

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591544

研究課題名（和文）大腸浸潤癌マウスモデルの作製

研究課題名（英文）Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression.

研究代表者

檜井 孝夫（HINOI TAKAO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・寄附講座講師

研究者番号：10444689

研究成果の概要：

腸粘膜の上皮細胞で特異的に遺伝子発現を調節できる遺伝子配列を利用して、大腸上皮細胞で大腸癌関連遺伝子である Apc の欠損をもったマウスを作製したところ、ヒトの大腸癌に非常によく似た大腸浸潤癌が自然発生した。このマウスは、大腸癌の発生、浸潤の機序に関する研究や、大腸癌の発生を誘発、抑制する物質の検出や抗癌剤の効果などを検証するために非常に有用な動物疾患モデルとなる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病としてのがんは現在国民の死因の第一位を占め、中でも大腸癌は生活様式の欧米化とともに近年増加傾向にあり、内視鏡的または外科的治療が有効でない場合は予後が不良であり、その病態の解明と治療法の確立は急務である。大腸癌の発癌メカニズムとしては、複数の遺伝子異常が蓄積して行く中で正常組織が良性の腺腫を経て癌化しやがて浸潤能や転移能を獲得するという多段階発癌 (Multi-step carcinogenesis) の概念が 1990 年に Fearon & Vogelstein によって発表され、広くコンセンサ

スを得ており、癌化に関与するいくつかの遺伝子がこれまでに同定されてきている。なかでも家族性大腸腺腫症の原因遺伝子 APC (Adenomatous Polyposis Coli) は、それが直接結合して分解速度を制御する  $\beta$ -catenin の細胞質内での蓄積により大腸癌関連遺伝子の発現を誘発することが明らかになっている。APC や  $\beta$ -catenin が関与する Wnt シグナル伝達系は、遺伝性の無い孤発性の大腸癌においても 90% 以上に認められることから、Wnt シグナル伝達系の異常を標的とした治療法が大腸癌の新しい治療法として注目されている。

Apc のノックアウトマウスとしては、1990年に報告された変異誘発物質 ENU による Apc 点変異マウス (Min マウス) が広く用いられているが、ポリープは主として小腸に出来ること、また原因不明の貧血により生後 2-3 ヶ月で衰弱死するため小腸ポリープが腺腫までに留まり、浸潤癌になりにくい事などから、改善の余地があった。また化学発癌モデルやヒトの培養細胞を異種移植した Xenograft のモデルは存在するが、いずれも自然発癌とは異なる遺伝学的変化や浸潤転移機序をもっており、ヒトの大腸癌モデルは無く、そのようなマウスモデルが作製できれば、様々な研究分野に有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

このような状況下において、私は 1998 年より、腸上皮細胞の分化と形態維持に重要な機能を持つとともに、大腸癌において分化度を決定する機能をもつ遺伝子として腸上皮細胞特異的のホメオボックス転写因子 CDX2 に着目して、一貫して研究を進めていた。CDX2 のプロモーター領域にある 9.5 kb の遺伝子配列(CDX2P-9.5kb)が、マウスの大腸上皮細胞において特異的に転写活性をもつことを見つけ、その遺伝子配列を応用して大腸上皮特異的コンディショナルノックアウトマウス(CDX2P-Cre, CPC)の作製に取り組んできた。本研究では、CPC マウスを利用してマウスの大腸上皮細胞で、大腸癌関連遺伝子 Apc の遺伝子異常を引き起こす自然発癌モデル CPC; Apc マウスを作製することにより、ヒトの大腸癌疾患モデルの作製を行い、そこで発生する大腸腫瘍の特性についての解析と、ヒトの大腸浸潤癌モデルとしての妥当性や再現性について検証をおこない、これを用いてヒトの大腸癌治療の疾患モデルになるかどうか検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸上皮特異的プロモーターの同定

腸上皮特異的のホメオボックス転写因子 CDX2 は、腸上皮細胞の分化と形態の維持に重要な機能を持つ事が知られているが、CDX2 が大腸癌や胃癌で発現抑制や異常発現をしている事から、これらのメカニズムを解明するために CDX2 のプロモーター領域を解析していた。培養細胞を使用した *in vitro* の実験、ならびにトランスジェニックマウスを使用した *in vivo* の実験で CDX2 のプロモーター領域にマウスの大腸上皮細胞で転写活性をもつ領域を同定した。この遺伝子配列をつかって大腸癌に関与している遺伝子をマウスの大腸上皮で特異的にノックアウト

するコンディショナルノックアウトマウスを作製する事が可能であると考えた。

(2) 大腸上皮細胞特異的 Cre マウスの作製  
マウスのゲノム上の特定の領域をノックアウトする方法に Cre/loxP システムがある。32 塩基からなる loxP 配列で挟まれたゲノム上の領域は Cre-recombinase という酵素によって組み換えがおこり除去され破壊されるため、通常の胚細胞ノックアウトマウスや体細胞でのノックアウトを行うために最も頻用され、再現性のある結果が得られる確立された手法である。私共が同定した CDX2 のプロモーター領域を使って大腸上皮細胞で転写活性を持つ 9.5 kb の領域 (CDX2P-9.5 kb) の下流に Cre-recombinase の cDNA を接続したトランスジーンを発現するマウスを作製した (CPC マウス)。CPC マウスでは、Cre-recombinase がマウスの大腸上皮細胞で発現することが確認された。

### (3) CPC; Apc マウスの作製

CDX2P-9.5kb-Cre; Apc loxP/+ (CPC;Apc) マウスを作製し、その経過を観察し、そこから得られた腫瘍細胞に対して各種抗体 (抗 b-catenin 抗体, 抗 p53 抗体など) で免疫組織染色を行い、ヒトの大腸癌の多くで異常を認める Wnt シグナル系伝達系や p53 シグナル系について解析を行った。次に Laser Microdissection 法を用いて腫瘍部から DNA を回収し、それから Apc, p53, Ras の遺伝子変異を解析した。また腫瘍部からの DNA を使ってマイクロサテライト不安定性について解析した。これらのデータからマウスの大腸で発生する腫瘍がヒトの大腸癌にどの程度類似しているかについて検討を加えた。

### (4) 発現誘導型ノックアウトマウスモデル

CDX2P-G22 Cre; Apc loxP/loxP マウスを作製した。CDX2 のプロモーター領域を応用した、新しい発現誘導型の Cre マウスの作製を試みた。CPC マウスの Cre-recombinase の第一メチオニンと第二コドンの間に 19 または 22 のグアニン塩基を挿入し、Cre-recombinase にフレームシフトを発生させ、通常の状態では Cre を発生されるモデルを作製した。Cre-recombinase が発生の段階で発現しないことから、Apc のホモのノックアウトマウスを作製することが可能となった。これらのマウスの腫瘍の発生について検証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸上皮特異的プロモーターの同定

CDX2P-9.5kb の配列に lacZ を結合してトランスジェニックマウスを作製したところ、CDX2P-9.5kb はマウスの大腸上皮細胞で特異的に転写活性を持つ事が確認された。



CDX2P-lacZマウスの消化管（青色の部分が発現活性のある領域）

(2) 大腸上皮細胞特異的 Cre マウスの作製  
CDXP-9.5kb-Cre マウス (CPC マウス) を作製し、Rosa26 マウスと交配して Cre の発現部位を解析したところ、大人のマウスでは、大腸上皮細胞に限局されていた。CDX2 は胎生期には caudal の部位に発現するため、それらの部位で胎生期に大腸以外の部位でノックアウトが起こる可能性が示唆された。

### (3) CPC; Apc マウスの作製

CPC;Apc マウスでは、生後数週間から遠位大腸と盲腸を中心に腫瘍が全例に発生し、生後 10 ヶ月後には 36 匹中 6 匹 (17%) のマウスで粘膜下に浸潤する腫瘍が出現した。これらの腫瘍ではヘテロにノックアウトした残りの正常な Apc 遺伝子が欠損しており、Apc 遺伝子の two hit により発癌していることが確認された。マウスでは性差があり、雄のマウスでは生後 4 ヶ月ころより対象群に比べて体重減少が顕著となった。腫瘍では beta-catenin の発現量が増加し、p53 の変異を示唆する免疫染色での陽性像が見られた。また腫瘍全体は 5-MeCyd 抗体で染色されず、広範な DNA メチレーション低下状態が認められた。ヒトの大腸癌で高頻度に変異をもつ Ras や RAF では変異がみとめられなかった。(Cancer Res 2007)



(4) 発現誘導型ノックアウトマウスモデル  
CDX2 のプロモーター配列の下流に Cre-recombinase を結合させた CDX2P-Cre マウスの成功とともに、Cre の発現を誘導できる新しいしかけを組みこんだ Cre マウスを作製し

た。CDX2P-G22-Cre マウスでは Cre のアミノ酸配列をコードする第一メチオニンの第二アミノ酸の間に 22 個の G (グアニン塩基) を挿入して Cre-recombinase にフレームシフトを作造的に作り、この G22 が腸上皮細胞におけるマイクロサテライト不安定性によってランダムに 3 の倍数になった時、Cre が full length の蛋白質として発現し、loxP 配列のリコンビネーションを引き起こすようにした。Apc のホモの loxP をもつマウスでは、生後 1 ヶ月以内に全てのマウスが腫瘍死した。このことから、この CDX2P-G22Cre マウスでは、Apc が早期からノックアウトされ、多発性の腫瘍が発生することが確認された。(Nature Method 2008)

いずれのマウスモデルも、大腸癌疾患モデルとして非常に有用であることが本研究で確認され、今後、臨床治療への応用が期待される。

### 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 3 件)

1) Akyol, A., Hinoi, T., Feng, Y., Bommer, G.T., Glaser, T.M., Fearon, E.R. Generating somatic mosaicism with a Cre recombinase-microsatellite sequence transgene. *Nature Methods* (査読有) 5 巻 2008 年 P231-233.

2) Hinoi, T., Akyol, A., Theisen, B.K., Ferguson, D.O., Greenon, J.K., Williams, B.O., Cho, K.R., Fearon, E.R. Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation. *Cancer Res.* (査読有) 67 巻, 2007 年, P9721-9730

3) Feng, Y., Bommer, G.T., Zhai, Y., Akyol, A., Hinoi, T., Winer, I., Lin H.V., Cadigan, K.M., Cho, K.R., Fearon, E.R. Drosophila split ends homologue SHARP functions as a positive regulator of Wnt/beta-catenin/T-cell factor signaling in neoplastic transformation. *Cancer Res.* (査読有) 67 巻 2007 年 P482-491

[学会発表] (計 2 件)

1) 檜井 孝夫, 大腸癌の遺伝子レベルでの解明と分子標的治療へのとりくみ、日本外科学会定期学術集会、2008 年 5 月 16 日、長崎

2) 檜井 孝夫, マウス大腸上皮特異的プロモーターを応用した新しい大腸関連疾患 (大腸癌) マウスモデルの開発、第 107 回日本外科学会定期学術集会 2007 年 4 月 13 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜井 孝夫 (HINOI TAKAO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・寄附講座講師

研究者番号：10444689

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者