

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 23 日現在

機関番号：86301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20591966

研究課題名（和文）：各種動物モデルを用いた子宮頸癌発生における IGF-1 および同関連分子の役割の解明

研究課題名（英文）：Analysis of A Role of IGF-1 and Its Associated Molecules in Cervical Carcinogenesis Using Animal Models (Transgenic Mice)

研究代表者：

松元 隆 (MATSUMOTO TAKASHI)

独立行政法人国立病院機構 四国がんセンター

臨床研究センター・がん診断治療開発部・がん治療開発室・室長

研究者番号：20346670

研究成果の概要(和文):近年,子宮頸癌のリスクとして高い血中 IGF-1 濃度が報告されている。本研究においてわれわれは,子宮頸部に IGF-1 が過剰発現している遺伝子改変マウスを作製し,同マウスにおいて子宮頸部上皮内腫瘍が発生していることを明らかにした(頻度:21%)。また,同マウスにおいて癌抑制遺伝子 PTEN または Bax の欠損が加わることでその腫瘍発生がより促進され,癌抑制遺伝子 p53 の欠損により浸潤癌の発生が観察された。

研究成果の概要(英文): Serum levels of IGF-1 have been identified as risk factors for cervical cancer. In this study, we generated transgenic (Tg) mice that overexpressed an IGF-1 in uterine cervix. IGF-1 Tg mice developed cervical intraepithelial neoplasia (20% incidence). Furthermore, we examined the impact of loss of tumor suppressor genes associated with cervical carcinogenesis on IGF-1-mediated tumor promotion in uterine cervix of IGF-1 Tg mice. IGF-1 Tg mice deficient in PTEN and Bax were more sensitive to tumor promotion of uterine cervix, and p53 deficiency cooperates with increased IGF-1 signaling to drive tumor progression.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮頸癌, 動物モデル, トランスジェニックマウス, 腫瘍発生, IGF-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮がん検診の普及および治療法の確立により進行子宮頸癌の頻度は減少し、死亡率はこの40年間で約1/3になった。しかし、依然として子宮頸癌は婦人科悪性腫瘍の中でも最も頻度が高い疾患である。子宮頸癌の病因としてHPV (human papilloma virus) の関与は既に明らかとなり、子宮頸癌の約90%にHPV感染が認められる。しかし、HPV感染者のほとんどは子宮頸癌を発生することなく、またHPV16あるいはその転写産物であるE6/E7トランスジェニックマウス(Tgマウス)においても子宮頸部病変は異形成にとどまり、浸潤癌は発生しない。そこで、HPV感染と同時に存在する発癌関連遺伝子の異常が近年重要と考えられている。現在のところ子宮頸癌との関係が議論されている遺伝子としてはEGF-R (epidermal growth factor receptor), c-erbB2/HER2, c-myc, ras等があり、癌抑制遺伝子としてはp53が報告されているが、子宮頸癌発生メカニズムについてはいまだ解明されていない。

(2) また、悪性腫瘍に限らず各疾患の動物モデルは病態解明のために非常に有用であり、近年、遺伝子操作技術の発達とともにTgマウスやノックアウトマウス(Koマウス)などの遺伝子改変マウスが動物モデルとして汎用されている。しかし、現在のところ子宮頸癌において有用な動物モデルは存在せず、その開発が望まれている。

(3) われわれはこれまでに種々の発癌関連遺伝子(c-src, c-erbB2, IGF-1, E2F1)のTgマウスを作成し、これらのマウスにおいて皮膚癌、胆嚢癌、前立腺癌などが発生することを明らかにしてきた(Mol Carcinog 40:189-200, 2004, Oncogene 22:5415-5426, 2003, Proc AACR 43:1549, 2002, Mol Carcinog 33:146-155, 2002, Cancer Res 61:6971-6976, 2001, Oncogene 19:4243-4254, 2000, Cancer Res 60:1561-1570, 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:3455-3460, 2000)。婦人科領域の腫瘍では、転写因子であるE2F1を過剰発現させたマウス(K5 E2F1 Tgマウス)において子宮頸癌が発生していることを明らかにし(Oncogene 22:5415-5426, 2003, 平成15・16年度科学研究費/基盤C)、癌遺伝子であるc-srcを過剰発現させたマウス(K5 src Tgマウス)において子宮頸癌が発生していることを見出した(Proc AACR, 45:5106, 2004, 平成17・18年度科学研究費/基盤C)。

(4) IGF-1受容体(IGF-1R)の活性化はMAPKおよびPI3Kシグナリングを介してmitogenesisを誘導し、apoptosisを抑制す

る。脳・肝・結腸・前立腺・子宮頸部などのヒト腫瘍においてIGF-1およびIGF-Rは過剰発現しており、血中IGF-1濃度は肺癌・乳癌・前立腺癌・子宮頸癌の正のリスクファクターとなり、IGF-1の結合蛋白の一つであるIGF-BP3の血中濃度はこれらの負のリスクファクターとなる。

(5) K5 IGF-1 Tgマウスはkeratin 5 (K5)をプロモーターにしており、K5が発現している細胞でのみ標的遺伝子であるIGF-1が過剰発現される。われわれは同マウスにおける皮膚癌(Cancer Res 60:1561-1570, 2000)と前立腺癌(Proc Natl Acad Sci USA 97:3455-3460, 2000)の発生を報告してきた。また、近年われわれはK5 IGF-1 Tgマウスにおいて子宮頸癌が発生していることを新たに見出した(Proc AACR, 46:1097, 2005)。本研究はこれらの研究成果を踏まえて計画したものである。

2. 研究の目的

前項の様な背景のなかで、本研究ではK5 IGF-1 Tgマウスにおける正確な子宮頸癌発生頻度をまず解析し、子宮頸癌組織におけるIGF-1関連分子の発現を正常マウス子宮頸部組織と比較することで、この動物モデルにおける子宮頸癌発生のメカニズムを解明したい。また、これらの動物実験より得られたデータを基にしてヒト子宮頸癌症例におけるIGF-1関連分子を解析し、最終的にはヒトにおいて子宮頸癌発生メカニズムを解明したい。

3. 研究の方法

(1) K5 IGF-1 Tgマウスにおける子宮頸癌発生頻度の解析

K5 IGF-1 Tgマウスを交配・繁殖させることで150匹のマウスを飼育し、6ヶ月、12ヶ月および18ヶ月と経時的に50匹ずつ安楽死させ、雌性生殖器を採取する。繁殖の際にはTail DNAを抽出し、PCRによりgenotypeを確認する。同時に150匹の野生型姉妹マウスを飼育し、同様に解析する。採取した組織より病理組織標本(H&E染色)を作製し、子宮頸癌の発生頻度を解析する。病理診断は複数の病理医によるブラインドの診断を行う。

(2) K5 IGF-1 Tgマウスにおける子宮頸癌発生に対する各種癌抑制遺伝子の影響の解析

K5 IGF-1 Tgマウスを各種ノックアウトマウス(p53, PTEN, Baxなど)と交配し、K5 IGF-1 Tgマウスに発生する子宮頸部病変に及ぼす影響を解析する。

* 上記 (1) ~ (2) の実験は従来われわれが行ってきた方法で遂行する (Mol Carcinog 40;189-200, 2004, Cancer Res 63;4819-4828, 2003, Oncogene 22;5415-5426, 2003, Mol Carcinog 33;146-155, 2002)。

4. 研究成果

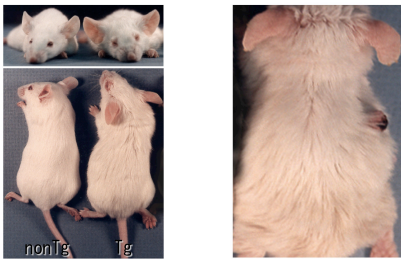
(1) K5 IGF-1 Tg マウスにおける子宮頸癌発生頻度の解析

K5 IGF-1 Tg マウスを作製する際に使用した DNA construct および肉眼所見を図 1 に示す。表皮肥厚を反映し全身の体毛は毛羽立ち、特に、眼瞼粘膜は著明に肥厚し、耳介は肥大する。また、皮膚乳頭腫が自然発生し、扁平上皮癌も約 50% の頻度で発生する。

図1 K5 IGF-1トランスジェニックマウス
DNA construct

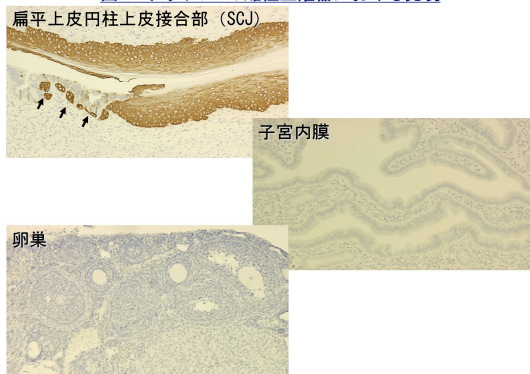
5' - BK5 promoter β-globin intron IGF-1 cDNA SV40 poly A 3'

肉眼所見



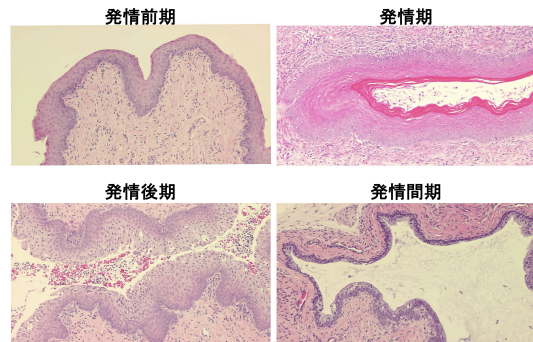
プロモーターとして用いたケラチン 5 (K5) の雌性生殖器官での発現を図 2 に示す。K5 の発現は子宮頸部扁平上皮には認められるが、子宮頸部円柱上皮には認めない。また、扁平上皮円柱上皮接合部の予備細胞にも発現を認める。子宮内膜、卵巣表層上皮には発現をみない。

図2 ケラチン5の雌性生殖器官における発現



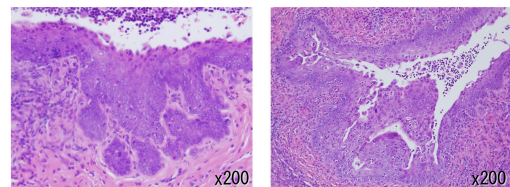
正常子宮頸部上皮を図 3 に示す。子宮頸部上皮は発情周期により形態学的に劇的に変化する。

図3 子宮頸部上皮における発情周期による変化



K5 IGF-1 Tg マウスにおいて自然発生する子宮頸部上皮内腫瘍 3 度 (CIN3) とその頻度を図 4 に示す。K5 IGF-1 Tg マウス (12 ヶ月齢) における子宮頸部病変は上皮内にとどまり、その頻度は 21% (5/24) であった。

図4 K5 IGF-1トランスジェニックマウスにおけるCIN3



Genotype	CIN 3
Nontransgenic mice	0 / 35 (0%)
Transgenic mice	5 / 24 (21%)

(2) K5 IGF-1 Tg マウスにおける子宮頸癌発生に対する各種癌抑制遺伝子の影響の解析

① K5 IGF-1 Tg マウスを p53 ノックアウトマウス (Ko マウス) と交配させることで (図 5), 浸潤癌が発生することを明らかにした (14%, 2/14, 図 6・7)。

図5 IGF-1 Tg & p53 (+/-) マウスの作製

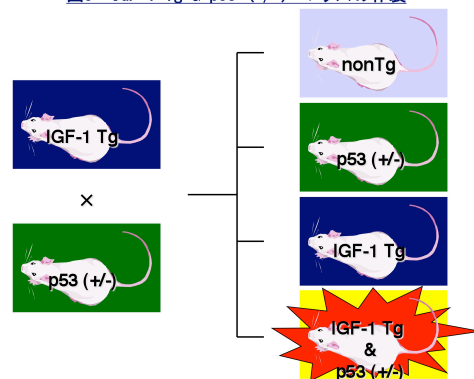


図6 IGF-1 Tg & p53 (+/-) マウスにおける子宮頸部病変

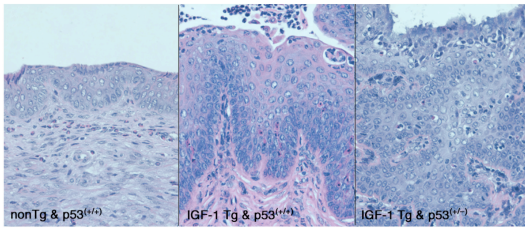


図7 IGF-1 Tg & p53 (+/-) マウスにおける子宮頸部病変の発生頻度

Genotype	CIN3 + SCC	SCC
IGF-1 Tg/p53 (+/-)	4 / 14 (29%)	2 / 14 (14%)
IGF-1 Tg/p53 (+/+)	1 / 5 (25%)	0 / 5 (0%)
nonTg/p53 (+/-)	0 / 8 (0%)	0 / 8 (0%)
nonTg/p53 (+/+)	0 / 5 (0%)	0 / 5 (0%)

SCC, 扁平上皮癌

②K5 IGF-1 Tg マウスを PTEN Ko マウスおよび Bax Ko マウスと交配させることで (図 8・11), CIN3 の発生頻度をそれぞれ 50% (5/10) および 63% (5/8) へとより高頻度とすることができた (図 9・10・12・13)。

図8 IGF-1 Tg & PTEN (+/-) マウスの作製

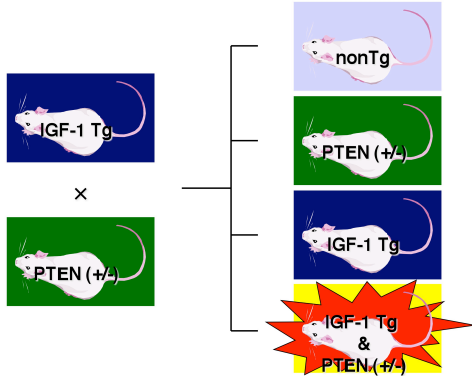


図9 IGF-1 Tg & PTEN (+/-) マウスにおける子宮頸部病変

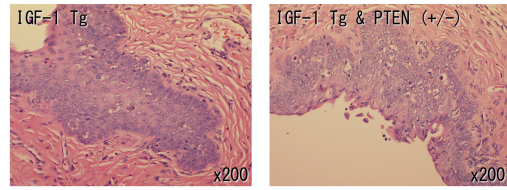


図10 IGF-1 Tg & PTEN (+/-) マウスにおける子宮頸部病変の発生頻度

Genotype	CIN 3
IGF-1 Tg/PTEN (+/-)	5 / 10 (50%)
IGF-1 Tg/PTEN (+/+)	5 / 20 (25%)
nonTg/PTEN (+/-)	0 / 10 (0%)
nonTg/PTEN (+/+)	0 / 15 (0%)

図11 IGF-1 Tg & Bax (+/-) マウスにおける子宮頸部病変

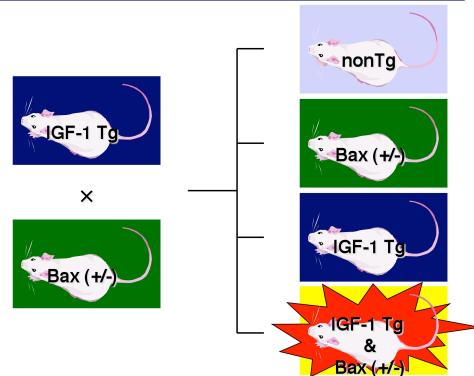


図12 IGF-1 Tg & Bax (+/-) マウスにおける子宮頸部病変

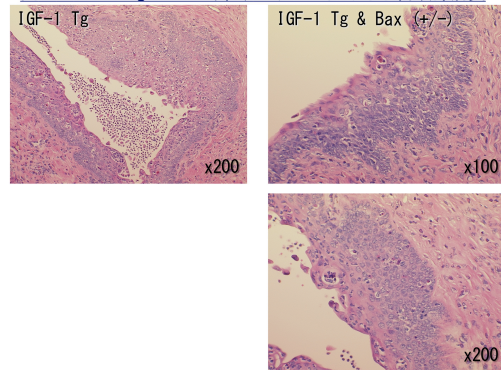


図13 IGF-1 Tg & Bax (+/-) マウスにおける
子宮頸部病変の発生頻度

Genotype	CIN 3
IGF-1 Tg/Bax (+/-)	5 / 8 (63%)
IGF-1 Tg/Bax (+/+)	6 / 13 (46%)
nonTg/Bax (+/-)	0 / 7 (0%)
nonTg/Bax (+/+)	0 / 12 (0%)

③これらの所見より、増殖因子の一つである IGF-1 の持続的な発現は子宮頸部において腫瘍発生をもたらし、また PTEN および Bax の欠損が加わることでその腫瘍発生はより促進され、さらに p53 の欠損は腫瘍進行に関連していることを示していると考えられた。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takashi Matsumoto, Masamichi Hiura, Takayoshi Nogawa, Atsumi Kojima, Shin-Ichi Okame, Yuko Shiroyama, Takashi Yokoyama, Kazuo Miyoshi. Overexpression of E2F transcription factor 1 in epithelium of uterine cervix results in development of squamous cell carcinoma in transgenic mice. 64th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. August 13, 2012, Kobe.
- ② Takashi Matsumoto, Yuko Shiroyama, Takashi Yokoyama, Takayoshi Nogawa, Masamichi Hiura, Kazuo Miyoshi, Overexpression of growth factors/oncogenes in epithelium of uterine cervix results in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in transgenic mice. 63th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. August 29, 2011, Osaka.
- ③ Takashi Matsumoto, Masamichi Hiura, Yuko Shiroyama, Junko Wroblewski,

Hiroko Mise, Takashi Yokoyama, Takayoshi Nogawa, Kazuo Miyoshi. Impact of deficiency of tumor suppressor genes on tumor development in uterine cervix of IGF-1 transgenic mice. 62th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. April 23, 2010, Tokyo.

- ④ Takashi Matsumoto, Kaoru Kiguchi, Linda Beltran, Kazuo Miyoshi, Katsumi Kito, Takayoshi Nogawa, Masamichi Hiura, Norifumi Ueda, John Digiovanni. Impact of p53 deficiency on development of tumors in uterine cervix of IGF-1 transgenic mice. 100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research. April 22, 2009, Denver.
- ⑤ Takashi Matsumoto, Masamichi Hiura, Yuko Shiroyama, Junko Wroblewski, Takashi Yokoyama, Takayoshi Nogawa. Impact of bax deficiency on tumor development of uterine cervix in IGF-1 transgenic mice. 61th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. April 3, 2009, Kyoto.
- ⑥ Takashi Matsumoto, Masamichi Hiura, Yuko Shiroyama, Junko Wroblewski, Takashi Yokoyama, Takayoshi Nogawa, Kazuo Miyoshi. Impact of PTEN deficiency on tumor development of uterine cervix in IGF-1 transgenic mice. 60th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. April 13, 2008, Yokohama.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松元 隆 (MATSUMOTO TAKASHI)
独立行政法人 国立病院機構 四国がんセンター 臨床研究センター がん診断治療開発部 がん治療開発室・室長

研究者番号：20346670

(2)研究分担者

井口 東郎 (IGUCHI HARUO)

独立行政法人 国立病院機構 四国がんセンター 臨床研究センター・センター長

研究者番号：90393438

杉田 敦郎 (SUGITA ATSURO)

愛媛大学 医学部附属病院・准教授

研究者番号：60179140

(H 2 2～H 2 3)

植田 規史 (UEDA NORIFUMI)

愛媛大学医学研究科・教授

研究者番号：30030886

(H 2 0～H 2 1)

ウロブレスキ 順子 (WROBLEWSKI JUNKO)

独立行政法人 国立病院機構 四国がんセンター 臨床研究部・医師

研究者番号：80463488

(H 2 0～H 2 1)