

令和元年6月9日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09312

研究課題名(和文) マウス大腸腫瘍自然発症モデルを用いた腫瘍間質活性化機構の解明と間質抑制療法の開発

研究課題名(英文) Highly invasive spontaneous tumorigenesis model of colorectal carcinoma with abundant stromal reaction

研究代表者

北台 靖彦 (Kitadai, Yasuhiko)

県立広島大学・人間文化学部・教授

研究者番号：10304437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：共同研究者の檜井らが開発した3種類のマウス大腸癌自然発症モデル(CDX2PApcノックアウトマウス、Apcノックアウト+変異型KRASノックインマウス、Apc+TGFBR11ノックアウトマウス)から発生した大腸腫瘍を用いて、浸潤能や間質反応について比較検討した。Apcノックアウトマウスに形成される癌はポリープ様に増殖するが、浸潤能はなく間質反応も認めなかった。しかし、Apc変異に加え、さらにKRAS変異あるいはTGFBR11変異を加えたマウスでは、間質反応を伴う浸潤性発育を示す腫瘍や粘液癌を生じた。このことから癌関連遺伝子変異の蓄積により、癌細胞に加え間質にも異常をきたすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では共同研究者の檜井らが開発した3種類のマウス浸潤性大腸癌自然発症モデルを用いて、分子病理学的特徴を検討した。遺伝子異常の蓄積により、腫瘍が浸潤能を獲得し、癌細胞のみならず、周囲の間質に大きな変化を示すことを証明した。これまで我々は同所移植モデルを用いて、治療実験に用いていたが、腫瘍の分化度や間質反応などにおいて、ヒト大腸癌組織との相違点があった。複数の遺伝子変異を大腸粘膜特異的に発現させる自然発症モデルでは、よりヒト大腸癌に類似した、間質反応豊富で浸潤性の強い腫瘍が得られ、実験モデルとして有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hinoi et al. succeeded in creating a mouse model that spontaneously develops large intestine tumor by inactivating APC gene. Based on this model, CDX2P-Cre; Apc knock-out + mutant KRAS knock-in mice model and CDX2P-Cre; Apc knock-out +TGFBR11 knock-out mice were generated by adding KRAS and TGFBR11 mutation, respectively. The pathological features of these models were analyzed. The tumor acquired invasiveness when KRAS mutation and TGFBR11 mutation were added to the APC mutation. Extracellular matrix volume, and expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA), which is a marker for cancer-associated fibroblast (CAF), were increased in the mice to which KRAS mutation or TGFBR11 mutation was added. Higher values in micro vessel density and lymph vessel density were observed in mice with KRAS or TGFBR11 mutation. The tumor developed in these spontaneous tumorigenesis models with multiple mutations, closely resembled human colorectal cancer.

研究分野：分子病理学

キーワード：腫瘍微小環境 転移 大腸癌 癌間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

大腸癌 (colorectal cancer; CRC) は、先進国における主要死因であるが、その要因として生活習慣の欧米化が推察されている。CRC の発生経路として、正常粘膜から腺腫が発生し、さらに早期癌、進行癌と進行する多段階発癌 (adenoma-carcinoma sequence) が重要と考えられている[1]。

腺腫は Apc 遺伝子の機能喪失突然変異による Wnt シグナル経路の異常から生じる。それから、RAS または RAF ファミリーメンバーの後天的な機能獲得突然変異により、腫瘍が形成される。これらの腫瘍形成細胞は、他の重要ながん関連遺伝子である TP53 や PIK3CA、transforming growth factor receptor II (TGFBR II) [2] を含んだ更なるドライバー遺伝子の突然変異を後天的に獲得することで、腺腫から癌への移行や、浸潤・転移を誘発する[3]。これらのドライバー遺伝子変異には 2 種類の主要な発癌経路が関与している。

これまで、腫瘍形成、浸潤および転移を評価するための疾患モデルを確立するために、遺伝子操作されたマウスが開発されてきた。培養細胞または異種移植モデルは、癌浸潤および転移を促進する上皮間葉移行を促進する生理学的な腫瘍微小環境を完全に再現することはできない[4]。癌関連遺伝子にドライバー遺伝子変異を誘導することによって、ヒト癌の様々なマウスモデルが確立されている。近年、当院消化器外科、檜井らのグループは大腸上皮特異的に APC 遺伝子を不活化することにより大腸腫瘍を自然発症するマウスモデルの作成に成功した。このモデルは大腸癌の発生・進展のメカニズムや治療実験などに広く用いられているが、浸潤しないことが問題であった。また、KRAS や TGFBR II 遺伝子の単独の異常では腫瘍形成は見られないことが報告されている[5]。

2. 研究の目的

大腸特異的に、APC 変異依存性に腫瘍を形成する自然発症モデルをベースとして用い、これに KRAS 変異、TGFBR II 変異を加えることで、生じる病理組織学的変化を、腫瘍の間質反応に着目して解析することで、間質を標的にした治療モデルとしての応用の可能性について考察した。

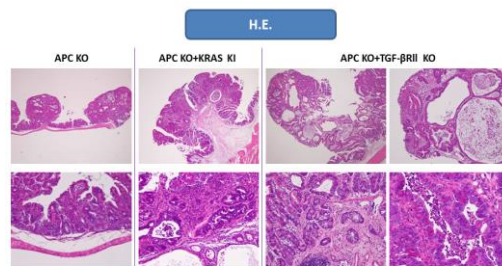
3. 研究の方法

- 1) CDX2P-Cre; Apc KO mice (APC KO mice)
 - 2) CDX2P-Cre; Apc KO + mt KRAS KI mice (APC KO+KRAS KI mice)
 - 3) CDX2P-Cre; APC KO +TGF- β RII KO mice (APC KO+TGF- β RII KO mice)
- 3つのモデルより得られた腫瘍を HE 染色、免疫染色、蛍光免疫染色により詳細に評価した。病理学的特徴、免疫組織学的特徴を解析した。

4. 研究成果

(1) HE 染色による腫瘍浸潤性評価

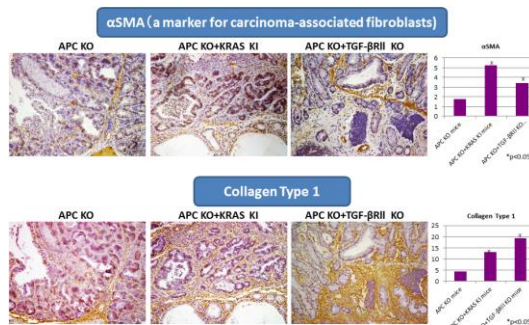
APC 変異マウスの腫瘍は明瞭な腺管構造を示し、腫瘍細胞がポリープ状に増殖するが、浸潤傾向は認められず、腫瘍は粘膜層に留まっていた。APC 変異に KRAS 変異が加わると、腫瘍は粘膜固有層や粘液下層まで浸潤が進み、腫瘍先端部では簇出が認められた。また、腫瘍は部分的に鋸歯状の上皮形態を示しており、腺管の間の間質が増加していた。APC 変異に TGFBR II 変異が加わると、腫瘍は漿膜層にまで浸潤を認め、著明な粘液産生も認められた。



H.E.
 APC KO mice: Sporadic tumors showed polypoid growth but not invasive growth.
 APC KO+KRAS KI mice: Tumor cells had invaded the lamina propria mucosa or submucosa.
 APC KO+TGF- β RII KO mice: Tumor cells had invaded the subserosa. Mucus production and paneth cell metaplasia were also observed.

(2) 間質反応への影響

腫瘍間質は癌線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast : CAF) や細胞外基質、血管、リンパ管、種々の炎症細胞などで構成されている。まずは CAF のマーカーである α SMA と、間質の主要構成成分の細胞外基質である 1 型コラーゲンについて検討した。各マウス腫瘍における CAF の量や細胞外基質の量を定量化したところ、APC 変異マウスの腫瘍よりも KRAS や TGFBR II の変異が加わった



α SMA (a marker for carcinoma-associated fibroblasts)
 Collagen Type 1
 The number of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) and amount of collagen type 1 were significantly greater in the tumors from APC KO+KRAS KI mice and APC KO+TGF- β RII KO mice than in tumors from APC KO mice.

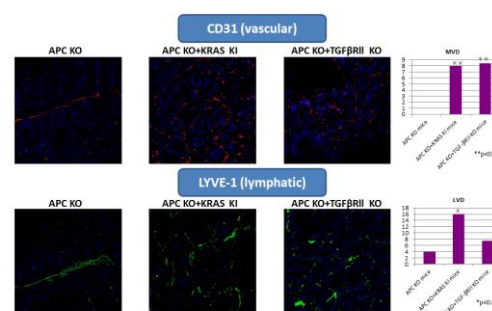
マウスにおいて CAF や細胞外基質が多いことが分かった。

(3) 増殖能やアポトーシスへの影響

癌細胞の増殖能は APC+TGFBR II 群で有意に Ki67-LI が低値であったが、アポトーシスは 3 群間で差は認められなかった。

(4) 血管、リンパ管新生への影響

抗 CD31 抗体と抗 LYVE-1 抗体を用いて評価した。1 視野あたりの血管とリンパ管の数を数え、血管密度 (micro vessel density : MVD)、リンパ管密度 (lymph vessel density : LVD) を計算したところ、KRAS や TGFBR II の変異が加わったマウスにおいて、MVD や LVD が高いことが分かった。



Microvessel density (MVD) was significantly greater in tumors from APC KO + KRAS KI mice and APC KO + TGF- β RII KO mice than in APC KO mice.
Lymph vessel density (LVD) was significantly greater in tumors from APC KO + KRAS KI mice than in tumors from the other two groups.

(5) TGF β axis と PDGF axis の評価

TGF β の発現は各群で有意差なく、TGFBR 発現は APC 単独変異マウスにおいて高発現を呈していた。

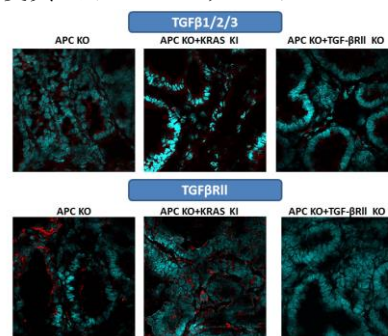
PDGF axis に関して、癌細胞では PDGFB を産生し、間質細胞では PDGFRB の発現が認められた。APC のみを変異したマウスと比較して、KRAS 変異や TGFBR II 変異の加わったマウスにおいて PDGFB や PDGFRB は高発現であった。

(6) EMT マーカーと癌幹細胞マーカー

EMT マーカー (EpCAM・Snail・Slug) や癌幹細胞マーカー (CD44・CD133) に関しては、3 群間に差は認められなかった。

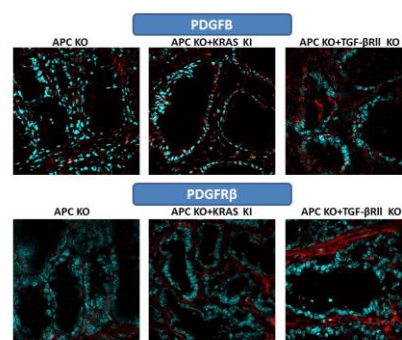
(7) ドライバー遺伝子変異への影響

多段階発癌におけるドライバー遺伝子異常を把握するため、ドライバー遺伝子として代表的な p53 の免疫染色を行った。APC のみを変異したマウスや KRAS 変異の加わったマウスにおいて、正常粘膜のレベルと同等の p53 発現を示したが、TGFBR II 変異の加わったマウスでは、腫瘍細胞の核において p53 は高発現していた。



TGF- β expression did not differ between groups.
Strong immunoreactivity for TGF- β RII was detected on the plasma membrane of tumor cells from APC KO mice and APC KO+KRAS KI mice but not APC KO+TGF- β RII KO mice.

(8) 正常な小腸中に存在する陰窩底部円柱状幹細胞 (crypt base columnar stem cells CBCSC) を挟む形で存在する特殊な細胞型である Paneth 細胞は、Wnt や Notch、表皮成長因子受容体リガンド (epidermal growth factor receptor ligands) のような大腸陰窩底部円柱幹細胞にとっての栄養因子の分泌を介して、陰窩幹細胞ニッチの維持に重要な機能的役割を果たすことが提案されている[6]。正常なマウス結腸上皮には Paneth 細胞が欠けているが、結腸上皮における Apc 不活性化後に得られた腺腫様上皮において、リゾチーム発現 Paneth 様細胞の数が増加することが見出されており[7]、我々の APC 変異マウスでも腸上皮やポリープ状腫瘍内においてリゾチーム発現 Paneth 様細胞の発現を認めた。一方で、KRAS 変異や TGFBR II 変異の加わったマウスに発生した腫瘍内では、Paneth 様細胞の発現を認めなかった。

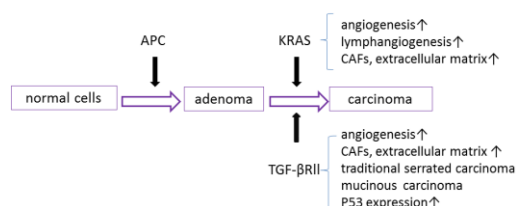


Stromal cells expressed PDGFR- β predominantly, and tumor cells expressed PDGFB predominantly.
Expression levels of PDGFB and PDGFR- β were higher in tumors from APC KO+KRAS KI mice and APC KO+TGF- β RII KO mice than in tumors from APC KO mice.

考察

APC 単独の遺伝子変異では、非浸潤性の腫瘍の発育のみを認める一方で、2つの遺伝子突然変異 (APC/KRAS または APC/TGFBR II) は、間質反応を有する浸潤性大腸癌の発生を誘導した。

間質形成に関与する重要な蛋白として知られる、PDGFRの発現は、腫瘍間質で見られ、そのリガンドであるPDGFBの発現が癌細胞において認められた。APCのみが変異したマウスと比較して、KRAS変異やTGFRB II変異の加わったマウスにおいてPDGFBやPDGFRBは高発現しており、間質反応増強機序の一つとして考えられた。我々のグループでは、癌と間質の相互作用において、PDGF/PDGFR axisが重要な役割を演じることを報告してきており、PDGFR阻害剤であるイマチニブやニロチニブが、このようなPDGFR高発現を伴う間質豊富な腫瘍に対して有用であることを報告してきた[8][9]。KRASもしくはTGFRB II変異を有する腫瘍において、PDGF/PDGFR axisが新たな治療ターゲットとなり得る可能性がある。



また、APC変異マウスで見られた、Paneth様細胞が2つの変異を有する腫瘍では観察されなくなっていた。これは、遺伝子変異が加わり、腺腫から癌細胞へ脱分化が進んでいく上で、幹細胞ニッチ内で脱分化の方向へ傾き、幹細胞からのPaneth様細胞への分化が停止した結果、腫瘍内でのPaneth様細胞が観察されなくなっている可能性が考えられた。

このように、APC変異に、KRAS変異やTGFRB II変異を加えたモデルにおいては、間質反応の豊富で浸潤性を有する、ヒトの大腸癌に近い形態学的特徴を持つ大腸癌が認められ、これらは癌細胞のみならず間質細胞を標的にした治療モデルとして有用であると考えられた。

〈引用文献〉

- [1] Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer *Cell* **87**, 159-170.
- [2] Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer *N Engl J Med* **361**, 2449-2460.
- [3] De Roock W, Piessevaux H, et al. (2008). KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab *Ann Oncol* **19**, 508-515.
- [4] Joyce JA, Pollard JW (2009). Microenvironmental regulation of metastasis *Nat Rev Cancer* **9**, 239-252.
- [5] Trobridge P, Knoblauch S, et al. (2009). TGF-beta receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a beta-catenin-independent pathway *Gastroenterology* **136**, 1680-1688 e1687.
- [6] Sato T, van Es JH, et al. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts *Nature* **469**, 415-418.
- [7] Feng Y, Sentani K, et al. (2013). Sox9 induction, ectopic Paneth cells, and mitotic spindle axis defects in mouse colon adenomatous epithelium arising from conditional biallelic Apc inactivation *Am J Pathol* **183**, 493-503.
- [8] Yuge R, Kitadai Y, et al. (2015). mTOR and PDGF pathway blockade inhibits liver metastasis of colorectal cancer by modulating the tumor microenvironment *Am J Pathol* **185**, 399-408.
- [9] Takigawa H, Kitadai Y, et al. (2016). Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma *Cancer Sci* **107**, 601-608.

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計4件)

1. Takigawa H, **Kitadai Y**, Shinagawa K, Yuge R, Higashi Y, Tanaka S, et al. Mesenchymal Stem Cells Induce Epithelial to Mesenchymal Transition in Colon Cancer Cells through Direct Cell-to-Cell Contact. *Neoplasia*. 2017;19(5):429-38.
2. Takigawa H, **Kitadai Y**, Shinagawa K, Yuge R, Higashi Y, Tanaka S, et al. Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma. *Cancer Sci*. 2016;107(5):601-8.
3. Niitsu H, Hinoi T, Kawaguchi Y, Sentani K, Yuge R, **Kitadai Y**, et al. KRAS mutation leads to decreased expression of regulator of calcineurin 2, resulting in tumor proliferation in colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2016;5(8):e253.
4. Miguchi M, Hinoi T, Shimomura M, Adachi T, Saito Y, Niitsu H, **Kitadai Y**, et al. Gasdermin C Is Upregulated by Inactivation of Transforming Growth Factor beta Receptor Type II in the Presence of Mutated Apc, Promoting Colorectal Cancer Proliferation. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166422.