

令和元年5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09279

研究課題名(和文)びまん性胃癌におけるRhoA遺伝子変異の役割

研究課題名(英文)Role of RhoA mutation in diffuse type gastric cancer development

研究代表者

成田 明子(Narita, Akiko)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：30772917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：びまん性胃癌にみられるRhoA遺伝子変異の役割を明らかにするために、RhoA Y42C変異を任意に誘導できる系統(LSL-RhoAY42C)を樹立し、TFF1-cre系統と交配して、胃粘膜特異的にRhoAY42Cを誘導した。24週までの検討では印環細胞癌の発生はみられなかった。また胃底腺の分化については野生型とほぼ同程度であった。一方E-cadherinのノックアウトでは一過性に印環細胞癌が発生したが、持続的な増殖はみられず扁平上皮に置換された。RhoAY42C変異の追加による表現型の悪化はなかった。これらの研究結果はRhoA遺伝子変異はびまん性胃癌のドライバー変異ではないことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良癌の代表であるびまん性胃癌の発生機序は十分に解明されていない。近年のゲノムワイドな遺伝子変異解析により、E-cadherinに加えRhoA変異が特徴的にみられることが分かったがその発癌に果たす役割は十分に解明されていなかった。本研究は世界で初めてRhoA変異をマウス胃粘膜に導入しその意義を動物モデルで検討したものである。RhoA変異単独で発癌しなかったという結果は、びまん性胃癌の進展度別遺伝子変異プロファイルにおいてRhoA変異が早期には少ないとする最近の研究結果に合致する有用な結果といえる。

研究成果の概要(英文)：To identify the role of RhoA Y42C mutation in diffuse type gastric cancer development, mouse with inducible RhoA Y42C expression was established and examined. Gastric pit cell specific RhoA Y42C expression did not generate signet ring cell carcinoma by 24 weeks. Immunohistological evaluation revealed almost identical gastric gland structures to wild type mice. Organoids derived from transgenic mice proliferated with similar proliferation speed and similar stem cell marker expression to wild type organoids. CDH1 deletion, a causative gene of familial diffuse gastric cancer, in gastric pit cell lineage, transiently generated signet ring cell carcinoma, which was eventually replaced by squamous cell. Additional RhoA Y42C mutation did not enhance signet ring cell carcinoma formation. These results demonstrated that RhoA Y42C mutation is not the driver mutation of diffuse type gastric carcinogenesis.

研究分野：消化器内科

キーワード：びまん性胃癌 印環細胞癌 遺伝子 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は現在でも罹患率も死亡率も高い悪性腫瘍である。なかでも早期に転移をきたしやすいびまん性胃癌の予後は依然として不良である。びまん性胃癌の遺伝子変異として、家族性びまん性胃癌の解析から E-cadherin 遺伝子変異が同定されていたが、近年のシーケンズ技術の発達により、国内外の複数の研究室より新たに RhoA 遺伝子の変異が報告された (Nature Genetics 2014)。

RhoA はがん遺伝子として知られる Ras のホモログとして同定された、GTP と結合し分解する酵素であるが発癌との関連はこれまでほとんど報告されていない。びまん性胃癌で同定された RhoA 遺伝子の Y42C 変異が胃癌細胞の増殖や足場非依存性の細胞生存に寄与していることが示され、びまん性胃癌のドライバー変異である可能性が示唆されているが、その発癌における役割は十分に解明されていない。E-cadherin は細胞接着や細胞骨格を制御する分子であり、マウスモデルで E-cadherin と p53 蛋白の欠失によってびまん性胃癌が発生することが明らかにされた。国際的な胃癌の網羅的遺伝子解析によって、びまん性胃癌では RhoA 遺伝子変異と E-cadherin 遺伝子変異は約 3 割で併存していることがわかっている。しかし RhoA と E-cadherin の遺伝子変異が機能的に関与しているのか、どのように発癌にかかわるのかは未解明である。

2. 研究の目的

本研究では条件誘導型変異型 RhoA 発現マウスを作成し、胃粘膜で特異的に変異を誘導し、RhoA 遺伝子変異がびまん性胃癌発生に果たす役割を検討する。さらにびまん性胃癌でしばしば併存する E-cadherin の欠失と RhoA 変異の意義についてマウスモデルで検討する。

3. 研究の方法

(1) RhoA^{Y42C} 発現マウスの作成と胃粘膜における機能解析

RhoA cDNA に変異を導入し、cre リコンビナーゼによる条件的誘導を可能にする LSL-RhoA^{Y42C} を遺伝子導入した B57BL6 マウスを作成した。Tg ラインを TFF1-cre マウスと交配し、胃粘膜特異的な発現誘導を行い、胃粘膜から抽出した蛋白のイムノプロットでトランスジーンを発現を確認し、LSL-RhoA^{Y42C} 系統を樹立した。TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} マウスから経時的に胃組織を採取し、胃粘膜の病理変化について検討し、さらに分化障害の有無について胃底腺固有細胞の免疫染色などで評価した。

(2) 三次元細胞培養モデルにおける RhoA 変異の機能解析

野生型マウスおよび TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} マウスの胃粘膜より上皮細胞を分離し、マトリゲル内で培養し、オルガノイドを作成した。これらに細胞増殖、細胞死、分化の違いがあるか免疫染色、定量的 PCR で検討した。

(3) 胃発癌における RhoA および E-cadherin の役割の解析

TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} マウスに条件的誘導性 E-cadherin ノックアウトマウス (CDH1^{fllox/fllox}) を交配し、胃粘膜特異的な変異型 RhoA 発現 + E-cadherin ノックアウトマウスを作成した。胃粘膜を経時的に摘出し、病理像および幹細胞マーカー、分化細胞マーカーの発現の変化を測定した。これらを E-cadherin 単独ノックアウトマウス (TFF1-cre; CDH1^{fllox/fllox}) との比較を行った。またマウスよりオルガノイドを作成しその腫瘍性について、ヌードマウスへの接種実験で検討した。さらに *in vitro* で作成したオルガノイドの腫瘍性も同様に検討した。またオルガノイドから RNA を抽出し、遺伝子発現についてマイクロアレイで網羅的に検討した。

(4) びまん性胃癌の臨床的検討

びまん性胃癌と腸型胃癌の発癌形式の違い、びまん性胃癌に多い幽門狭窄を伴う進行癌の治療法について臨床データと文献をもとに検討した。

4. 研究成果

(1) RhoA^{Y42C} 発現マウスの作成と胃粘膜における機能解析

トランスジーンにより 4 系統の LSL-RhoA^{Y42C} 系統を樹立した。TFF1-cre マウスと交配させ、3w 齢のマウスより胃粘膜を採取し、イムノプロットで RhoA の発現を測定し、発現の強い Line6 と中等量の発現の Line3 を樹立した。以降は発現の強い Line6 を用いて検討した。

TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} の胃粘膜を病理組織で検討した。4w 齢のマウスでコントロールである TFF1-cre マウスおよび野生型マウスに比して軽度の壁細胞の減少がみられたが、24w 齢ではほぼ正常と同様になり、分化障害は認めなかった。また印環細胞癌は 4w 齢、12w 齢、24w 齢のいずれにおいても見られなかった。トランスジーンを発現はイムノプロットで確認した (図 1)。また胃底腺の分化について検討するために免疫染色を、幹細胞マーカーの発現について検討するために Q-PCR を行った。H-KATPase 陽性細胞 (壁細胞)、GS-11 陽性細胞 (頸部粘液細胞)、ペプシノーゲン陽性細胞 (主細胞) は、数や配置についてコントロールと TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} の胃粘膜に有意差を認めなかった (図 1)。また Lgr5、Sox9、Mist1、CD44 など幹細胞マーカーの発現は軽度 LSL-RhoA^{Y42C} で増加していたが、統計学的な有意差は見られなかった (図 2)。

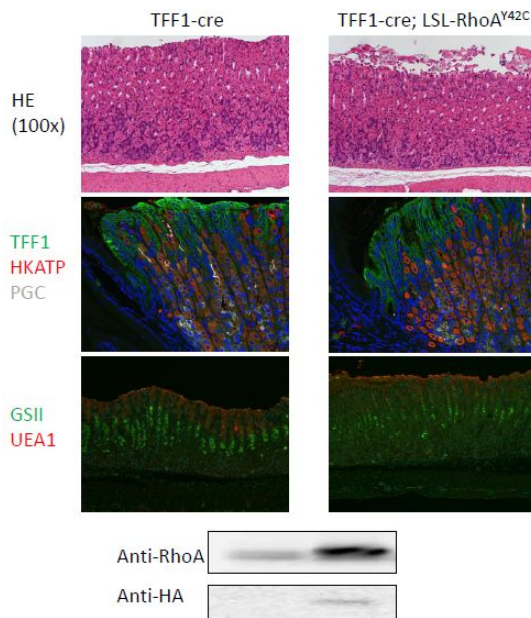


図1 TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} マウスの解析

(2) 三次元細胞培養モデルにおける RhoA 変異の機能解析

続いて *in vitro* での腺管の増殖、分化における RhoA の働きについて検討するために、TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} マウスおよび野生型マウスより胃粘膜を摘出し、オルガノイドを作成した。オルガノイドの増大速度を検討したところ、TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C} オルガノイドと野生型オルガノイドの増大速度はほぼ同程度であった(図3)。オルガノイドの切片を作成し Ki67 の染色を行ったところ陽性細胞率に有意な違いを認めなかった。これらのオルガノイドから RNA を抽出し、TFF1、TFF2、pepsinogen などの発現を検討した。これら胃上皮細胞の分化マーカーの発現低下は見られなかった。また上記幹細胞マーカーも同様に検討したが、幹細胞マーカーの発現増加は見られなかった(図3)。

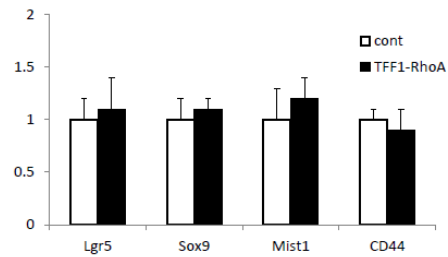


図2 胃粘膜幹細胞マーカーの発現

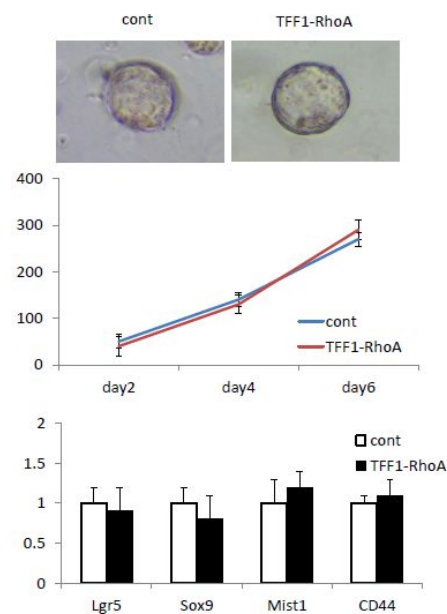


図3 オルガノイドの解析

(3) 胃発癌における RhoA および E-cadherin の役割の解析

TFF1-cre; CDH1^{flox/flox}; TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C}; CDH1^{flox/flox} マウスを交配によって作出し、その胃粘膜について検討した。E-cadherin の単独ノックアウトマウスは生後 1w で腺窩上皮に印環細胞が出現したが、管腔側に脱落し、12w には小彎頭側から伸びだしてきた扁平上皮により完全に置換された。この印環細胞では E-cadherin の発現は欠失していたが、扁平上皮粘膜では E-cadherin は発現していた(図4)。またこれらの再生粘膜は強い Ki67 の発現が見られた(図4)。壁細胞、主細胞などの分化細胞は徐々に減少し、最終的には完全に消失した(図4)。TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C}; CDH1^{flox/flox} マウスも同様の変化であり、印環細胞の増殖は見られず、最終的に扁平上皮に被覆され、TFF1-cre; CDH1^{flox/flox} マウスとの胃粘膜の表現型の違いは明らかではなかった。

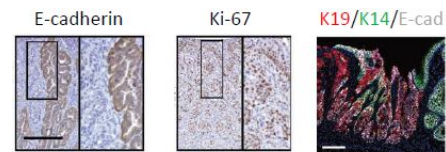


図4 TFF1-cre; CDH1^{f/f} マウスの解析

次にこれらのマウスの胃粘膜よりオルガノイドを作成し、ヌードマウスへ接種した。TFF1-cre; CDH1^{flox/flox} 由来オルガノイド、TFF1-cre; LSL-RhoA^{Y42C}; CDH1^{flox/flox} 由来オルガノイドともにマウスへの生着を認めなかった。一方 CDH1^{flox/flox} に RhoA^{Y42C} 以外の二種類の oncogene を導入しオルガノイドを作成し cre リコンビナーゼ発現レンチウイルスを用いて遺伝子変異を導入したところ、ヌードマウスに生着し、さらに一部で印環細胞の増殖が見られ印環細胞癌が発生していると考えられた(図5)。この印環細胞癌オルガノイドと野生型マウス由来オルガノイドの RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の違いをプロファイリングした(図6)。印環細胞癌を誘導したオルガノイドでケモカインの発現が高く、逆に Tff1 などの分化胃底腺マーカーが低いことが示された。

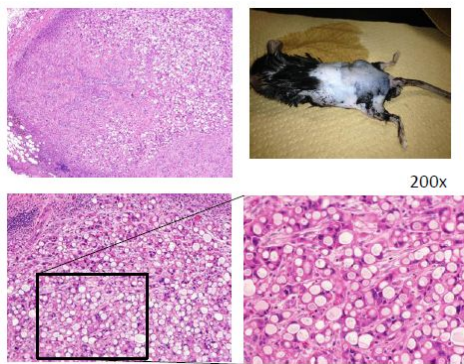


図5 印鑑細胞癌オルガノイドの移植実験

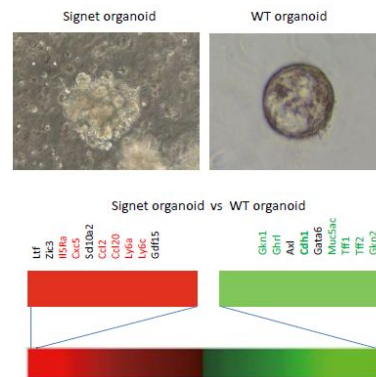


図6 印鑑細胞癌オルガノイドの遺伝子発現

(4) びまん性胃癌の臨床的検討

内視鏡データベースの解析および既報の検討によって、びまん性胃癌はヘリコバクター未除菌でみられ、とくに粘膜への好中球浸潤が強いことがリスクとなることを明らかにした。とくに除菌後症例では分化型胃癌の発癌はみられるものの印環細胞癌はほとんど見られなくなっており、炎症とびまん性胃癌の関連性について示唆的な結果となった。一方で胃粘膜の分化障害である腸上皮化生は、除菌後分化型胃癌の明確なリスク因子となっていた。

また進行胃癌でみられる幽門狭窄について、びまん性胃癌のとくにスキルタイプが多いこと、また抗癌剤治療、手術治療ともに効果が不十分であるが、ステント留置による早期抗癌剤治療例において胃切除が可能となるケースがあることを報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Kinoshita H, Hayakawa Y, Konishi M, Hata M, Tsuboi M, Hayata Y, Hikiba Y, Ihara S, Nakagawa H, Ikenoue T, Ushiku T, Fukayama M, Hirata Y, Koike K. Three types of metaplasia model through Kras activation, Pten deletion, or Cdh1 deletion in the gastric epithelium. *J Pathol.* 2019 Jan;247(1):35-47. doi: 10.1002/path.5163. Epub 2018 Nov 27. PubMed PMID: 30168144.

Shichijo S, Hirata Y. Characteristics and predictors of gastric cancer after *Helicobacter pylori* eradication. *World J Gastroenterol.* 2018 May 28;24(20):2163-2172. doi: 10.3748/wjg.v24.i20.2163. Review. PubMed PMID: 29853734

〔学会発表〕(計 4件)

MODELING SIGNET RING CELL CANCER BY USING MOUSE MODELS AND ORGANOIDS
Masahiro Hata, Yoku Hayakawa, Hirotto Kinoshita, Hayato Nakagawa, Yoshihiro Hirata, Timothy C. Wang, Kazuhiko Koike 米国消化器病学会 ワシントン 2018

新倉量太 平田喜裕 小池和彦、除菌前・後の組織学的腸上皮化生と内視鏡的萎縮による除菌後胃癌のリスクの相違、第104回日本消化器病学会総会、4/19/2018、東京

近藤僚、吉田俊太郎、山下裕玄、石神浩徳、成田明子、神宝隆行、高原楠昊、石橋嶺、中田史子、白田龍之介、山田篤生、木暮宏史、中井陽介、瀬戸泰之、小池和彦 診断時に胃排出路障害のある切除不能胃癌に対する Self-expandable metallic stent (SEMS) 留置後化学療法を用いた conversion therapy 日本消化器病学会週間 2018 2018年11月2日(金) 神戸

吉田俊太郎、中田史子、石橋嶺、成田明子、近藤僚、高原楠昊、白田龍之介、木暮宏史、中井陽介、山田篤生、小池和彦 ステント留置後の再閉塞に対する内視鏡治療～APCによる焼灼を含め～ 第7回大腸ステント安全手技研究会 2018年11月2日(金)スペースアルファ三宮 特大会議室(神戸)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平田 喜裕

ローマ字氏名：(HIRATA, yoshihiro)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医科学研究所

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10529192

研究分担者氏名：木下 裕人

ローマ字氏名：(KINOSHITA, hirototo)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 50645322

研究分担者氏名：早河 翼

ローマ字氏名：(HAYAKAWA, yoku)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 60777655

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小西 満

ローマ字氏名：(KONISHI, mitsuru)

研究協力者氏名：畑 昌宏

ローマ字氏名：(HATA, masahiro)

研究協力者氏名：坪井 真代

ローマ字氏名：(TSUBOI, mayo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。