖英次
2. 発表標題 The significance of ATR as a therapeutic target in combination with DNA replication stress-inducing drugs
3. 学会等名 19th Ataxia Telangiectasia Workshop
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯森真人、野中謙太郎、北尾洋之
2. 発表標題 DNA複製ストレス誘導性抗がん剤との併用における治療標的としてのATR制御の意義
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯森真人、若狭武司、野中謙太郎、菊竹千恵、須山幹太、小武内尚、松岡和明、沖英次、前原喜彦、北尾洋之
2. 発表標題 p53機能欠損細胞におけるトリフルリジン誘導性DNA複製ストレスによる細胞毒性効果のメカニズム
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 野中謙太郎、飯森真人、北尾洋之
2. 発表標題 DNA複製ストレス誘導性抗がん剤との併用における治療標的としてのATR制御の意義
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 前原 喜彦
2. 発表標題 フッ化ピリミジン系抗癌剤をサイエンスする
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
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
研究分担者	北尾 洋之 (Kitao Hiroyuki) (30368617)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	
研究分担者	飯森 真人 (Iimori Makoto) (20546460)	福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授 (37114)	
研究分担者	沖 英次 (Oki Eiji) (70380392)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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