

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15927

研究課題名(和文) 胃表層上皮特異的遺伝子改変による進行胃癌マウスモデルの作成

研究課題名(英文) Mouse Models of Metaplasia in the Stomach using Tff1-Cre mouse

研究代表者

木下 裕人(Kinoshita, Hiroto)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50645322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃表層上皮で遺伝子改変を起こすTff1-Creマウスを用いて、胃化成性変化のマウスモデルを作成した。Tff1-Cre;LSL-KrasG12Dマウスでは、萎縮、過形成、偽幽門腺化成を認め、既報のKrasによる化成性変化モデルに一致する結果であった。Tff1-Cre;Pten f/fマウスでも類似した組織像を認め、免疫組織化学によりERKのリン酸化を認めたことから、化成性変化発生におけるRAS-MAPKの重要性が示唆された。Tff1-Cre;Cdh1 f/fマウスでは、上皮の剥脱と再生成変化を認めるが、次第に扁平上皮が腺上皮を置換していき、扁平上皮仮性のモデルとなると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既報では、胃の仮性性変化は腺底部の成熟した主細胞が起源であり、分化転換によって生じるとされてきた。Tff1-Creマウスでは主として腺管の表層部で遺伝子改変が起こるため、仮性性変化は表層部から、おそらくは狭部の組織幹細胞から生じたものと考えられた。本研究は、胃の化成性変化発生メカニズムの新たな側面を示唆するものと考えられた。また、扁平上皮仮性のモデルはこれまで報告がないユニークなものであり、扁平上皮と腺上皮の境界が競合によって定まるという「競合モデル」を支持するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established a Tff1-Cre bacterial artificial chromosome transgenic mouse line in an attempt to induce gene modification specifically in the gastric pit lineage. In the stomachs of Tff1-Cre;LSL-KrasG12D mice, proliferating cell clusters expanded throughout the corpus glands, with foveolar cell expansion with ectopic Alcian blue-positive mucins, oxyntic atrophy, and pseudopyloric changes with spasmodic polypeptide-expressing metaplasia; however, gastric cancer was not observed even at 12 months of age. Tff1-Cre;Ptenflox/flox mice displayed similar changes to those seen in Tff1-Cre;LSL-KrasG12D mice, both with aberrant ERK activation within 3 months. Tff1-Cre;Cdh1flox/flox mice developed gastric epithelial shedding with hyperproliferation and loss of normal gastric lineages. Eventually, the glandular epithelium in Tff1-Cre;Cdh1flox/flox mice was completely replaced by squamous epithelium which expanded from the forestomach.

研究分野：消化管の炎症および発癌

キーワード：胃癌 胃炎 マウスモデル

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行胃癌マウスモデルの必要性

胃癌の発生における *Helicobacter pylori* の重要性が明らかとなり、胃癌予防としての除菌治療が一般化した。胃癌の罹患率・死亡率はいまだ高い。とくに切除不能・進行胃癌は予後不良で、新たな治療法の開発が急務である。播種や転移を起こす進行胃癌のマウスモデルは、研究開始時点で報告がなく、治療標的の探索のため進行胃癌マウスモデルを確立するため、本研究を計画した。

(2) 胃上皮に特異的な遺伝子改変を可能とする *Tff1*-Cre マウス

進行胃癌マウスモデルの確立が難しい理由の一つとして、既存の Cre ドライバーは胃に特異的ではなく、胃癌モデルを作ろうとしても肺や膵臓などの他臓器病変が致命的となり胃の解析ができない、という点があった。そこで我々は、以前の研究計画において、胃表層上皮に特異的な *Tff1* 遺伝子のプロモーター下に Cre を発現する *Tff1*-Cre マウスを開発し、胃表層上皮を中心とする Cre の発現を確認したが、同マウスを用いたマウスモデルの確立には至っていなかった。

(3) 胃における化生性変化

慢性胃炎に伴う腸上皮化生の存在は、胃癌発生のリスク因子であり、*H. pylori* 除菌後も、腸上皮化生を有する症例では発癌率が高いことが知られている。しかし、腸上皮化生は直接的な前癌病変なのか、単なるリスク因子であり“傍癌病変”にすぎないのかなど不明な点も多く、より効果的な早期発見・予防法の開発のためにも、腸上皮化生の詳細な解析が必要である。そこで胃癌モデルと並行して、上述の *Tff1*-Cre マウスを用いて化生性変化の解析も計画した。

当初から、*Tff1*-Cre;*LSL-KrasG12D* マウスで Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) という化生性変化が生じることという予備的データを得ていた。

2. 研究の目的

(1) *Tff1*-Cre マウスを用いた進行胃癌マウスモデルの開発

上述の通り、進行胃癌マウスモデルの開発を目標に、*Tff1*-Cre マウスと種々の遺伝子改変マウスを交配した。

(2) *Tff1*-Cre マウスを用いた化生性変化マウスの新規モデルの確立

上記(1)の過程で、種々の組み合わせの遺伝子改変マウスにおいて、発癌には至らない組織学的な変化について、化生性変化として解析した。

3. 研究の方法

(1) *Tff1*-Cre マウスと種々の遺伝子改変マウスとの交配

既報の胃癌マウスモデルや、ヒト胃癌切除検体の解析の既報を参考に、以下の遺伝子改変マウスを用いた：

LSL-KrasG12D マウス

Ras-MAPK シグナル経路を活性化させる。胃癌症例の約 20% で同経路の活性化が認められる。*H. pylori* 慢性感染でも同経路が活性化することが知られている。

Pten flox マウス

PI3K/AKT シグナル経路を活性化させる。EB ウイルス関連胃癌で同経路の活性化が多く認められる。

Cdh1 flox マウス

未分化型胃癌では CDH1 (E カドヘリン) の変異 (機能喪失) が重要である。

Tgfbr2 flox マウス

SMAD シグナル経路を不活性化させる。胃癌症例では、SMAD4 の変異が 10% 程度、SMAD2 の変異が数% 認められる。

(2) マウス胃オルガノイドの解析

上記(1)の種々の組み合わせの遺伝子改変マウスの胃体部から、オルガノイドを作成し、上皮細胞の自律的な形質の変化を *in vitro* で解析した。

4. 研究成果

(1) *Tff1*-Cre;*LSL-KrasG12D* マウス

Tff1-Cre;LSL-KrasG12D マウスを時系列で組織学的に解析し、化生性変化の特徴を明らかにした。

形態学的には表層上皮の過形成と壁細胞・主細胞の減少（萎縮）を認めた（図1）。Alcian blue 染色、PAS 染色などの特殊染色や、CD44、TFF2、MUC4、Clusterin などの SPEM マーカーの免疫染色により、腺底部の腺管が SPEM であることを確認した。54 週齢までの解析では *dyplasia* や癌は発生しなかった。MUC2、villin、CDX1、CDX2 などの腸上皮化生のマーカーも、54 週齢までの解析で陰性であった。

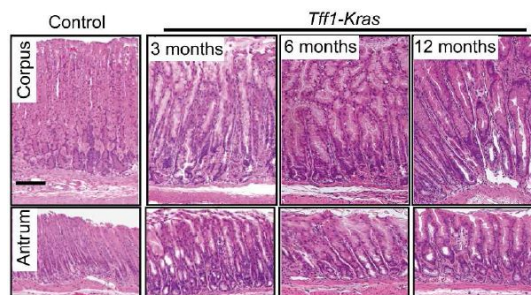


図1 *Tff1-Cre;LSL-KrasG12D* マウス

間質の炎症細胞の増加も認め、とくに F4/80 陽性細胞（主としてマクロファージ）が増加していたが、クロドロネート投与によりマクロファージを除去しても、SPEM の発生は抑制されなかった。

同マウスの胃体部のオルガノイド培養では、野生型マウスと比して増殖が亢進しており、分化マーカーの遺伝子発現や免疫組織化学解析も *in vivo* の所見をよく模倣していた（図2）。

Tff1-Cre;LSL-KrasG12D マウスおよびその胃体部のオルガノイドは、胃の化生性変化モデルとして有用であると考えられた。

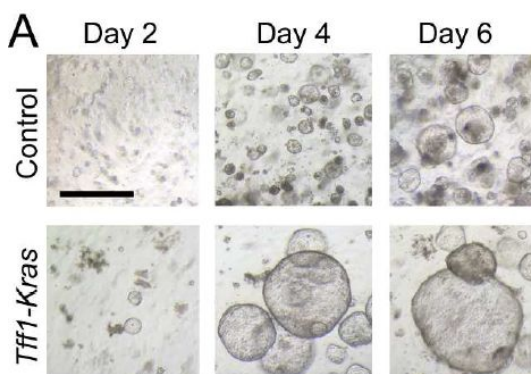


図2 *Tff1-Cre;LSL-KrasG12D* マウスの胃体部オルガノイド

(2) *Tff1-Cre;Pten flox/flox* マウス

RAS-MAPK シグナル経路と強く関連する PI3K-AKT シグナル経路が、胃の化生性変化形成に果たす役割を検討するため、*Tff1-Cre;Pten flox/flox* マウスを解析した。12 週齢で、*Tff1-Cre;LSL-KrasG12D* マウスに酷似した萎縮、過形成、SPEM を認めた。

免疫組織化学および *Tff1-Cre;Pten flox/flox* マウスのオルガノイドを用いたウエスタンブロッティングで pERK が上昇しており、同マウスにおける SPEM の発生には、やはり RAS-MAPK シグナル経路が関与しているものと思われた（図3）。

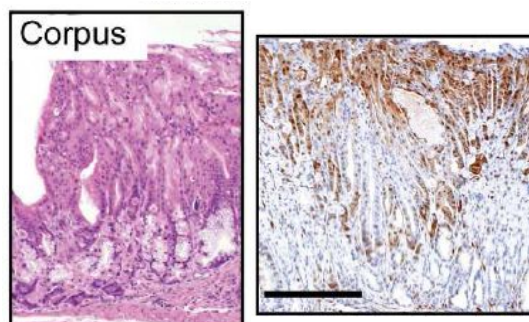


図3 *Tff1-Cre;Pten flox/flox* マウス（HE 及び pERK 免疫染色）

(3) *Tff1-Cre;Cdh1 flox/flox* マウス

未分化型癌モデルの作成を目的として、*Cdh1 flox* マウスとの交配を行い、*Tff1-Cre;Cdh1 flox/flox* マウスを作成した。4 週齢で腺胃上皮の剥脱と著明な再生反応を認め、マウスの発育も不良であったが、時間経過とともに腺胃・前胃の境界（腺上皮と扁平上皮の境界部）から扁平上皮が広がっていき、12 週齢では腺上皮は消失し胃全体が扁平上皮で覆われた（図4）。「扁平上皮化生」ともいえるフェノタイプはこれまでに報告がなく、腺上皮・扁平上皮競合モデル（境界部で双方が競合し境界が形成されているという仮説）を支持するものと思われた。



図4 *Tff1-Cre;Cdh1 flox/flox* マウス（4-12 週齢）

同マウスを1週齢で解析すると、一部に印環細胞様の細胞が認められ、既報と同様 E カドヘリンの欠損により印環細胞が生じるが、表層上皮とともに剥脱し生存できないものと思われた。印環細胞の生存には、表層上皮とともにニッチが保たれている必要があることを示唆する結果と考えられた(図5)。

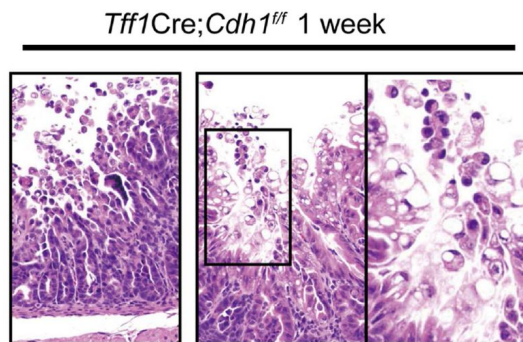


図5 *Tff1*-Cre;*Cdh1* flox/flox マウス (1週齢)

(4) *Tff1*-Cre;*LSL-KrasG12D*;*Tgfr2* flox/flox マウス

同マウスでは、12週齢以降で腺胃・前胃の境界に腫瘍が発生し、組織学的には腺扁平上皮癌であり、粘膜下層への浸潤を認められた。組織型としては特殊であるが、胃噴門癌のモデルになると考えられた。しかし20週齢前後で著名なるい瘦を認めたため、以降の解析は行えなかった。おそらく通過障害から摂食不良をきたすためと思われる(図6)。

腺上皮・扁平上皮境界に発癌ポテンシャルの高い細胞が存在することを示唆する結果であり、他の胃噴門癌マウスモデルとともに現在解析を継続中である。

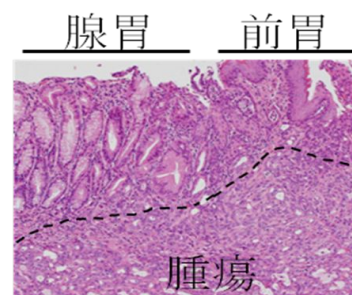


図6 *Tff1*-Cre;*LSL-KrasG12D*;
Tgfr2 flox/flox マウス (12週齢)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

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.

(計 1件)

〔学会発表〕

木下裕人、平田善裕、小池和彦 Tff1-Cre マウスを用いた胃の表層上皮細胞の機能解析
第104回日本消化器病学会総会

(計 1件)

〔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

なし

科研究費による研究は、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。