

1. がん進展における炎症シグナルネットワークの網羅解析

北海道大学 医学研究院 教授 谷口 浩二

概要

慢性炎症が多くのがんの浸潤・転移の一因となっていることが知られているが、その詳しいメカニズムは未だ不明である。抗腫瘍免疫を人工的に制御するためには、がん微小環境における慢性炎症を調節する分子と細胞種を明らかにすることが重要である。今回の研究では、がんのドライバー遺伝子変異と炎症再生シグナル経路の活性化が、がん細胞によって産生されるサイトカイン・ケモカイン、増殖因子の産生をどのように制御するか、またこれらの分子ががん微小環境における慢性炎症と抗腫瘍免疫にどのように影響するかをオルガノイド培養法、CRISPR/Cas9 システム、網羅解析などの新規技術を駆使して検討した。そのために、大腸がんの多段階発がん仮説に重要ながん遺伝子とがん抑制遺伝子を変異させた遺伝子改変オルガノイドを樹立した。さらにこれらのオルガノイドを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子変異により発現が増減する遺伝子（サイトカイン、ケモカインを含む）を複数同定した。現在、それらの遺伝子に関して更なる詳細な解析を行なっている。今回の研究が将来の新しいがん治療法の開発に繋がることが期待される。

背景および目的

慢性炎症が多くのがんの発生のみならず浸潤・転移に寄与している事が知られているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である¹⁾³⁾。がん微小環境の慢性炎症や免疫を人工的にコントロールして免疫ががんを排除できる方法の開発や化学療法の治療成績向上には、がんの進展や治療抵抗性における炎症・免疫ネットワークの全貌とそれを調節する分子群や細胞種の解明が重要である。今回の研究開発においては、「腫瘍惹起性炎症」、つまり大腸がん細胞自身のドライバー遺伝子変化（大腸がんの進展に伴う変異の蓄積）や炎症再生シグナルがどのようにがん細胞からのサイトカイン・ケモカイン・増殖因子や免疫に影響する代謝産物の産生増加や低下を誘導してがん微小環境の慢性炎症やがん免疫（炎症・免疫ネットワーク）に影響しているかを、新規技術であるオルガノイド培養と CRISPR/Cas9 システム、網羅解析を駆使して明らかにすることを目的として研究を行った。

これまでの成果

腸オルガノイド培養

腸オルガノイドを用いた解析:野生型 C57BL/6 マウスから腸オルガノイドを樹立した。腸オルガノイドの樹立は佐藤らの樹立方法(Sato T et al, Nature 2009)にしたがい、野生型 C57BL/6 マウスの腸を PBS で洗浄後、EDTA 処理にてクリプトを単離し、クリプトをカウントした後にマトリゲル内に埋め、Rspo1, Noggin, EGF, B27, N2 などを含む培地で培養した。今回の研究ではまず大腸がんの多段階発がん仮説で重要とされているがん遺伝子(KRas)とがん抑制遺伝子(APC, p53, Smad4)の遺伝子改変を行った腸オルガノイドを作製した。遺伝子改変のために、レンチウイルスと CRISPR/Cas9 システムにてゲノム編集を行うか、ノックアウトマウスの腸から腸オルガノイドを樹立した。

腸オルガノイドの遺伝子発現解析

上記の方法で樹立した遺伝子改変腸オルガノイドの transcriptome 解析 (RNA-seq) を行い、その遺伝子発現を比較した。腸オルガノイドからの total RNA を RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社) を用いて、プロトコールにしたがって抽出を行った。RNA 濃度を測定後、その RNA の発現解析 (RNAseq) を先進ゲノム支援 (先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム) の支援を受けて行った。シーケンスで得られたデータをエイトコーポレーション社に提出して、更なる詳細な解析を行った。リアルタイム PCR は CFX96 リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad 社) を使用し、タンパク質レベルでのサイトカイン・ケモカインの発現解析は Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Kit (R&D 社) を用いて行った。

APC^{flox/flox} マウスから腸オルガノイドを樹立し、アデノウイルス Cre を感染・発現させ、APC の欠損を誘導した。さらにそのオルガノイドに KRas の活性型 KRas^{G12V} 発現による Ras 経路活性化を誘導した。その後、p53 欠損、Smad4 欠損を誘導し、機能的スクリーニングを行い、p53 欠損細胞と Smad4 欠損オルガノイドを単離した。このように遺伝子変異を加えた腸オルガノイドは遺伝子変異に伴い、増殖スピードの促進や形態の変化を認めた。特に野生型からがん抑制遺伝子 APC を欠損させることで、budding していた腸オルガノイドが球状の形態を示すという大きな変化を認め、増殖スピードも促進した。

樹立した遺伝子改変腸オルガノイドの transcriptome 解析 (RNA-seq) を行って比較し、それぞれの遺伝子変異がどのようにサイトカイン、ケモカイン、増殖因子などの発現上昇や低下に寄与するかを検討した。それぞれの遺伝子変異により多くの遺伝子に発現の変化が認められたが、特に heatmap に示すように野生型から APC を欠損させることでサイトカイン、ケモカイン、増殖因子を含む多くの遺伝子の発現が変化した。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 解析を行ったところ、APC 欠損により、Pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, Cytokine-cytokine receptor interaction, Hippo signaling pathway, Focal adhesion などに大きな変化が認められた。RNAseq で得られたサイトカイン、ケモカインの発現変化を違う手法で確認するために、リアルタイム PCR とサイトカイン・ケモカインアレイでの解析を行ったところ、RNAseq と同様の結果が得られ、RNAseq の結果の信頼性が確認を確認することができた。

今後の展望および課題

今回の研究で今後の研究に使用できる遺伝子改変オルガノイドとその遺伝子発現解析結果を得る事に成功した。特に APC 欠損で影響されるシグナル経路に Hippo signaling pathway が入っていた事は、以前の我々の研究結果と一致する^{4),5)}。今後はこれらのオルガノイド実験系に我々が同定した炎症再生シグナルの活性型変異や欠損のデータを追加する事で、慢性炎症がどのようなメカニズムでどのようなサイトカインとケモカインの発現変化を誘導するか、さらにその発現調節機構やサイトカインによるオートクラインシグナルの役割を明らかにして、マウス実験やヒト検体での重要性の検討も含めて研究を展開していく予定である。

(完)

発表論文

- 1) Taniguchi K, Todoric J, Umemura A, Karin M: Inflammation and Cancer, Holland-Frei Cancer Medicine, 10th Edition 2023
- 2) Ishikawa K, Sugimoto S, Oda M, Fujii M, Takahashi S, Ohta Y, Takano A, Ishimaru K, Matano M, Yoshida K, Hanyu H, Toshimitsu K, Sawada K, Shimokawa M, Saito M, Kawasaki K, Ishii R, Taniguchi K, Imamura T, Kanai T, Sato T. Identification of Quiescent LGR5+ Stem Cells in the Human Colon. 163(5):1391-1406 Gastroenterology. 2022
- 3) Hibino S, Kawazoe T, Kasahara H, Itoh S, Ishimoto T, Sakata-Yanagimoto M, Taniguchi K* Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis Int J Mol Sci. 21;22(11):5421. 2021

- 4) Kawazoe T, Saeki H, Oki E, Oda Y, Maehara Y, Mori, M, Taniguchi K*. Autocrine leukemia inhibitory factor promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via Src family kinase-dependent Yes-associated protein activation. *Mol Cancer Res.* 18(12):1876-1888. 2020

引用文献

- 1) Taniguchi K, Todoric J, Umemura A, Karin M: *Inflammation and Cancer, Holland-Frei Cancer Medicine, 10th Edition 2023*
- 2) Hibino S, Kawazoe T, Kasahara H, Itoh S, Ishimoto T, Sakata-Yanagimoto M, Taniguchi K* Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis *Int J Mol Sci.* 21;22(11):5421. 2021
- 3) Taniguchi K*, Karin M*. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol.* 18(5):309-324. 2018
- 4) Taniguchi K, Moroishi T, de Jong PR, Krawczyk M, Grebbin BM, Luo H, Xu RH, Golob-Schwarzl N, Schweiger C, Wang K, Di Caro G, Feng Y, Fearon ER, Raz E, Kenner L, Farin HF, Guan KL, Haybaeck J, Datz C, Zhang K, Karin M. YAP-IL-6ST autoregulatory loop activated on APC loss controls colonic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;114(7):1643-1648. 2017
- 5) Taniguchi K, Wu LW, Grivennikov SI, de Jong PR, Lian I, Yu FX, Wang K, Ho SB, Boland BS, Chang JT, Sandborn WJ, Hardiman G, Raz E, Maehara Y, Yoshimura A, Zucman-Rossi J, Guan KL, Karin M. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature.* 5;519(7541):57-62. 2015