

**医学奨励賞 2019 – がん領域 –**
**研究成果報告書（追加助成）＜概要＞**

<b>所 属</b>	国立がん研究センター研究所
<b>氏 名</b>	武田 はるな
<b>研究テーマ</b>	大腸がんの転移に関与する遺伝子の同定

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。  
(図表、写真などの貼付を含む)

**研究目的：**SB トランスポゾンを利用したマウス生体内スクリーニングにより、大腸がん転移に関連する遺伝子を同定し転移の分子メカニズムを明らかにする。

**研究手法・成果：**＜**転移モデル作成**＞SB トランスポゾンを持つ T2/Onc2 トランスジェニックマウスと SB トランスポゾン転移酵素を発現するノックインマウス、消化管上皮特異的に Cre 組み換え酵素を発現する Villin-CreERT2 トランスジェニックマウス、Kras 活性化型点変異を発現するノックインマウス、Apc のノックアウトマウスを掛け合わせ、複合変異マウス(AK-SB マウス)を得た。タモキシフェン投与により Cre 組み換え酵素を活性化させ SB トランスポゾン挿入変異を大腸上皮細胞で誘発させた。AK-SB マウスに形成される大腸腫瘍よりオルガノイドを樹立し、EGF, Noggin, Rspo1 非存在下で培養することで、増殖因子非依存的増殖能を獲得したオルガノイドを樹立し、これを 66 匹の免疫不全マウスの盲腸へ同所移植し転移モデルを作成した。移植後 3-6 ヶ月経過したマウスを解剖したところ、44 匹(66.7%)のマウスが盲腸腫瘍のみを形成しており、5 匹(7.6%)のマウスが、盲腸腫瘍と転移がんの両方を形成した。転移がんは肝臓と腹腔内に形成されていた。

＜**責任遺伝子の決定**＞腫瘍形成に関与する遺伝子および転移に関連する遺伝子を同定するために、SB トランスポゾン挿入部位を決定した。原発腫瘍 38 個、肝転移がん 21 個、腹膜播種 31 個、これらに加えて移植前のオルガノイドサンプル 41 個からゲノムを抽出した。次に、トランスポゾン挿入部位をクローニングするために、以前の報告に従ってリンカーライゲーションを介した PCR を行った。これら PCR 産物を次世代シーケンサーで解読し、マウスゲノム上にトランスポゾン挿入部位をマッピングした。その後、統計学的手法によりトランスポゾンが高頻度に挿入されている部位を決定し、近傍の遺伝子を責任遺伝子として同定した。これら解析を行うための情報解析パイプラインは、国立がん研究センター研究所ゲノム解析基盤開発分野との共同研究で開発した。この解析により、原発腫瘍から 640 個、肝転移腫瘍から 76 個、腹膜播種から 178 個の責任遺伝子を同定した。また、移植前のオルガノイドから増殖に関わると考えられる遺伝子 91 個を同定した。原発腫瘍から同定された 640 個の遺伝子を、ヒト大腸がんに変異のある遺伝子のデータセットと比較すると、マウス腫瘍とヒト腫瘍で共通して変異の認められる遺伝子の数は統計的に有意であったことより、SB トランスポゾン挿入変異を誘発させて作成した本研究のマウスモデルは、ヒトの大腸がんをモデルしていることが示された。

＜**候補遺伝子の機能検証**＞同定した候補遺伝子のがん化能を実証するために、いくつかの遺伝子に対して検証実験を行なった。今回は転移に関与する遺伝子に特に着目するために、原発腫瘍と肝転移腫瘍から共通して同定されてきた遺伝子に着目した。さらに、ヒト大腸がんのデータベースに蓄積されている変異情報等を参考に、ヒトのがんでも脱制御されている遺伝子 3 つを抽出した。がん化能検証実験は、以前の研究で確立した方法 (Takeda et al., PNAS, 2019)に従った。検証実験より、この 3 つの遺伝子は大腸で腫瘍抑制遺伝子として機能することを示した。今後、同定した遺伝子の機能検証・機能解析をさらに進め、大腸がん転移の分子機構解明に結びつけていきたいと考えている。

## 医学奨励賞 2019 –がん領域–

## 研究成果報告書（追加助成）＜発表実績/予定一覧＞

所 属	国立がん研究センター研究所
氏 名	武田 はるな

## 1. 論文発表実績

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- 国内外雑誌を問わない。
- 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

## ① &lt;論文 PDF 添付あり&gt;

1	<u>Haruna Takeda</u> *, Nancy A. Jenkins and Neal G. Copeland. Identification of cancer driver genes using <i>Sleeping Beauty</i> transposon mutagenesis. (2021) <i>Cancer Science</i> <b>112</b> (6):2089-2096
2	<u>Haruna Takeda</u> *. A platform for validating colorectal cancer driver genes using mouse organoids. (2021) <i>Frontiers in Genetics</i> <b>12</b> :698771-,
3	Kazuhiro Murakami, Yumi Terakado, Kikue Saito, Yoshie Jomen, <u>Haruna Takeda</u> , Masanobu Oshima, Nick Barker. A genome-scale CRISPR screen reveals factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> <b>118</b> (4) (2021)
4	

## ② &lt;論文 PDF 添付なし&gt;

1	
2	
3	

様式 4-3②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>● アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>● 国内外を問わない。</li> <li>● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2021年9月30日	武田はるな 第80回日本癌学会学術総会 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
2	2021年7月6日	Haruna Takeda, The 39 <sup>th</sup> Sapporo International Cancer Symposium, Royton Sapporo, Sapporo, Hokkaido, Japan. "Identification of colorectal cancer driver genes by Sleeping Beauty mutagenesis".
3		
4		
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		