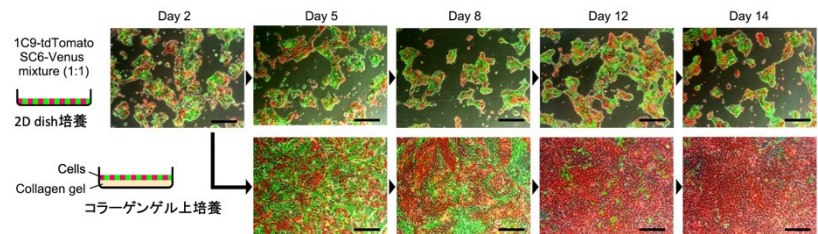


令和4年度 共同研究報告書

|                                    |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |            |
|------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| 研究区分                               |       | 一般共同研究                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |            |            |
| 研究課題名                              |       | 大腸がん転移における遺伝子変異と宿主反応の役割                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |            |
| 新規・継続の別                            |       | 新規 ・ <b>継続</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |            |            |
| 研究代表者                              | 所属    | 金沢大学がん進展制御研究所                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 40歳<br>以下○ | 35歳<br>以下○ |
|                                    | 職名・氏名 | 教授・大島 正伸                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |            |            |
| 研究分担者<br>(適宜行を追加して下さい)             | 所属    | 金沢大学がん進展制御研究所                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /          | /          |
|                                    | 職名・氏名 | 准教授・大島 浩子                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |            |
|                                    | 所属    | 金沢大学がん進展制御研究所                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /          | /          |
|                                    | 職名・氏名 | 准教授・中山 瑞穂                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |            |
|                                    | 所属    | 金沢大学がん進展制御研究所                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | /          | /          |
|                                    | 職名・氏名 | 大学院生・森田 敦也                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |            | ○          |
| 受け入れ教員                             | 職名・氏名 | 教授・園下 将大                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |            |            |
| 概要<br>(100～150 字程度)                |       | 大腸がんドライバー遺伝子変異の蓄積により、転移性を獲得したマウス腸管腫瘍由来オルガノイドの AKTP 株を用いて、悪性化形質の多様性について解析した。その結果、遺伝子変異を維持しながら転移性を失った細胞集団が一定頻度で出現し、生体内と類似した微小環境の培養条件下ではネガティブ選択により排除されていることを明らかにし、がん進化機構の理解に貢献する知見を得た。                                                                                                                                                                     |            |            |
| 研究目的<br>(300 字程度)                  |       | 転移・再発をとまなう大腸がん患者の 5 年生存率は 15%以下と低く、転移がんに対する治療薬開発は大腸がんの克服に重要である。これまでに、大腸がん細胞の転移メカニズムの理解を目的として、大腸がんの発生と悪性化に重要な 4 種類のドライバー遺伝子、Apc、Kras、Tgfr2、Trp53 の変異を蓄積した、マウス腸管腫瘍由来オルガノイド、AKTP を樹立し、さらに AKTP 細胞の脾臓移植により、肝転移巣形成モデルを作製した。最近の研究では、がん組織内の悪性化形質には多様性があり、それががん組織の進化過程に関与する可能性が示唆されている。以上の背景を基に、本研究では AKTP 細胞集団内の悪性化形質の多様性と進化過程について、肝転移モデルを用いて検証することを目的として実施した。 |            |            |
| 研究内容・成果<br>(1000 字程度・Web 会議の回数も記載) |       | Apc、Kras、Tgfr2、Trp53 遺伝子 4 重変異マウス腸管腫瘍から樹立した AKTP 細胞は転移能を獲得した悪性線がん形質を維持している。そこで、マトリゲル中で 50 世代（約 6 ヶ月間）以上継代培養した AKTP オルガノイドを、トリプシン処理によりシングルセル化してサブクローニングし、24 個のサブクローン株を樹立した。個体レベルでの転移性を検証するため、全てのサブクローンにルシフェラーゼ発現ベクターを導入した。各サブクローンを個別にマウス脾臓に移植した結果、興味深いことに 7 系統で転移性の消失が観察された。これらのオルガノイドからゲノム DNA およびタンパク質を調製し、PCR や免疫ブロッティングを行った結果、4 種類のド                 |            |            |

ライバー遺伝子変異や変異タンパク質の発現が確認された。すなわち、遺伝子変異は悪性化の原因となるが、悪性化形質の維持には他のメカニズムが関与すると考えられた。

転移性を失ったオルガノイド細胞サブクローンは、通常の培養条件では親株や転移性を維持したサブクローンと比較して増殖率変化は見られなかったが、コラーゲンゲル上で培養すると顕著に増殖率の低下が認められた。さらに、親株オルガノイド細胞と転移性を消失したサブクローンを、それぞれ tdTomato（赤）と Venus（緑）で蛍光タンパク標識し、1:1 で混ぜて培養すると、通常の培養ディッシュ上では、14 日後まで双方の細胞の生存がかくにんされたが（下図上段）、コラーゲンゲル上では、転移性消失サブクローンは集団から排除されることを明らかにした（下図下段）。転移巣ではコラーゲン線維が沈着した微小環境が形成されることから、転移性を失った細胞集団は、転移巣ではネガティブ選択により排除されると考えられた。



転移性消失のメカニズム解明を目的として、各オルガノイドサブクローンの RNAseq 解析を行った結果、転移性を消失したサブクローンでは、Lgr5 や Myb などの正常腸管上皮幹細胞や、大腸がん幹細胞のマーカー遺伝子発現が顕著に低下しており、がん細胞の未分化性の維持機構が破綻している可能性が考えられた。がん細胞の悪性化進化過程は、ドライバ遺伝子変異により悪性化形質を獲得した細胞が選択的に増殖するポジティブ選択で説明されるが、本研究成果は、何らかの原因で悪性化形質を失った細胞集団がネガティブ選択で排除される機構も、がん進化に関与することを示している。

園下教授が令和 4 年 11 月 24 日に金沢大学がん進展制御研究所を訪問し、本研究に関して対面にて研究打ち合わせを実施した。

成果

#### 【学会報告】

参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと  
国際学会

1. Oshima M. Modeling polyclonal metastasis of colon cancer by organoids. 115<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR), (New Orleans, USA) 2022, Apr 11.
2. Oshima H, Nakayama M, and Oshima M. Preclinical model of cholangiocarcinoma by cooperation of oncogenic activation and COX-2/PGE<sub>2</sub>-associated inflammation. 7th JCA-AACR Special Joint Conference, (京都) 2022 July 9-10.
3. Oshima M. Polyclonal metastasis of genetically and phenotypically distinct intestinal tumor organoids. 12<sup>th</sup> AACR-JCA Joint Conference, (Lahaina, Maui, USA) 2022 Dec 12.

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>国内学会</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 大島正伸. 個体モデルの観察による大腸がん悪性化過程の解析, 令和3年度 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会, (琵琶湖ホテル, 大津)2022年2月2日.</li> <li>2. 大島正伸. 大腸がんのポリクローナル転移と線維性微小環境, 第46回日本リンパ学会総会, (東京医科歯科大学, 東京)2022年6月4日.</li> <li>3. 大島正伸. 消化器がんの発生と悪性化における宿主反応-マウスモデルからの知見-, 第26回日本がん分子標的治療学会学術総会 (石川県立音楽堂, 金沢)2022年6月29日.</li> <li>4. 中山瑞穂. 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-, 第31回日本がん転移学会学術総会 (京都大学, 京都)2022年7月8日.</li> <li>5. 大島正伸. 消化器がんの発生・悪性化における炎症反応, 第124回北海道癌談話会シンポジウム(オンライン)2022年8月6日</li> <li>6. <u>Oshima H</u>, <u>Nakayama M</u>, Terakado Y, <u>Oshima M</u>. Wnt signaling-dependent malignant progression of gastric cancer. (口演)第81回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜), 2022年9月29日.</li> <li>7. <u>Oshima M</u>, Wng D, <u>Nakayama M</u>, <u>Oshima H</u>. Modeling development and malignant progression of intestinal tumors in mice. (口演)第81回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜), 2022年9月29日.</li> <li>8. <u>Nakayama M</u>, <u>Oshima H</u>, <u>Oshima M</u>. The mechanisms of Wnt hyperactivation in intestinal tumor cells that carry gain-of-function p53 mutation. (口演)第81回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜), 2022年9月30日.</li> <li>9. <u>Morita A</u>, <u>Nakayama M</u>, <u>Oshima H</u>, <u>Oshima M</u>. Heterogeneity of liver metastatic ability in the same driver gene mutations of colorectal cancer. (ポスター)第81回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜), 2022年10月1日.</li> <li>10. 大島正伸. マウスモデルから見る消化器がんの発生と悪性化, 第35回発癌病理研究会 (NASPA ニューオータニ, 新潟), 2022年11月28日.</li> </ol> <p>【論文発表】</p> <p>著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF入力のこと</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Morita A, Nakayama M, Wang D, Murakami K, Oshima M. Frequent loss of metastatic ability in subclones of <i>Apc</i>, <i>Kras</i>, <i>Tgfbr2</i> and <i>Trp53</i> mutant intestinal tumor organoids. <b>Cancer Sci</b>, 114: 1437-1450, 2023. IF=6.5</li> <li>2. 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. Characterization of <i>RNF43</i> frameshift mutations that drive Wnt ligand- and R-spondin-dependent colon cancer. <b>J Pathol</b>, 257: 39-52, 2022. IF=9.8</li> </ol> <p>【新聞報道】</p> <p>北国新聞 令和5年1月18日「転移しないがん確認」</p> |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|