

平成21年 4月10日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390111
 研究課題名（和文）胃発癌過程での PGE₂ による Wnt シグナル活性化へ及ぼす影響の解明
 研究課題名（英文）Activation of Wnt signaling through PGE₂ induction in gastric tumorigenesis
 研究代表者
 大島 正伸（OSHIMA MASANOBU）
 金沢大学・がん研究所・教授
 研究者番号：40324610

研究成果の概要：

遺伝子変異による Wnt シグナルの恒常的亢進は胃がん発生の原因として知られている。一方、腫瘍組織では炎症性プロスタグランジンである PGE₂ の産生が誘導され、発がんを促進している。本研究では、胃がん発生における Wnt シグナルと PGE₂ 経路の相互作用について解析を行ない、PGE₂ 依存的に発生する炎症反応がマクロファージからの TNF- α 産生を誘導し、TNF- α が胃がん細胞の Wnt シグナル亢進に作用して発がんを促進する可能性を初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
平成20年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：分子病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Wnt、PGE₂、胃がん、マウスモデル、炎症

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは消化管上皮幹細胞の未分化性維持に作用しており、APC や β -catenin などの遺伝子変異により Wnt シグナルが恒常的に亢進すると、上皮細胞の未分化状態が維持されて増殖を続ける。これが、胃がんや大腸がん発生の重要な分子機序として知られている。また、最近になって、遺伝子変異により活性化した Wnt シグナルが、別のシグナル経路によってさらに活性化される現象 (Wnt シグナルのプロモーション) が発がんに重要である可能性が示唆された。しかし、

Wnt プロモーションを誘導する分子機序は明らかにされていない。

一方、非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) を服用している集団では消化器がん発生頻度が低いことなどから、NSAIDs が標的とするプロスタグランジン合成酵素 COX-2 が発がんに重要なことが明らかにされている。さらに、マウスモデルを用いた遺伝学的研究から、COX-2 の下流で合成されるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) が腫瘍発生に関与している事が示されている。PGE₂ の作用として血管新生やアポトーシス抑制の可能性などが

報告されているが、未だ、PGE₂による腫瘍発生促進作用の全貌は明らかになっていない。腫瘍発生におけるCOX-2/PGE₂経路の役割を分子レベルで解明出来れば、その知見は発がん予防薬の開発に貢献出来る。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、胃がん発生過程で産生誘導されるPGE₂による腫瘍発生促進作用のひとつとして、胃粘膜上皮細胞あるいは胃がん細胞のWntシグナル活性をプロモーションしている可能性について着想するに至った。

我々はこれまでに、胃粘膜でPGE₂産生を誘導させた*K19-C2mE*トランスジェニックマウスを作製して解析することにより、PGE₂が胃粘膜へのマクロファージ浸潤を誘導し、その活性化により炎症反応を引き起こされることを観察している。したがって、本研究では、PGE₂による直接作用またはPGE₂依存的な炎症反応による間接的なWntシグナル活性化への影響について明らかにすることを目的とし実験を行なった。

胃がん発生には*Helicobacter pylori*感染が密接に関わっており、*pylori*感染がCOX-2発現を誘導することも報告されている。したがって、本研究では、感染刺激が胃粘膜上皮のWntシグナル亢進に作用する可能性について明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

これまでに胃粘膜上皮細胞でWntシグナルを亢進させた*K19-Wnt1*マウスを作製した。本研究課題では、(1)*K19-Wnt1*マウスを用いた病理解析、(2)胃がん細胞を使った培養実験、(3)*K19-Wnt1*マウスを用いた感染実験を以下の方法により実施した。

- (1) *K19-Wnt1*マウス胃粘膜には散発的に前癌病変が発生する。この病変部分を含む胃粘膜組織を病理学および免疫組織学的に解析した。マクロファージはF4/80抗体で検出し、Wntシグナル活性化はβ-cateninの細胞質および核への蓄積により判断した。
- (2) TCF/β-catenin複合体により、緑色蛍光蛋白(EGFP)が発現誘導されるTOPEGFPベクターを構築し、胃がん細胞株AGSおよびKato-IIIに導入し、Wntレポーター細胞株(AGS-GFPおよびKato-III-GFP)とした。また、マクロファージ細胞株のRAW264をlipopolysaccharide (LPS)で刺激して培地を回収し、conditioned medium (CM)とした。Wntレポーター細胞をCMあるいは炎症性サイトカインのIL-1β、IL-6、TNF-α、IL-11などで刺激し、Wntシグナル強度の変化をflowcytometry (FACS)を用いて解析測

定した。この細胞を用いてPGE₂によるWntシグナル強度への直接作用の解析も行なった。また、マクロファージCMやTNF-αで刺激した胃がん細胞から蛋白を調製して、Akt、GSK-3β、β-catenin等のWestern blotting解析を行ない、Wnt亢進分子機序の解析を行なった。

- (3) *K19-Wnt1*マウスに、*Helicobacter pylori*の類縁菌である*Helicobacter felis*を感染させ、8週間後および30週間後に病理解剖を施して腫瘍病変の有無について観察した。さらに病理組織解析や免疫染色等によりマクロファージ浸潤、Wntシグナル亢進等を解析した。

4. 研究成果

(1)*K19-Wnt1*マウス前癌病変の解析結果

*K19-Wnt1*マウス胃粘膜をトルイジンブルーで染色すると図1Aのような前癌病変

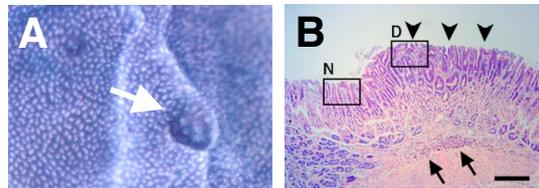


図1 *K19-Wnt1*マウス胃粘膜に発生する前癌病変。(A)実体顕微鏡写真 (B)HE染色。

が認められた。組織学的には、異形性を呈する粘膜上皮細胞が異常に分岐しながら増殖していた(図1B, 矢頭)。興味深いことに、前癌病変の粘膜下には、常に炎症細胞浸潤が見られた(図1B, 矢印)ので、前癌病変の発生には炎症性刺激が起因になっている可能性が考えられた。

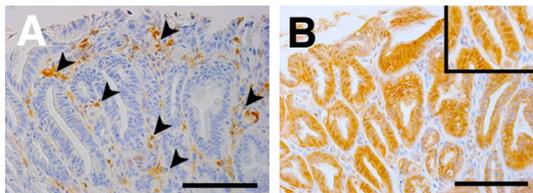


図2 *K19-Wnt1*マウス前癌病変の免疫染色 (A)マクロファージ(F4/80) (B)β-catenin, Bars, 100 μm。

次に前癌病変を免疫染色にて解析した。F4/80抗体を用いた染色により、間質には著しいマクロファージ浸潤が認められた(図2A, 矢頭)。また、β-catenin抗体を用いた染色により、前癌病変を構成する上皮細胞では核への強いβ-catenin蓄積を認めた。すなわち、前癌病変では上皮細胞のWntシグナルが強く活性化していることが明らかとなった。

以上の結果から、何らかの刺激により炎症反応を起こした粘膜局所では、上皮細胞のWntシグナルが活性化しており、それにより前癌病変が発生した可能性が考えられた。Wntシグナル活性化の機序として、浸潤したマクロファージによるなんらかの作用が推

測された。

(2)TNF- α による胃がん細胞 Wnt の活性化

TCF 結合領域を minimum promoter の上流につないだ TOPEGFP ベクターを作製し、胃がん細胞株 AGS および Kato-III に導入し、それぞれ AGS-GFP および Kato-III-GFP 細胞とした。AGS および Kato-III 細胞は β -catenin の変異あるいは遺伝子増幅のために Wnt シグナルが亢進している (図 3A)。一方、RAW264 マクロファージ細胞の培地に LPS を添加して活性化させ、一定時間後に培地を回収して conditioned medium (CM) とした。この CM を用いて、作製した 2 種類の Wnt レポーター胃がん細胞を刺激すると、GFP 発現が有意に上昇した。図 3B に AGS-GFP を CM で刺激した時の FACS 解析結果を示す。非処置 AGS 細胞の top 2% にあたる GFP 蛍光を 22/6% の細胞が発した。

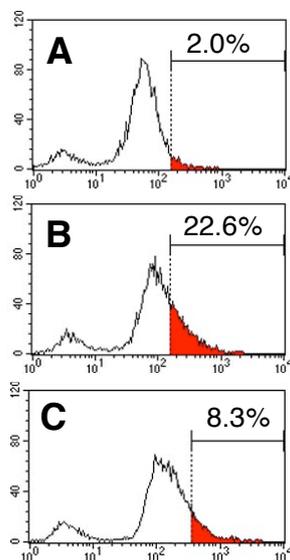


図 3 AGS-GFP 細胞の Wnt シグナル活性強度 (FACS) 解析結果。(A) 非処置対照 AGS-GFP 細胞。(B) LPS 刺激で活性化させたマクロファージ由来の CM で刺激した AGS-GFP 細胞。赤色領域は非処置対照群の top 2% に相当する GFP 蛍光領域。(C) LPS 刺激マクロファージ CM に TNF- α 中和抗体を添加した AGS-GFP 細胞。Wnt 亢進の抑制が認められる。

LPS で刺激した RAW264 細胞の CM には炎症性サイトカインが多量に含まれていることが知られている。そこで、回収した CM に TNF- α の中和抗体を加えて、各 Wnt レポーター胃がん細胞を刺激すると、どちらの細胞においても CM による Wnt シグナル亢進作用が阻害された (図 3C)。したがって、活性化マクロファージから産生される TNF- α が胃がん細胞の Wnt を活性化に作用していると考えられた。そこで、それぞれの Wnt レポーター細胞を、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-11 の 4 種類のサイトカインで濃度を変えて (1, 10, 100 ng/ml) 刺激して、flowcytometry で Wnt シグナル強度を解析した。その結果、TNF- α で刺激した時に、濃度依存的な Wnt シグナル強度の増幅が認められた (図 4)。IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインには、Wnt 活性化作用は認められなかった。

以上の、細胞培養実験の結果から、炎症に

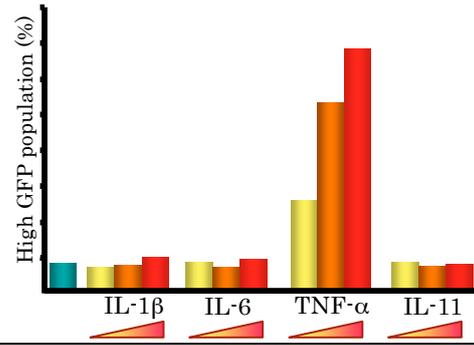


図 4 Kato-III-GFP 細胞を各サイトカインで刺激した時の GFP 蛍光強度の比較。非処置細胞の top 2% (左) に相当する領域に含まれる細胞集団の比率を示す。

より胃粘膜に浸潤して活性化したマクロファージは、局所で TNF- α を産生することにより、周囲の胃上皮細胞の Wnt シグナルを活性化していることが明らかとなった。さらに胃がん細胞の Wnt 活性化における PGE₂ の直接作用を解析するため、AGS-GFP および Kato-III-GFP 細胞を PGE₂ あるいは COX-2 阻害薬で処置し、flowcytometry による FACS 解析を実施したが、Wnt シグナル強度の変化は認められなかった。したがって、胃がん細胞での Wnt シグナル亢進に、PGE₂ による直接作用はないと考えられた。

マクロファージ CM や TNF- α で刺激した胃がん細胞から蛋白を抽出し、Western blotting を施して Wnt 活性化の分子機序を解析した。刺激した胃がん細胞では、予想通り活性化型の非リン酸化 β -catenin 量が有意に上昇しており、Wnt シグナルの亢進が確認された。また、GSK-3 β によりリン酸化される β -catenin はユビキチン経路により分解されるが、CM や TNF- α で刺激した胃がん細胞では GSK-3 β 自身のリン酸化レベルが高くなっており、GSK-3 β の活性が抑制されていた。GSK-3 β をリン酸化する酵素として Akt が知られている。実際に、刺激した胃がん細胞での活性化型 Akt (Ser473 リン酸化型) のレベルが高くなっていることが確認された。以上の結果により、TNF- α は胃がん細胞の Akt 活性化を介して GSK-3 β を抑制し、 β -catenin の安定化を促進することで Wnt シグナルを亢進していると考えられた。

(3) *H. felis* 感染による Wnt 活性化と腫瘍発生

Helicobacter felis を血液寒天培地で増殖させた後、 1×10^8 ずつを経口的に K19-Wnt1 マウスに感染させた。感染から 8 週間後に病理解剖を施した結果、腫瘍性病変は認められなかったが、組織解析により炎症領域と非炎症領域が認められ (図 5A, C)、炎症領域ではマクロファージの著しい粘膜浸潤が認められた。重要なことには、マクロファージが浸潤した領域の粘膜上皮細胞では、 β -catenin の細

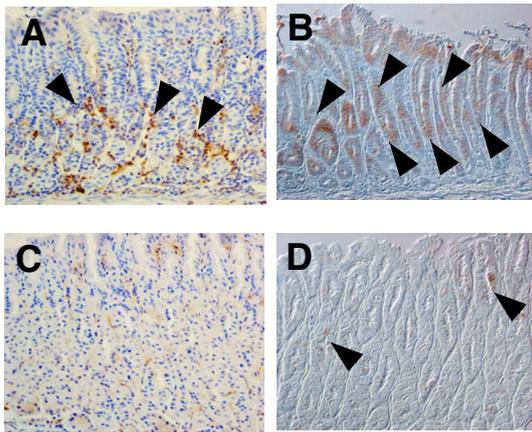


図5 *H. felis* 感染8週間後の胃粘膜で観察される炎症領域(A,B)と非炎症領域(C,D)の病理組織免疫染色。F4/80によるマクロファージ染色(A,C)、および β -catenin染色(B,D)。

胞内蓄積が認められ、Wntシグナルの亢進を示していた(図5B矢頭)。それに対して非炎症領域では、腺管頸部の未分化上皮細胞が存在する部分でわずかに β -cateninを蓄積する細胞が認められた(図5D)。以上の結果は、*Helicobacter* 感染に起因した炎症反応により粘膜にマクロファージが浸潤し、同時に上皮細胞のWntシグナルが亢進したことを示している。(1)の細胞培養実験結果から判断して、活性化マクロファージが産生するTNF- α が生体内でもWntシグナル活性化に作用した可能性が考えられる。さらに、詳細な組織解析を行なった結果、炎症領域の胃粘膜では壁細胞や主細胞などへの最終分化が阻害されていた。したがって、Wntシグナルの亢進が未分化性維持亢進および分化抑制に作用したと考えられた。

さらに、感染・炎症によるWntシグナル亢進と腫瘍発生の関係を解析するため、*K19-Wnt1* マウスに30週間*H. felis*を持続感染させた後に病理解剖を施した結果、図6Bに示すように胃に腫瘍が発生した。このような腫瘍病変は非感染*K19-Wnt1* マウスでは認められなかった。この結果は、感染・炎症にともなうWntシグナル活性の亢進、すなわちWntプロモーションが胃粘膜に腫瘍を発生させる可能性を示している。

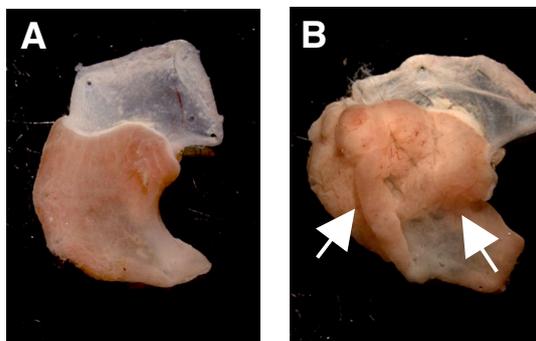


図6 (A)非感染*K19-Wnt1*マウスの胃粘膜写真。(B)*H. felis*感染30週間後の*K19-Wnt1*マウス(同週齢)で見られる胃腫瘍病変。

以上の研究成果により、胃がん発生における感染、炎症とWntシグナルの関係について以下のように考えることが出来る。*H. pylori* 感染に起因した宿主反応により胃粘膜ではCOX-2およびmPGES-1の発現が誘導されてPGE₂が産生する。PGE₂は炎症性メディエーターとしてさまざまな反応を誘導し、これによりマクロファージ浸潤とその活性化が誘導されると考えられる。一方、APCあるいは β -catenin遺伝子の変異はWntシグナルを恒常的に活性化させるが、非炎症領域の正常胃粘膜でWntシグナルが活性化してもその活性化レベルは腫瘍させる閾値に達していない。しかし、*H. pylori* 感染により炎症反応が起こっている胃粘膜でWntシグナルが活性化すると、TNF- α の作用によりWntプロモーションが起こり、Wnt活性化レベルが腫瘍発生の閾値を越える。近年、注目されているWntプロモーションだが、その分子機序は不明な点が多い。したがって、本研究で明らかにした炎症反応に依存したWntプロモーションは、胃がん発生に関わる新しい分子機序として重要な発見となった。この研究成果は、USCFのLisa Coussens博士らにより、胃がん発生における感染・炎症と発がんを結ぶ新しい分子機序として、*Cancer Cells*誌で紹介された(*Cancer Cell* 14: 7-9, 2008)。

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13件)

- ① Oshima H, Itadani H, Kotani H, Oshima M. Induction of prostaglandin E2 pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res*, 69: 2729-2733, 2009. [査読あり]
- ② Kitamura T, Biyajima K, Aoki M, (他2名, 4番目). Matrix metalloproteinase 7 is required for tumor formation, but dispensable for invasion and fibrosis in SMAD4 deficient intestinal adenocarcinomas. *Lab Invest*, 89: 98-105, 2009. [査読あり]
- ③ Guo X, Oshima H, Kitamura T, (他2名, 2および5番目). Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem* 283: 19864-19871, 2008. [査読あり]
- ④ Oguma K, Oshima H, Aoki M, (他7名, 2および10番目). Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor- α in gastric tumor cell. *EMBO J* 27: 1671-1681, 2008. [査読あり]

り]

- ⑤ Howlett M, Giraud A, Lescesen H (他 11 名, 12 および 13 番め). The interleukin-6 family cytokine interleukin-11 regulates homeostatic epithelial cell turnover and promotes gastric tumor development. *Gastroenterology*, 136: 967-977, 2008. [査読あり]
- ⑥ Takasu S, Tsukamoto T, Cao XY, (他 9 名, 11 番目). Roles of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and β -catenin activation in gastric carcinogenesis in *N*-methyl-*N*-nitrosourea-treated *K19-C2mE* transgenic mice. *Cancer Sci*, 99: 2356-2364, 2008. [査読あり]
- ⑦ Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, (他 6 名, 7 番目). Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 118: 560-580, 2008. [査読あり]
- ⑧ Oshima M, Suzuki H, Guo X, Oshima H. Increased level of serum vascular endothelial growth factor by long-term exposure to hypergravity. *Exp Anim* 56: 309-313, 2007. [査読あり]
- ⑨ Piao YS, Du YC, Oshima H, (他 4 名, 3 および 7 番目). Platelet 12-lipoxygenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency. *Carcinogenesis* 29: 440-447, 2008. [査読あり]
- ⑩ Aoki K, Aoki M, Sugai M, (他 10 名, 11 番目). Chromosomal instability by β -catenin/TCF transcription in APC or β -catenin mutant cells. *Oncogene* 26: 3511-3520, 2007. [査読あり]
- ⑪ Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, (他 7 名, 9 番目). Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 26: 4679-4688, 2007. [査読あり]
- ⑫ Kitamura T, Kometani K, Matsunaga A, (他 8 名, 7 番目). SMAD4-deficient intestinal recruit CCR1(+) myeloid cells that promote invasion. *Nat Genet* 39: 467-475, 2007. [査読あり]
- ⑬ Kojima Y, Miyoshi H, Clevers HC, Oshima M, (他 2 名, 4 番目). Suppression of tumulin polymerization by the LKB1-MAPK signaling. *J Biol Chem* 282: 23532-23540, 2007. [査読あり]

[学会発表] (計 14 件)

- ① Oshima M. Inflammation accelerates tumorigenesis through promotion of Wnt

signaling. *67th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Nagoya) Oct, 2008. [日本癌学会学術総会]

- ② Oshima H, Oguma K, Kotani H, and Oshima M: Gastric tumorigenesis through EGFR activation in Wnt and PGE₂ transgenic mice. *67th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Nagoya) Oct, 2008. [日本癌学会学術総会]
- ③ Oguma K, Oshima H, Aoki M, (他 7 名, 2 および 10 番目). Promotion of Wnt signaling by activated macrophage-derived TNF- α . *67th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Nagoya) Oct, 2008. [日本癌学会学術総会]
- ④ 大島 正伸「新規モデルマウスを用いた胃がん発生分子機序の解析」第 97 回日本病理学会 (金沢, 2008 年 5 月 16 日)
- ⑤ Oshima M, Oshima H, Oguma K, (他 2 名, 1 および 2 番目). Inflammatory responses accelerate Wnt signaling in gastric epithelial cells. *99th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR)*, (San Diego) April, 2008.
- ⑥ Oshima H, Taketo MM, Oshima M. Novel gastric cancer mouse model by transgenic expression of Wnt1 and prostaglandin E₂. *12th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, (Sapporo) Dec 22, 2007.
- ⑦ Oshima M, Oguma K, and Oshima H. Gastric tumorigenesis through Wnt signaling and host inflammatory responses: *12th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, (Sapporo) Dec 22, 2007.
- ⑧ 朴 英実, 杜宇琛, 大島浩子, (他 4 名, 3 および 7 番目)「皮膚表皮 JB6P+細胞の形質転換における 12-リポキシゲナーゼの促進作用」第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会合同大会 (横浜: 2007 年 12 月 14 日)
- ⑨ 大島正伸「消化器がん発生における PGE₂ とマクロファージの役割の解析」第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会合同大会 (横浜: 2007 年 12 月 11 日)
- ⑩ 小熊圭祐, 大島浩子, 仲 一仁, 平尾 敦, 大島正伸「活性化マクロファージによる Wnt シグナルの亢進」第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜: 2007 年 10 月 4 日)
- ⑪ 大島正伸, 大島浩子, 武藤 誠「Wnt シグナルと PGE₂ 経路の活性化による胃がん発生モデルマウス」第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜: 2007 年 10 月 4 日)

- ⑫ 大島正伸「Wnt シグナルと COX-2/PGE₂ 経路の相互作用による消化器発がん」第 25 回日本ヒト細胞学会学術総会（東京：2007 年 8 月 4 日）
- ⑬ 朴 英実, 吉本谷博, 大島正伸「JB6 P+細胞の形質転換における 12-リボキシゲナーゼの役割」第 49 回日本脂質生化学会（札幌：2007 年 6 月 5 日）
- ⑭ Oshima M, Oshima H, Taketo MM. Mouse model of gastric cancer by simultaneous activation of Wnt and PGE₂ pathways. *Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR)*, (Los Angeles) Apr 18, 2007.

〔図書〕（計 1 件）

Oshima M, Oshima H, and Taketo MM. Prostaglandin and transforming growth factor- β signaling in gastric cancer. In *The Biology of Gastric Cancers*, Eds. by Wang TC. *et al.* Springer, pp513-540 , 2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 正伸 (OSHIMA MASANOBU)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号：40324610

(2)研究分担者

大島 浩子 (OSHIMA HIROKO)
[2007.4~2008.3]
金沢大学・がん研究所・助教
研究者番号：80362515

(3)連携研究者

大島 浩子 (OSHIMA HIROKO)
[2008.4~2009.3]
金沢大学・がん研究所・助教
研究者番号：80362515