

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590480

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた新しい大腸癌発生機構の解明

研究課題名(英文) Studies of novel mechanism of colorectal carcinogenesis by cyclin D1b-transgenic mouse

研究代表者

井上 寛一 (Inoue, Hirokazu)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30176440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期を制御するCyclin D1(a)のsplicing variantとして見出されたCyclin D1bは、正常組織ではほとんど発現していないが膀胱癌など多くのヒト癌組織で発現が検出される。我々はこのCyclin D1bのトランスジェニックマウスを作製し、この遺伝子が生体内で癌遺伝子として働くことを世界に先がけて証明し、直腸において雌特異的に前癌病変(SSA)から腺癌を発症するモデルマウスの樹立に成功した。またこの直腸腫瘍の発生にはCyclin D1bによるエストロゲンレセプターの発現亢進と細胞増殖シグナルを担うAktとErkの活性化が重要な役割を果たしていることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cyclin D1b, a splicing variant of cyclin D1, is hardly expressed in normal tissues but is frequently expressed in certain types of cancer tissues. To clarify the role of cyclin D1b in tumorigenesis, we developed cyclin D1b transgenic (Tg) mice and found the rectal tumors, including adenocarcinoma and sessile serrated adenoma (SSA) in 62.5% of female Tg mice. We also found that enhanced phosphorylation of Akt and Erk plays a critical role for rectal tumorigenesis by cyclin D1b. No rectal tumors were found in the ovariectomized female cyclin D1b Tg mice, indicating that female sex hormones played a critical role in rectal carcinogenesis in these Tg mice. Enhanced expression of estrogen receptor by cyclin D1b was involved in this female-specific rectal tumorigenesis. These cyclin D1b Tg mice would provide an excellent model system for investigating the molecular mechanism of development of SSA and the progression from these precancerous lesions to adenocarcinomas in colorectal cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Cyclin D1b トランスジェニックマウス 直腸腫瘍 エストロゲンレセプター Akt Erk

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに主として新規癌抑制遺伝子 Drs や Periostin の機能解析をとうして癌の悪性の分子機構の解明に取り組んできたが、最近、癌組織で特異的に発現している splicing variant の cyclin D1b についてもその遺伝子機能と癌発生との関係に着目して解析を始めた。cyclin D1(D1a)は CDK4/6 と結合し Rb 蛋白のリン酸化を制御することによって細胞周期の G1-S 制御に関与することが知られているが、この cyclin D1 に C 末端領域の alternative splicing によって生じる variant cyclin D1b の存在が最近明らかになって来た。cyclin D1b は核外輸送に必要なリン酸化部位 Thr286 を欠いており、核への局在が細胞癌化と関連していると考えられているがその機能と癌化における役割についてはまだ十分に明らかになっていない。我々はこれまでに膀胱癌の約 60% でこの cyclin D1b variant が発現しており、cyclin D1b が膀胱癌細胞の足場非依存性増殖や細胞浸潤の促進活性を持つことを明らかにしてきた。また、cyclin D1b は CDK4 との結合や Rb 蛋白のリン酸化促進活性を欠いていることも見出しており、cyclin D1b は cyclin D1a とは異なる遺伝子機能を持ち異なるメカニズムで癌化に関与していると考えられる

2. 研究の目的

上記の状況および結果をふまえ cyclin D1b の in vivo での腫瘍発生における役割を明らかにするために、ユビキタスに発現させる pCAGGS promoter を用いて Cyclin D1b-トランスジェニック(Tg)マウスを作製しその解析を行った。

3. 研究の方法

(1) できるだけ多くの Cyclin D1b-Tg マウスに発生する腫瘍について病理学的および分子生物学的解析を行う。

- (2) cyclin D1b-Tg マウスに発生した腫瘍から癌細胞株を確立し、cyclin D1b に対する siRNA を用いて cyclin D1b の機能と癌化形質発現との関連を明らかにする。
- (3) 上記実験で明らかになったシグナル経路の阻害剤などを使って腫瘍を発生したマウスに対して分子標的治療を試みる。

4. 研究成果

Cyclin D1b Tg マウスの腫瘍発生と進行に関する病理学的解析および分子機構の解析を行い以下の成果を得た。

(1) cyclin D1b-Tg マウスでは雌の 63% (15/24) に直腸腫瘍が発生することを見出した。これらの腫瘍について病理学的解析を行なったところ、全ての腫瘍でヒトの鋸歯状腺腫 (sessile serrated adenoma/polyp, SSA/P) にみられる病理像が認められた。また、これらの腫瘍のうち 53% (8/15) には腺癌 (adenocarcinoma) も認められた。これらの結果から、cyclin D1b は in vivo での癌発生に重要な役割を果たしていると考えられる。また、この cyclin D1b-Tg マウスは SSA/P の発生、SSA/P から腺癌への移行を病理学的、および分子生物学的に解析するための優れたモデル系になると考えられる。

(2) 雌特異的直腸腫瘍発生における性ホルモンの影響を検討するために雌 Tg マウスに卵巣切除手術を施したところ、直腸腫瘍発生が完全に抑えられた (0/10)。また雌 Tg マウスの直腸部および直腸腫瘍部では野性型 (マウスの直腸部に比べてエストロゲンレセプター-βの発現が上昇していた。このレセプターの発現上昇は雄 Tg マウスや卵巣を切除した雌 Tg マウスの直腸部では認められなかった。これらの結果から、この Cyclin D1b-Tg マウスの雌特異的直腸腫瘍発生にはエストロゲン/エストロゲンレセプター系が関与していることがわかった。

(3) cyclin D1b-Tg マウスの直腸腫瘍部におけ

る B-raf, K-ras 遺伝子のホットスポット点突然変異は見出されなかったが、直腸腫瘍部において細胞増殖のシグナル伝達を担う重要なキナーゼである Erk のリン酸化が顕著に上昇していることを見出した。

(4) この Tg マウスに生じた直腸腫瘍から腫瘍細胞株 D1bTgRT を樹立することに成功した。この腫瘍細胞株に siRNA を導入して cyclin D1b の発現を抑えると、足場非依存性増殖能、細胞浸潤能、ヌードマウスにおける造腫瘍能などの悪性化形質の発現が抑制された。また Erk のリン酸化も抑制された。これらの結果から cyclin D1b-Tg マウスにおける癌化形質の発現には cyclin D1b の発現と Erk の活性化が重要な役割を果たしていることがわかった。

(5) さらに癌化に関わる様々なシグナル伝達経路や癌関連遺伝子の変化を検討したところ、これらの直腸腫瘍では Erk 上流のキナーゼの MEK を介さずに Erk が活性化されていた。また、腫瘍では細胞の生存に関わる重要なキナーゼの Akt も活性化されていることを見いだした。

(6) 293T 細胞に transfection によって cyclinD1b を発現させると Erk と Akt の両方が活性化されたが MEK は活性化されなかった。このとき Akt 阻害剤を処理すると Erk の活性化も抑制されることを見いだした。

(7)直腸腫瘍由来の腫瘍細胞株 D1bTgRT においても、Akt 阻害剤を処理すると MEK を阻害することなしに Erk の活性が阻害された。また、D1bTgRT 細胞株はヌードマウスで腫瘍を形成するがこの腫瘍形成は Akt 阻害剤によって抑制された。

(8)ヒトの大腸および直腸癌の発生における cyclin D1b の役割を検討するために、滋賀医科大学付属病院においてインフォームドコンセントを得た大腸直腸癌の患者さんから手術で切除した癌組織における cyclin D1b mRNA の発現を RT-PCR 法で調べたところ

30例中3例に cyclin D1b mRNA の発現を検出することができた。この結果から、cyclin D1b は実際のヒト大腸直腸癌の発生にも関与している可能性が示唆された。

以上の cyclin D1b-Tg マウスの解析結果から、cyclin D1b は Akt の活性化を介して Erk を活性化することによって直腸腫瘍発生に関与していること、またエストロゲンとエストロゲンレセプターが雌特異的腫瘍発生に関与していることを明らかにした。Akt シグナルの阻害が cyclin D1b による腫瘍形成の抑制に重要であることも明らかにした。これらの結果は、cyclin D1b を発現している癌の治療戦略にとっても有用な結果であると考えられる。

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 12 件)

1. Tambe, Y., Hasebe, M., Kim, C. J., Yamamoto, A., Inoue, H. The drs tumor suppressor regulates glucose metabolism via lactate dehydrogenase-B. Mol. Carcinog. in press (査読有り)
2. Mukaisho K., Nakayama T, Hagiwara T, Hattori T, Sugihara H. Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: interactions among pH, Helicobacter pylori, and bile acids. Frontiers in Microbiology. in press. (査読有り)
3. Hagiwara T, Mukaisho K., Nakayama T, Hattori T, Sugihara H. Proton pump inhibitors and helicobacter pylori-associated pathogenesis. Asian Pac J Cancer Prev. 16(4): 1315-1319, 2015. (査読有り)
4. Vo DT, Nakayama T, Yamamoto H, Mukaisho K., Hattori T, Sugihara H. Progression risk assessments of individual non-invasive gastric neoplasms by genomic

copy-number profile and mucin phenotype. BMC Med Genomics. 18;8(1): 6, 2015. (査読有り)

5. Ojima E, Fujimura T, Oyama K, Tsukada T, Kinoshita J, Miyashita T, Tajima H, Fushida S, Harada SI, Mukaisho K, Hattori T, Ohta T. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma in a rat model by ursodeoxycholic acid. Clin Exp Med. 2014 Jul 18. (査読有り)

6. Mukaisho K, Hagiwara T, Nakayama T, Hattori T, Sugihara H. Potential mechanism of corpus-predominant gastritis after PPI therapy in Helicobacter pylori-positive patients with GERD. World J. Gastroenterol. 2;20(34):11962-11965, 2014. (査読有り)

7. Nitta N, Tsuchiya K, Otani H, Watanabe S, Mukaisho K, Tomozawa Y, Nagatani Y, Ohta S, Takahashi M, Murata K. Asialoerythropoietin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in rabbits by reducing inflammation. Sonoda A, Exp. Ther. Med. 8(5): 1443-1446, 2014. (査読有り)

8. Kim, C. J., Tambe, Y., Munkaisho, K., Sugihara, H., Isono, T., Sonoda, H., Shimizu, T., Kondoh, G., Inoue, H. Female-specific rectal carcinogenesis in cyclin D1b transgenic mice. Carcinogenesis 35: 227-236, 2014. (査読有り)

9. Matsuzaki J, Suzuki H, Tsugawa H, Watanabe M, Hossain S, Arai E, Saito Y, Sekine S, Akaike T, Kanai Y, Mukaisho K, Auwerx J, Hibi T. Bile acids increase levels of microRNAs 221 and 222, leading to degradation of CDX2 during esophageal carcinogenesis. Gastroenterology 145: 1300-1311, 2013. (査読有り)

10. Kim, C. J., Kubota, S., Murai, R. Diagnostic criteria for stomal obstruction of tubeless cutaneous ureterostomy using ^{99m}Tc-mercaptoacetyl triglycine (MAG3) diuretic renography. Korean J. Urol 54: 322-326, 2013. (査読有り)

11. Kim, C. J., Sano, T., Murai, R. Evaluations for

hydronephrosis after the establishment of tubeless cutaneous ureterostomy. Korean J. Urol. 54: 168-171, 2013. (査読有り)

12. Tambe, Y., Okuyama, N., Nakagawa, T., Muramoto, A., Hasebe, M., Chano, T., Inoue, H. Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. Cancer Lett. 314: 82-91, 2012. (査読有り)

[学会発表](計11件)

1. 旦部幸博、金哲将、井上寛一
LDH-B を介した drs 癌抑制遺伝子に寄るグルコース代謝の調節と癌化との関連
第37回日本分子生物学会年会 2014年(横浜)
2. 旦部幸博、金哲将、井上寛一
LDH-B を介した drs 癌抑制遺伝子に寄るグルコース代謝の調節と癌化との関連
第73回日本癌学会学術総会 2014年(横浜)
3. 金哲将、旦部幸博、向所賢一、杉原洋行、河内明宏、井上寛一
Cyclin D1b トランスジェニックマウスの雌性特異的直腸腫瘍における Akt 活性化の関与
第73回日本癌学会学術総会 2014年(横浜)
4. 旦部幸博、金哲将、向所賢一、杉原洋行、井上寛一
Cyclin D1b トランスジェニックマウスにおける雌性特異的直腸腫瘍発生の分子機構
第36回日本分子生物学会年会 2013年(神戸)
5. 旦部幸博、井上寛一
drs 癌抑制遺伝子による Warburg 効果制御の分子機構
第72回日本癌学会学術総会 2013年(横浜)
6. 旦部幸博、金哲将、向所賢一、杉原洋行、井上寛一
Cyclin D1b トランスジェニックマウスにおける雌性特異的直腸腫瘍発生の分子機構の解析
第72回日本癌学会学術総会 2013年(横浜)
7. 金哲将、旦部幸博、向所賢一、杉原洋行、磯野高敬、園田寛道、清水智治、近藤玄、井上寛一
Cyclin D1b トランスジェニックマウスにおける雌性特異的直腸腫瘍の発生
第35回日本分子生物学会年会 2012年(福岡)

8. 金哲将、旦部幸博、向所賢一、杉原洋行、磯野高敬、園田寛道、清水智治、近藤玄、井上寛一

Cyclin D1b トランスジェニックマウスにおける雌性特異的直腸腫瘍の発生
第35回日本分子生物学会年会 2012年(福岡)

9. Hirokazu Inoue, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaiho, Hiroyuki Sugihara, Takahiro Isono, Gen Kondoh, Chul Jang Kim.

In vivo and in vitro oncogenic potential of human cyclin D1b variant

第71回日本癌学会学術総会 2012年(横浜)

10. Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue.

The drs tumor suppressor gene is involved in regulation of Warburg effect.

第71回日本癌学会学術総会 2012年(横浜)

11. Shul Jang Kim, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaiho, Hiroyuki Sugihara, Takahiro Isono, Gen Kondoh, Hirokazu Inoue.

Studies on the oncogenic potential of rectal tumor developed in cyclic D1b transgenic mice.

第71回日本癌学会学術総会 2012年(横浜)

〔図書〕(計 1 件)

1. 「命を守る生体の機構と科学」
伊勢川裕二 編(共著)
武庫川女子大学出版部

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
井上 寛一 (HIROKAZU INOUE)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30176440

(2) 研究分担者
(0)

研究者番号：

(3) 連携研究者 (2 名)

1. 金 哲将 (TETSUSHOU KIN)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10204968

2. 向所 賢一 (KEN-ICHI MUKAISHO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50343223