

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14392

研究課題名(和文)大腸で再現性よく腫瘍を発生するマウスモデルの作出

研究課題名(英文) Generation of a genetically engineered mouse model that reproducibly develops tumors in the large intestine

研究代表者

小島 康 (Kojima, Yasushi)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号：30464217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在、使用されている「大腸がんマウスモデル」は、小腸病変が大部分で、大腸病変は僅かしか発生しないという大きな問題点が存在する。本研究では、この問題を解決するため、大腸に再現性よく腫瘍を発生するマウスモデルの作出を目指した。公共データベースのレイデータなどを組み合わせて解析して、大腸上皮幹細胞で高発現している可能性がある27個の遺伝子を絞り込んだ。リアルタイムPCRの結果や文献的検討なども加え、特にAqp4に注目して、Aqp4プロモーター下流にタモキシフェン誘導クレリコンビナーゼを導入したトランスジェニックマウスの作出を開始した。現在、その遺伝子改変を進めている。

研究成果の概要(英文)：Genetically engineered mouse models (GEMMs) are widely used to elucidate colon cancer development. However, these murine models have a serious drawback: they develop tumors mainly in the small intestine, and the tumor incidence in the large intestine is very low and poorly reproducible. Here we tried to generate a new GEMM that develop tumors in the colon exclusively and reproducibly. Data analysis of DNA microarrays and real-time PCR suggest that Aqp4 is highly expressed in the colon stem cell compartment. We have started to create a transgenic mouse with tamoxifen-inducible Cre recombinase expression driven by the Aqp4 gene promoter activity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本では1日あたり100人以上の大腸がん患者が死亡している。進行大腸がんは、既存の古典的な化学療法薬に抵抗性を示し、治療困難となることが多い。新機軸の大腸がん治療薬の開発が盛んに行われ、さまざまな「大腸がんマウスモデル」がその開発に重要な役割を果たしてきた。しかしながら、使用されている「大腸がんマウスモデル」は、小腸病変が大部分で、大腸病変は僅かしか発生しないという大きな問題点が存在する。実際のところ、「大腸がんマウスモデル」を用いて得られる知見は、大腸ではなくて、小腸に発生する腫瘍のデータに大きく依存している。

これまで主に3つの研究グループが、小腸ではなく大腸で再現性よく腫瘍を形成するマウスモデルの作出を試みてきた (Johnson, R.L. & Fleet, J.C., 2013, Cancer Metastasis Rev; Hung, K.E. et al., 2010, PNAS)。しかしながら、いずれも問題を有している。Cdx2 プロモーターの下流に DNA 組み換え酵素 Cre を挿入したモデルでは、分化腸管細胞マーカーである Cdx2 を使用することが疑問視されている。一方、Car1 プロモーターを利用したモデルでは、腫瘍の発生頻度が極めて低い。経肛門的にアデノウイルスを感染させる実験系も報告されているが、鉗子による大腸クランプを伴う侵襲的な処置を要する点、アデノウイルスによる炎症の影響などの問題がある。我々も、これまで4系統の「大腸がんマウスモデル」を解析したが、大腸に再現性よく腫瘍を発生させることは、非常に困難であった。

### 2. 研究の目的

最初の自然発症大腸がんマウスモデルが報告されてから、25年近くが経過する。これまでに、いろいろな「大腸がんマウスモデル」が作出され、ヒト大腸がんの病態解明や創薬に大きな貢献を果たしてきた。しかしながら、現在使用されている「大腸がんマウスモデル」は、病変の大部分が小腸で発生して、大腸にはごく少数の病変しか発生しないという重大な問題を抱えている。いまだ大腸で再現性よく腫瘍を発生させるマウスモデルは、開発されていない。そのため多くの研究者が、代替手段として、専ら小腸腫瘍の解析を行っている。本研究計画は、この現状の打破を目指した。

### 3. 研究の方法

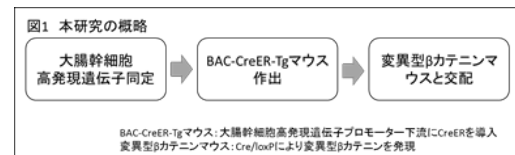
本研究計画では、以下の3つの具体的な目標を設定した。

- (1) 小腸上皮幹細胞と比較して、大腸上皮幹細胞で高発現している遺伝子を同定する。
- (2) (1) で同定した有望なマーカー遺伝子のプロモーター下流にタモキシフェン Cre

を導入したトランスジェニックマウスを作出する。

- (3) (2) で作出したトランスジェニックマウスと変異型 カテニン発現マウス Ctnnb1lox(ex3) と交配させて大腸で再現性よく腫瘍を発生する「大腸がんマウスモデル」の作出を試みる。

まず大腸上皮の幹細胞で高発現しているマーカー遺伝子を同定する(図1)。次に同定したマーカー遺伝子プロモーターの下流にタモキシフェン誘導型クレリコンピナーゼ (CreER) を導入したトランスジェニックマウス (BAC-CreER-Tg) を作出する。作出したトランスジェニックマウスを変異型 カテニン発現マウス Ctnnb1lox(ex3) と交配させて大腸特異的に再現性よく腫瘍を発生するマウスモデルの作出を試みる (Harada, N., et al., 1999, EMBO J. )。



### 4. 研究成果

本研究計画では、小腸と大腸の幹細胞の差異に着目した。「研究開始当初の背景」にて述べた Car1 プロモーターを利用したモデルでは、大腸組織全体で高発現している遺伝子群の中から Car1 が選択された。本研究計画では、大腸の幹細胞で高発現している遺伝子に焦点を当てた。

小腸と大腸は、連続した管腔臓器であるが、小腸と大腸には明確な差異が存在する。小腸には、多数の絨毛が認められるが、大腸には絨毛は認められない。小腸には幹細胞の維持に重要とされるパネート細胞が存在するが、大腸にパネート細胞は存在しない。生理的機能や管腔に存在する常在細菌の量や種類に関しても大きな差異が存在する。ヒトでは小腸の腫瘍は極めて稀であるが、大腸がんは大変多い。クローン病は小腸に好発して、潰瘍性大腸炎は大腸に発症する。解剖学的、生理的、病理学的観点から、小腸と大腸には明確な差異、区分が存在する。そしてこれらの差異の源泉の一つとして、小腸と大腸の幹細胞の差異が挙げられる。

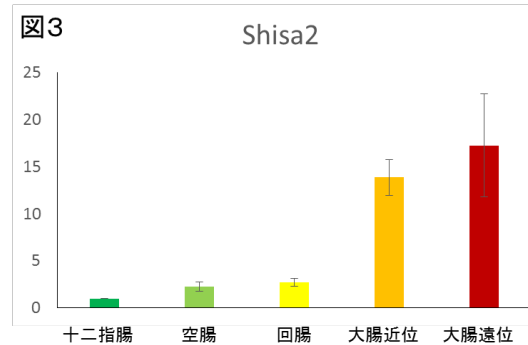
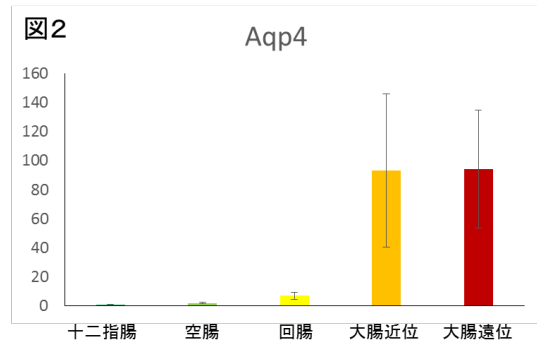
我々が、「大腸がんマウスモデル」の Apc 変異マウスに関して、小腸腫瘍と大腸腫瘍の DNA アレイ解析をして、高発現遺伝子の上位 500 個を比較検討したところ、240 個は一致していたが、260 個の遺伝子は一致しなかった (未発表データ)。腸管では、腫瘍は幹細胞、あるいは一時的増幅細胞から発生している可能性が高いので、小腸腫瘍と大腸腫瘍のトランスクリプトームの差異は、小腸と大腸の幹細胞の差異に起因している可能性が高いと考えられた。

過去 10 年、オランダの Clevers らの研究により腸管上皮幹細胞の研究は大きな躍進を遂げた。まず Clevers らは遺伝子改変マウスの系統的な作出および解析から Wnt シグナルの腸管上皮幹細胞に果たす役割を遺伝学的に実証した。さらにヒト大腸がん細胞株の遺伝子発現解析から、腸管上皮幹細胞マーカーである *Lgr5* を同定した。また Clevers らは、腸管上皮幹細胞のスフェロイド培養系も樹立して、より詳細な解析が可能となった。Clevers らは、そして小腸 *Lgr5* 陽性細胞で高発現している 510 個の遺伝子群を抽出して、「Intestinal Stem Signature」と命名した (Munoz, J. et al., 2012, EMBO J.)。我々は、小腸上皮幹細胞と比較して、大腸上皮幹細胞で高発現している遺伝子を抽出する目的で以下の解析を行った。まず DNA マイクロアレイにより、C57BL/6N マウスの小腸と大腸の遺伝子発現差異解析を行った。結果、639 個の遺伝子が、大腸で統計学的有意に高発現していた (False Discovery Rate (FDR) <0.01)。次に大腸高発現遺伝子 639 個と Clevers らが同定した Intestinal Stem Signature の 510 個の遺伝子群を比較対照したところ、Intestinal Stem Signature に含まれる 27 個の遺伝子が、小腸より大腸で高発現している可能性が示唆された(表 1: 未発表データ)。

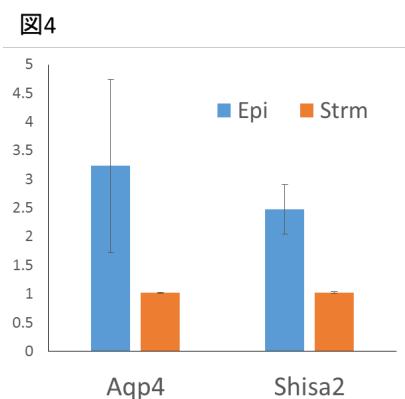
表1 27個の候補遺伝子リスト

Gene Symbol	FDR	大腸/小腸発現比
<i>Sytn</i>	0.000000	701.17
<i>Acsn3</i>	0.000000	20.86
<i>Aqp4</i>	0.000000	19.44
<i>Zfp618</i>	0.000101	8.39
<i>Acss2</i>	0.000238	6.37
<i>Mia1</i>	0.000250	6.23
<i>Cachd1</i>	0.000618	4.97
<i>Cd320</i>	0.000717	4.84
<i>Rdh16</i>	0.000790	4.70
<i>Kcne3</i>	0.000846	4.76
<i>Ehf</i>	0.000879	4.58
<i>Prkacb</i>	0.001006	4.45
<i>Shisa2</i>	0.001679	3.99
<i>Pgcp</i>	0.002215	3.69
<i>Blnk</i>	0.002885	3.55
<i>Rgnef</i>	0.004537	3.18
<i>Smo</i>	0.005926	3.40
<i>Txndc16</i>	0.006548	2.93
<i>Paics</i>	0.007010	2.89
<i>Gas6</i>	0.007400	2.87
<i>Nrtn</i>	0.007621	3.10
<i>Emp2</i>	0.007760	2.85
<i>Plekhh1</i>	0.008189	2.90
<i>Csad</i>	0.008197	2.84
<i>Pla2g4a</i>	0.009032	2.81
<i>Fam115a</i>	0.009374	2.74
<i>Irs1</i>	0.009536	2.74

文献的検討なども加えて特に、*Aqp4* と *Shisa2* に着目した。小腸および大腸組織より、RNA を抽出して cDNA を合成してリアルタイム PCR を実施した。



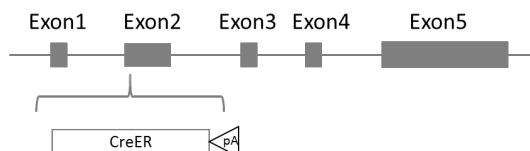
その結果(図 2 および 3)、*Aqp4* および *Shisa2* ともに大腸にて高発現を認めた。次に *Aqp4* および *Shisa2* が上皮成分にて高発現しているかどうかを確認した。レーザーマイクロダイセクションにて陰窩下部領域を中心とした上皮成分と間質成分を区分して採取して、RNA を抽出して cDNA を合成してリアルタイム PCR を実施した。その結果(図 4)、*Aqp4* および *Shisa2* ともに間質成分 (Strm) と比較して上皮成分 (Epi) で高発現を認めた。



*Aqp4* は、*Shisa2* と比較して大腸で特に高発現していたため、*Aqp4* の BAC トランスジェニックマウスの作出を選択した。一般的に BAC

トランスジェニックレポーターマウスは、100 kb ~ 200 kb サイズの大きい遺伝子調節領域を導入することができ、より生理的な時期特異的、組織特異的な遺伝子発現調節の保持が期待できる。Aqp4 の Exon2 にタモキシフェン誘導型クレリコンビナーゼを挿入した BAC トランスジーンを作製を開始して、現在、遺伝子改変作業を進めている (図 5)。

図5 Aqp4 BACトランスジーン模式図



今後、大腸特異的に CreER を発現するトランスジェニックマウスが作出された場合は、大腸で再現性良く腫瘍を発生するマウスモデル作出の基盤技術が提供されることになる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小島 康 (KOJIMA YASUSHI)  
愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学  
部・主任研究員  
研究者番号：30464217

##### (2) 研究分担者

オリム フローレンス (Orim Florence)  
愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学  
部・リサーチレジデント  
研究者番号：90750810

##### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

なし