

## 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 5月25日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591702

研究課題名（和文）慢性炎症を基盤とした消化器発癌の分子機序解明

研究課題名（英文）The study of molecular mechanism for gastrointestinal carcinogenesis derived from chronic inflammation

研究代表者

吉永 敬士（YOSHINAGA KEIJI）

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：90507790

研究成果の概要（和文）：

われわれは*in vivo*における潜在型TGF- $\beta$ 1活性化の機序を解析するために潜在型TGF- $\beta$ 1を変異させLTBPと結合を不可能にしたマウス(変異型TGF- $\beta$ 1ノックインマウス)において、生後4週から肺炎、心筋炎、大腸炎を発症し、生後8・12週で炎症が慢性化することがわかった。また、炎症が慢性化した後から胃癌、直腸癌、肛門癌を自然発症することを見出した。さらに大腸炎の腸管の遺伝子発現解析で、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN $\gamma$ の発現上昇を認め、IL-17の発現低下を認めた。また、免疫染色による解析でも腸管粘膜上皮のIL-6の発現亢進、リン酸化STAT3の核発現の亢進を認め、Ki67の発現も亢進し、粘膜上皮の過形成も認めたことから、IL-6などのサイトカイン発現亢進が腸管上皮で生じ、STAT3の活性化を介して、腸管上皮の増殖が亢進することが示唆される結果となった。

また、腸管粘膜リンパ球の解析ではFoxp3発現Tリンパ球とIL-17発現Tリンパ球の低下とIFN $\gamma$ 発現Tリンパ球の増加を認めたことから、腸管上皮ではTh1が優位で、TregやTh17が低下していることが示唆された。

また、インテグリン $\beta$ 8ノックアウト、変異TGF- $\beta$ 1ノックインマウスの解析では、胃癌の発症が66.7%、大腸癌が16.7%、直腸癌が60.0%に発症することがわかった（論文作成中）。

さらに、細胞性免疫のないRag2ノックアウトマウスと変異TGF- $\beta$ 1ノックインマウスとの交配で、プレリミナリーではあるが、マウスの発癌が減少することがわかった。これらのことから、TGF- $\beta$ 1の活性化が低下した環境下でのDCを介した特異的細胞性免疫の欠如は発癌に寄与するが、細胞性免疫自体が無い状況では、逆に発癌が生じにくくなることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the mutated TGF- $\beta$ 1 knock-in mouse which mutated latent type TGF- $\beta$ 1 and made combination impossible with LTBP in order that we might analyze the mechanism of the latent type TGF- $\beta$ 1 activation *in vivo*, It turned out that the symptoms of pneumonia, a cardiac muscle inflammation, and colitis are shown from after 4 weeks old, and inflammation becomes chronic in after 8 to 12 week of age.

It found out that spontaneous stomach cancer, rectal cancer, and anal cancer, after inflammation becomes chronic was observed. Furthermore, by the gene expression analysis of colorectum with colitis, the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  were elevated, and that of IL-17 was decreased.

The immunohistochemical analysis showed the increase of IL-6 expression in colorectal epithelium, and elevated signals of phosphorylation STAT3 and Ki67 in nucleus. It is indicated that cytokine expression of IL-6 etc. mediated in the colorectal epithelium may induce the hyperplasia in colorectal epithelium through activation of STAT3.

Moreover, in the analysis of the colorectal mucosal lymphocyte, Foxp3 positive T lymphocyte and an IL-17 positive T lymphocyte and the increase in an IFN- $\gamma$  positive T lymphocyte were observed. In colorectal epithelium, it was suggested that Th1 was

dominant and that the population of Treg and Th17 are decreased.

In the analysis of integrin  $\beta 8$  knockout and a mutated TGF- $\beta 1$  knock-in mouse, it turned out that the incidence of stomach, rectal and colon cancer was 60.0% 16.7% and 66.7%, respectively (under paper preparation).

We got preliminary data which showed that mating with Rag2 knockout mouse and a mutated TGF- $\beta 1$  knock-in mouse, it turned out that the incidence of carcinoma was decreased. Under the environment of low activation of TGF- $\beta 1$ , lack of the cytospecific immunity which is mediated by DC contributes to carcinogenesis in gastrointestinal tract, however, in the situation without the cell immunity itself, it is conversely difficult to mediate carcinogenesis in gastrointestinal tract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
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・消化器外科学

キーワード：

- ・ TGF- $\beta$
- ・ 自然発癌

#### 1. 研究開始当初の背景

Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ は細胞レベルにおいて増殖、分化、アポトーシス等を制御しており、さらに細胞外基質や接着因子の発現調節を介し、他の増殖因子やサイトカイン、ホルモンの誘導など生体において多様な機能を有し、生体機能を制御している。また、個体レベルにおいては炎症、創傷治癒、発癌、ホメオスタシスの維持において極めて重要な役割を果たしている。

TGF  $\beta$ は潜在型 Latent Associated Protein (LAP) とともに二量体を形成し (small latent complex: SLO)、潜在型 TGF  $\beta$  結合タンパク (Latent TGF  $\beta$  Binding Protein: LTB $\beta$ ) とジスルフィド結合によって結合し Large Latent Complex (LLC) を形成。この LLC を形成した TGF  $\beta$  は細胞外に分泌され、潜在型として細胞外マトリックスに存在している。

この潜在型 TGF  $\beta$  の活性化はインテグリンなどの細胞接着分子、セリンプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ等で調節を受けている。また、LTB $\beta$  4 ノックアウトマウスや TGF  $\beta$  の伝達分子 Smad4 を T 細胞でノックアウトしたマウスには大腸癌が発症することが報告され、生体における TGF  $\beta 1$  活性化や TGF  $\beta 1$  を介した免疫の異常が消化器癌自然発癌に関与することが示唆されている。

われわれは *in vivo* における潜在型 TGF  $\beta 1$  活性化の機序を解析するために潜在型 TGF  $\beta 1$  を変異させ LTB $\beta$  と結合を不可能にしたマウス (変異型 TGF  $\beta 1$  ノックインマウス) を作成し、肺炎、心筋炎、大腸炎の他、胃癌、直腸癌、肛門癌を自然発症することを発見した。このことから潜在型 TGF  $\beta 1$  と LTB $\beta$  の結合は慢性炎症を介して、消化器癌自然発癌に関与することが示唆され、この変異型 TGF  $\beta 1$

ノックインマウスモデルを用い、消化器癌発癌過程を免疫学的、組織学的レベルで詳細な解析を行うことは消化器癌発癌の機序解明の一助となることが示唆される。

## 2. 研究の目的

変異型 **TGF $\beta$ 1** 遺伝子ノックインマウスは自然発癌が生後8週からと極めて若い時期に発症する。これまでの報告では、消化器癌の自然発癌が生後約10ヶ月要することを加味すると、**TGF $\beta$ 1** 遺伝子の遺伝子変異と **TGF $\beta$ 1** 活性化異常は既知の癌抑制遺伝子の変異と同等もしくはそれ以上に消化器癌発癌に関与することが示唆される。われわれは以上の実験により、変異型 **TGF $\beta$ 1** 遺伝子ノックインマウスの消化器組織で生じる細胞外マトリックスを中心とした炎症反応、**TGF $\beta$ 1** の活性化異常に起因すると考えられる消化器癌発癌の機序を明らかにすることで、ヒト自然発癌の機序を解明するための貴重な情報を得ることが可能となると考える。また、そこで得られた情報は、消化器癌の早期診断や発癌予測マーカーの検索、消化器癌治療の標的の検索、さらにその標的に対する創薬へと展開ができる可能性がある。

## 3. 研究の方法

これまでの研究で変異 **TGF $\beta$ 1** ノックインマウスで胃癌、直腸・肛門癌が生後8週から発症すること、発癌前の胃、直腸・肛門粘膜細胞増殖が亢進することが確認され、このマウスでは **TGF $\beta$ 1** 活性化異常に起因すると考えられる消化器癌が自然発症する際、慢性炎症が背景にあることが示唆される。慢性炎症の影響を評価する上で、組織におけるサイトカイン発現や免疫細胞のプロファイルを明らかにすることは、その発癌の分子機序を明らかにする上で極めて重要と考えられる。

その解析の手段として、サイトカインアレ

イを用いた包括的サイトカイン発現解析、フローサイトメトリー(**FACS**)を用いた免疫細胞のプロファイリング、**NF- $\kappa$ B** シグナルに注目した、免疫反応と発癌、造腫瘍能の評価、さらに、変異 **TGF $\beta$ 1** ノックインマウスでの **TGF $\beta$ 1** 活性化異常による免疫能の変化、サイトカイン発現の評価を行う。さらに、樹状細胞(**DC**)による **TGF $\beta$ 1** 活性化が与える影響を評価するためにインテグリン $\beta$ 8 ノックアウトマウスとの交配を行い、同様の検討を行う。さらにコンディショナル **TGF $\beta$ 1** ノックアウトマウスと交配させることで、コンディショナル変異 **TGF $\beta$ 1** ノックインマウスの作成を行い、各免疫細胞や腸管上皮や腸間膜の線維芽細胞特異的に変異 **TGF $\beta$ 1** を発現させ、その表現型を解析する。

## 4. 研究成果

われわれは **in vivo** での潜在型 **TGF $\beta$ 1** 活性化の機序を解析するために潜在型 **TGF $\beta$ 1** を変異させ **L1BP** と結合を不可能にしたマウス(変異型 **TGF $\beta$ 1** ノックインマウス)を作製し、このマウスにおいて生後4週から肺炎、心筋炎、大腸炎が発症し、生後8-12週で炎症が慢性化すること、この慢性炎症により胃癌、直腸癌、肛門癌を自然発症することを明らかにしてきた。さらにサイトカイン遺伝子発現検索や腸管粘膜リンパ球の解析の解析で **Treg** や **Th17** が低下しており、このことと慢性炎症の発症が生じることを明らかにした。

さらに、**TGF $\beta$ 1** ノックアウトと変異 **TGF $\beta$ 1** ノックインマウス交配を行い作製された **mil1** ノックインマウスの解析では、血漿中の活性型 **TGF $\beta$ 1**、潜在型 **TGF $\beta$ 1** 量はコントロールマウスに比べ、減少しており、生後12週のマウスでの胃癌の発症頻度は67%となることわかった。その一方で、直腸炎の頻度は減少し、それに伴い癌の発症頻度は減少することが解かり、胃癌と直腸癌では活性型 **TGF $\beta$ 1** 発現量と発癌との関連に機序の相違があることが示唆された。

生後12週の野生型、ホモの変異型マウスの胃および直腸組織から **DNA** を抽出し、ゲノム **CGH** アレイを行い、胃においてはコピー数が有意に増加した **locus** を4カ所、欠失した **locus** を11カ所、直腸においてはコピー数が有意に増加した **locus** を2カ所、欠失した **locus** を3カ

所同定した。

また、培養細胞株、臨床検体において潜在型 TGF $\beta$ 結合タンパク 2 および 4 の免疫組織化学染色法を用いて発現の解析を行い、癌細胞、組織で高発現していることを見いだした。

インテグリン $\beta$ 8ノックアウト, 変異TGF $\beta$  b1ノックインマウスの解析では、胃癌の発症が66.7%、大腸癌が16.7%、直腸癌が60.0%に発症することがわかった。

さらに、胃癌発症についてはヘリコバクター感染環境と非感染環境で変異 TGF $\beta$   $\beta$ 1 ノックインマウスを飼育し比較した結果、プレリミナリーではあるが、非感染環境のマウスの発症が減少することがわかった。これらのことから、活性型 TGF $\beta$   $\beta$ 1 が減少し、ヘリコバクター感染がある状況で、慢性炎症があると消化器癌の自然発症の可能性が高くなることが示唆された。

また、

#### 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)

[雑誌論文] (計9件)

1. Oki E, Zhao Y, Yoshida R, Masuda T, Ando K, Sugiyama M, Tokunaga E, **Morita M**, **Kakeji Y**, Maehara Y

Checkpoint with forkhead-associated and ring finger promoter hypermethylation correlates with microsatellite instability in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 15:2520-5, 2009

2. Zhao Y, Oki E, Ando K, **Morita M**, **Kakeji Y**, Maehara Y. The impact of a high-frequency microsatellite instability phenotype on the tumor location-related genetic differences in colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 196:133-9, 2010

3. Ando K, **Kakeji Y**, Kitao H, Iimori M, Zhao Y, Yoshida R, Oki E, **Yoshinaga K**, Matumoto T, **Morita M**, Sakaguchi Y, Maehara Y

High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci.* 101:639-45, 2010

4. Yoshida R, Miyashita K, Inoue M, Shimamoto A, Yan Z, Egashira A, Oki E, **Kakeji Y**, Oda S, Maehara Y. Concurrent genetic alterations in DNA polymerase proofreading and mismatch repair in human colorectal cancer. *Eur J Hum Genet.*19:320-5, 2011

5. Sugiyama M, **Kakeji Y**, Tsujitani S, Harada Y, Onimaru M, Yoshida K, Tanaka S, Emi Y, **Morita M**, Morodomi Y, Hasegawa M, Maehara Y, Yonemitsu Y. Antagonism of VEGF by genetically engineered dendritic cells is essential to induce antitumor immunity against malignant ascites. *Mol Cancer Ther.* 10:540-9, 2010.

6. Nakashima Y, Yao T, Hirahashi M, Aishima S, **Kakeji Y**, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Nuclear atypia grading score is a useful prognostic factor in papillary gastric adenocarcinoma. *Histopathology.* 59:841-9, 2011

7. Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, **Yoshinaga K**, Saeki H, **Morita M**, **Kakeji Y**, Gillespie DA, Yamamoto K, Takata M, Kitao H, Maehara Y. ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA Repair (Amst).* 11:247-58, 2012

8. Oki E, Hisamatsu Y, Ando K, Saeki H, **Kakeji Y**, Maehara Y. Clinical aspect and molecular mechanism of DNA aneuploidy in gastric cancers. *J Gastroenterol.* 47:351-8, 2012

9. Nakanishi R, Kitao H, Fujinaka Y, Yamashita N, Iimori M, Tokunaga E, Yamashita N, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. FANCJ Expression Predicts the Response to 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy in MLH1-Proficient Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 Apr 12. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計6件)

1. Perturbation of transforming growth factor (TGF)-beta1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors 100<sup>th</sup> American Association for Cancer Research (2009.5.18-22)

2. 胃癌細胞外マトリックスにおける TGF-β1 活性化のメカニズムと意義  
第13回日本がん分子標的治療学会 (2009.6.24-26)

3. 胃発癌における潜在型 TGF-β の役割  
5<sup>th</sup> Annual Academic Surgical Congress (2010.2.3-5)

4. 胃発癌における潜在型 TGF-β の役割  
第81回日本胃癌学会総会 (2010.3.4-6)

5. 慢性炎症を基盤とした消化器癌発癌と TGF-β 活性化との関連の解明  
第31回癌免疫外科研究会 (2010.5.21)

6. 慢性炎症を基盤とした消化器癌発癌マウスモデルからみた新規分子治療標的の解明  
第8回日本消化器外科学会大会 (2010.5.21)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 敬士 (YOSHINAGA KEIJI)  
九州大学・大学病院・特任助教  
研究者番号：90507790

(2) 研究分担者

掛地 吉弘 (KAKEJI YOSHIIRO)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：80284488

森田 勝 (MORITA MASARU)  
九州がんセンター・消化器外科・医師  
研究者番号：30294937

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：