

126. *p53*破綻と炎症の連動は、発がんの起点となる

伊達 悠貴

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子硬組織生物学

Key words : 骨肉腫, 炎症, *p53*, *Myc*, TGF β

緒言

組織傷害をもたらす炎症は、組織幹細胞を活性化して創傷治癒をもたらす。炎症後の異常な組織修復は、無秩序な細胞増殖である「がん化」につながるが、詳細な分子機序はわかっていない。がん抑制遺伝子 *p53* の遺伝子異常と、がん遺伝子 *Myc* の過剰発現は、発がんの起因となる代表的なゲノム・エピゲノム異常である。本研究では、遺伝子異常が炎症の転帰を発がんに向かわせると考え、「*p53*破綻と炎症が連動することで発がんにいたる機序」を解明する。

私たちはこれまで、これらの異常が発がんをもたらす機序について、*p53*破綻性の骨肉腫モデルマウス（通称 OS マウス）を用いて解析してきた。OS マウス (Ox-Cre;*p53*^{fl/fl}) は、*p53*破綻のみで発がんを誘導でき、その責任がん遺伝子が *Myc* であることがわかっている [1, 2]。すなわち同マウスは、*p53*破綻（発がんの起点）と *Myc* 過剰発現（発がんの終点）が炎症によって媒介されることを検証するのに適したモデルといえる。

骨肉腫の発症ピークは、OS マウスは中年期であり、ヒト患者の青年期に比べて遅い。骨リモデリングの実質は、運動という機械刺激によって惹起される微弱な慢性炎症である。したがって、OS マウスが発がんするまでの長い潜伏期間の原因として、通常の飼育環境における極端な運動不足を考えた。そこで、「OS マウスに過運動を課すと、骨髄微小環境において炎症が亢進することで発がんが早まる」という仮説を立てた。OS マウスに過運動を課したところ、発がんが早まって短命化する傾向が得られている。

骨肉腫発症を促す炎症刺激としては、TGF β を特定した。一般的に同サイトカインは、良性腫瘍においてはがん抑制的に働くが、骨肉腫を含む悪性腫瘍においてはがん促進的に働くと考えられる。OS 細胞において *Myc* の発現は TGF β に依存した。OS マウスに過運動を課すと、血清 TGF β 量が増加した。OS マウスから TGF β シグナルを包括的に減弱させると、延命効果が得られている。

TGF β が *Myc* の過剰発現を誘導するゲノム上の作用点として、*Myc* 下流 340 kb エンハンサ「m340」を特定した。TGF β は、Runx 転写因子と相互作用することで m340 に結合し、m340 と *Myc* プロモータの近接させることで、*Myc* を過剰に誘導していた。

以上より、骨肉腫の発症機序が、*p53*破綻と、TGF β を主体とする炎症刺激の連動であることが示唆された。同様の発がん機序は、他の *p53*破綻性のがん種においても通底している可能性がある。

方法および結果

1. OS マウスの骨肉腫発症は炎症刺激が律速する

6~8 か月齢の OS マウスに対して、トレッドミル (TMS-6N、メルクエスト社製) を用いて 1 km 以上 (10~20 m/分の速度で 1~2 時間) の強制走行を週に 5 日課した。その結果、発がんが早まって短命化する傾向が得られた。これは、*p53*破綻と炎症刺激が連動することで、発がんが加速することを示している。運動負荷実験は、①運動期間が長期 (数か月) であること、②同時に走らせられるマウスの数が限られていること、③常にマウスの側に実験者が常駐していなくてはならないこと、といった理由から非常に手間がかかった。また、マウ

スに想定外の影響を与えないよう、実験条件（走行スピード、傾斜、電気刺激の強さ）の最適化に1年ほどの時間がかかった。過運動による発がん促進の傾向は得られたものの、統計学的優位差を得るには追加検証の必要性を残した。

2. TGFβは骨肉腫発症を促す炎症刺激である

OS マウスに強制運動を課すと、血清 TGFβ 量が増加した（図 1a）。また、ヒト・マウスの骨肉腫検体を用いた RNA-seq のデータ [1] を再解析したところ、骨肉腫検体においては TGFβ の発現量が高いことが判明した（図 1b）。そこで、TGFβ シグナルを包括的に欠損させるため、*Tgfr2flox* マウスを導入した（Jackson Laboratory #012603）。OS マウスに比べ、OS;*Tgfr2flox*/+マウスは延命傾向が確認できた。OS マウスは骨肉腫発症まで1年ほどの時間がかかり、発がんの抑制効果を検証するには、さらに長い観察期間が必要になる。統計的優位差を得るには、個体数を追加して検証を重ねる必要が示された。なお、TGFβ シグナルを両アレル性に削除した OS;*Tgfr2flox*/fl マウスは、腫瘍以外の原因で早期に死亡してしまうため、同マウスは解析から外した。

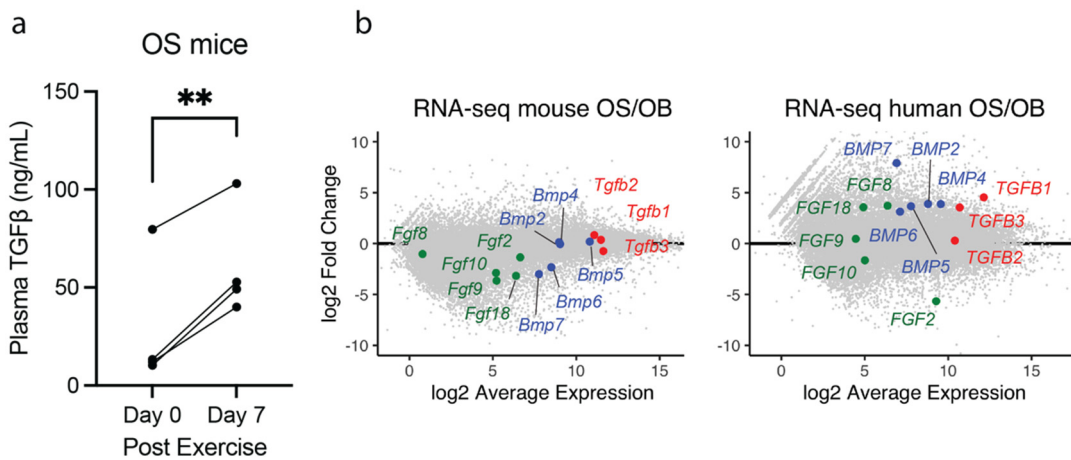


図 1. 骨肉腫における TGFβ の発現

- OS マウス (*Osx-Cre;p53fl/fl*) に7日間の過運動を課し、血清 TGFβ 量を計測した。t 検定により統計処理した (** $P < 0.01$)。
- RNA-seq 解析によって、OS マウスおよびヒト骨肉腫の検体のトランスクリプトームを、それぞれの正常骨芽細胞 (OB) と比較した。

3. TGFβシグナルは m340 を介して Myc 過剰発現を誘導する

OS 細胞を用いて、クロマチン免疫沈降と次世代シーケンシングを組み合わせた ChIP-seq 実験を行った。*Myc* 遺伝子近傍における TGFβ 反応性エレメントを網羅的に探索したところ、*Myc* 下流 340 kb エンハンサ「m340」が特定できた（図 2a）。m340 には、TGFβ シグナルのエフェクタ因子である Smad2/3 に加え、既知の相互作用因子である Runx3 および JunB 転写因子の結合も確認された（図 2a）。共免疫沈降 (Co-IP) 実験によって、Smad2/3、Runx3、JunB が実際に相互作用することがわかった（図 2b）。CRISPRi 技術を用い、OS 細胞のゲノム上で m340 を特異的に KRAB で阻害すると、*Myc* の発現量が減少した（図 2c）。また、骨髄間質細胞株の ST2 から *p53* を削除して TGFβ を作用させると *Myc* の発現量が上昇するが、このとき、*Myc* プロモータと m340 が近接することが確認できた。以上より、TGFβ 刺激下において、Smad とその協調因子 (Runx3/JunB) が m340 に結合し、*Myc* の過剰発現を誘導していることが示された。

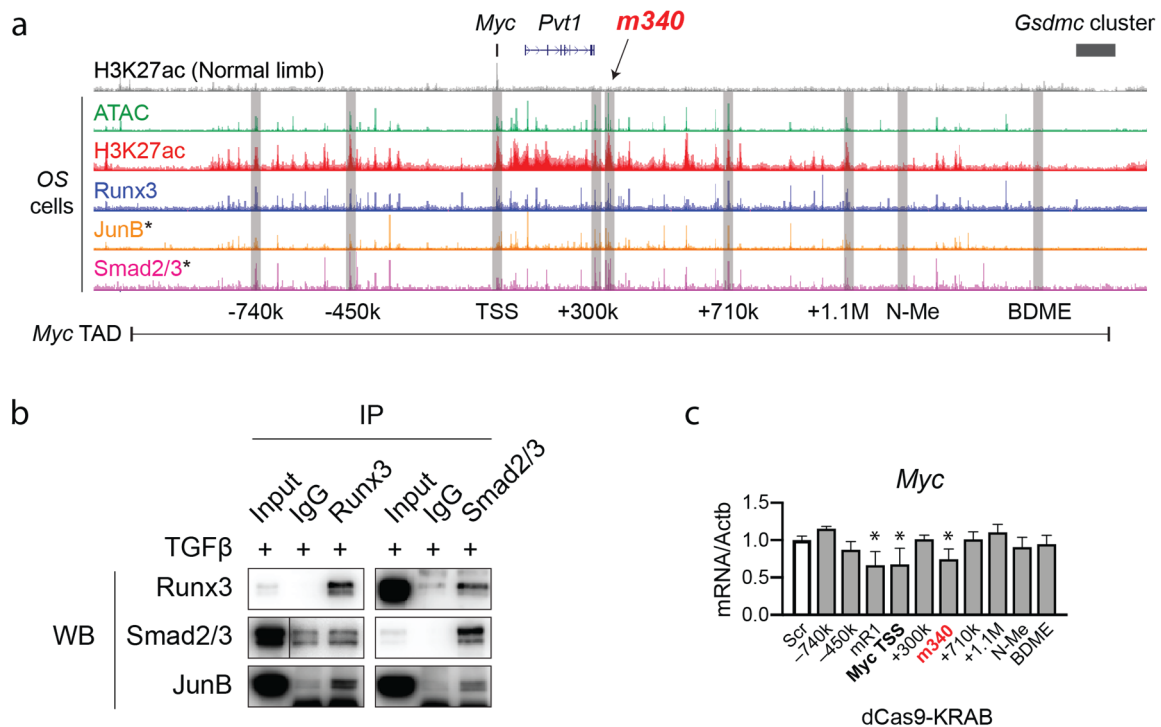


図 2. m340 は骨肉腫発症における発がんエンハンサである

- a) OS 細胞における、ChIP-seq および ATAC-seq のプロファイルを *Myc* 遺伝子の遺伝子調節領域 (TAD) において表示した。JunB および Smad2/3 においては、TGFβ で刺激した。陰性対照として、正常四肢の H3K27ac プロファイルを併記した。
- b) OS 細胞を 24 時間 TGFβ 刺激し、共免疫沈降 (Co-IP) を行った。
- c) OS 細胞において、Myc エンハンサ候補 (図 2a にて灰色でハイライト) をゲノム上で特異的に阻害し、mRNA 発現量の変化を調べた。陽性対象として、*Myc* 転写開始点 (TSS) を標的とした。1-way ANOVA の後、陰性対照を Scr とした Dunnett 検定によって統計処理した (*P<0.05)。

考 察

本研究では OS マウスにおいて、*p53* 破綻と炎症刺激 (過運動) が連動することで、*Myc* 過剰発現が誘導されることを生体レベルで示した。また、骨肉腫発症を助長する炎症刺激の正体として、TGFβ が示された。*p53* 破綻下において、TGFβ が *Myc* を過剰誘導していた。TGFβ の発がん促進作用を生体レベルで検討するためには、OS マウスから TGFβ シグナルを抑制した OS;*Tgfb2fl*/+ マウスにおいては、過運動を課しても発がんが早まらないことを示す必要がある (現在検証中)。

m340 が、がん特異的なエンハンサであることを証明するには、m340 を特異的に破壊した OS:m340Δ マウスの観察が不可欠である (現在進行中)。しかしながら、*Myc* 遺伝子は多くのエンハンサを持つため、m340 の 1 エンハンサだけを抗がん標的としても、いずれは他のエンハンサによって *Myc* 発現が再確立されてしまう可能性がある。また、DNA 配列を標的とする薬剤は、その合成の難しさから、実用化は簡単ではない。したがって、m340 を利用した抗がん戦略としては、診断基準としては有用かもしれないが、治療への応用は現状では難しいと考えられる。そこで、TGFβ が抗がん標的となることを示すため、OS マウスに TGFβ 阻害剤を投与する実験を今後行う予定である。

共同研究者・謝辞

本研究は、長崎大学大学院医師薬学総合研究科分子硬組織生物学講座の伊藤公成教授、上野智也大学院生の協力のもと実施された。

文献

- 1) Otani S, Date Y, Ueno T, Ito T, Kajikawa S, Omori K, Taniuchi I, Umeda M, Komori T, Toguchida J, Ito K. Runx3 is required for oncogenic Myc upregulation in p53-deficient osteosarcoma. *Oncogene*. 2022 Jan;41(5):683-691. doi: 10.1038/s41388-021-02120-w. Epub 2021 Nov 22. PMID: 34803166.
- 2) Date Y, Ito K. Oncogenic RUNX3: A Link between p53 Deficiency and MYC Dysregulation. *Mol Cells*. 2020 Feb 29;43(2):176-181. doi: 10.14348/molcells.2019.0285. PMID: 31991537; PMCID: PMC7057839.