

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650609

研究課題名(和文) 未分化型胃がんの *in vitro* での発がん過程の追跡

研究課題名(英文) Analysis of a mouse model of diffuse-type gastric cancer

研究代表者

湯浅 保仁 (YUASA, Yasuhito)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80111558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：未分化型胃がん(DGC)は、発症数と死亡数が多い胃がんの中でも特に予後が悪い。我々はヒトDGCに形態学的にも分子生物学的にもよく似た胃がんを発症する世界初のマウスモデル(DCKO)を作製し、その胃がんから初代培養細胞株(MDGC)を樹立することにも成功した。

マイクロアレイ解析の結果より、DCKOマウスのDGCではエピジェネティクス変化が生じていることが明らかになった。そこで、MDGC細胞株にエピジェネティクス治療薬を処理し、スフェア形成を顕著に阻害する薬剤を複数同定した。それらの薬剤は *in vivo* でも腫瘍増殖抑制効果を示し、エピジェネティクス治療薬によるDGC治療の糸口が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have reported an E-cadherin/p53 double conditional knockout (DCKO) mouse line as the first genetically engineered diffuse-type gastric cancer (DGC), which recapitulates human DGC morphologically and molecularly. Recently, we have also established mouse DGC (MDGC) cell lines from primary tumors and lymph node metastases of the DCKO mice. We observed that the expression levels of epigenetic modulators and frequently methylated genes were up- and down-regulated in mouse primary DGC, respectively. Treatment with some epigenetic inhibitors induced differentiation and attenuated sphere formation of the MDGC cell lines *in vitro*. Moreover, we could validate tumor-suppressing activity of these agents *in vivo*. These results suggest that epigenetic alterations may play significant roles in diffuse-type gastric carcinogenesis and support to develop a relevant therapeutic strategy in human DGC.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：胃がん マウスモデル 治療薬 E-カドヘリン p53 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃がん

胃がんは世界的に発症数と死亡数が多く、日本においても同様である。胃がんは、組織学的に明瞭な腺管構造をもつ分化型とがん細胞が散在する未分化型 (DGC=diffuse-type gastric cancer) に大別される。その中でも、スキルス胃がんによって代表される DGC は、浸潤が強く進行が速い、リンパ節転移や腹膜播種が多い、しばしば手術不能である、抗がん剤が効きにくいなどの特徴があり、予後が極めて悪い。しかし、その発症機構の解明には至っておらず、有効な治療方法も確立されていない。

(2) 胃がんマウスモデル

我々はヒト DGC でその異常が報告されている細胞接着分子 E-cadherin (*Cdh1* 遺伝子がコードする) とがん抑制因子 p53 (*Trp53* 遺伝子がコードする) を胃特異的に欠損する (DCKO=double conditional knockout) マウスを作製した。DCKO マウスは、1年以内に100%の頻度で DGC を発症し、約半数が消化管出血や幽門部狭窄により死亡する、その DGC は強い浸潤能とリンパ節転移能をもち、免疫不全マウス皮下移植で腫瘍を形成する、上皮間葉転換 (EMT=epithelial-mesenchymal transition) 関連遺伝子の発現亢進が認められるという特徴を有していた。我々は、ヒト DGC に形態学的にも分子生物学的にも類似した胃がんを発症する世界初のマウスモデルとして DCKO マウスを報告した。

(3) エピジェネティクス治療薬

固形がんを含めて多くの悪性腫瘍は根治が未だ困難である。細胞傷害作用を利用した第1世代の抗がん剤や、チロシンキナーゼなどの細胞増殖シグナルを標的とした第2世代の抗がん剤には、がん幹細胞や、細胞増殖シグナルに依存しないがん細胞の存在などの問題点がある。がん幹細胞の性質の維持には、EMT やエピジェネティクス変化が重要な役割を果たしていることが知られてきている。EMT を生じた KRAS 変異がん細胞株は KRAS シグナル経路に依存しないことや、EGFR 変異がん細胞株の中に存在するチロシンキナーゼ阻害薬に耐性をもつ細胞集団にはエピジェネティクス阻害薬が有効であることも報告されている。さらに、EMT を含む分化の可塑性もエピジェネティクス変化の結果であるという報告がある。

2. 研究の目的

DCKO マウスの DGC では、ヒトの胃がんで DNA メチル化などのエピジェネティクス変化が報告されている遺伝子群の発現低下と、それらのエピジェネティクス変化を制御する遺伝子群の発現上昇が認められ、エピジェネティクスががん化に重要な役割を果たしていることが推測された。そこで、我々が作製

した胃がんマウスモデルとその胃がん由来細胞株を活用して、既存のどのエピジェネティクス治療薬が胃がんの治療に有効であるか解析し、ヒト胃がん患者への臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

いずれの細胞株もコラーゲンコートディッシュ上で Ham ' s F12 培地+5% bovine serum または horse serum 内で培養した。

(2) 細胞増殖アッセイ

12 ウェルのコラーゲンコートプレートに各々 10^4 細胞/ウェルで播種し、12時間後に薬剤を投与し、さらに48時間後に MTT を利用して細胞増殖を解析した。

(3) スフェア形成能アッセイ

24 ウェルの Ultra-low attachment プレートに各々 10^3 細胞/ウェルで播種し、Ham ' s F12 培地+EGF/FGF/insulin/hydrocortisone 内で14日間培養し、スフェア数を算定した。

(4) 皮下移植腫瘍形成能アッセイ

KSN ノードマウスに各々 10^5 細胞/箇所を Matrigel と共に皮下注射し、14日後に腫瘍径が1cm前後となったことを確認し、薬剤投与を開始した。

(5) RNA 抽出と cDNA 合成

RNA 抽出は TRIzol (Life Technologies) を、cDNA 合成は Super Script III (Life Technologies) を使用した。

(6) マイクロアレイ解析

DCKO マウスの胃がん原発巣3症例をサンプルとして、正常マウスの胃粘膜上皮5症例をプールしたものをコントロールとして、Whole Mouse Genome Microarray Kit 4x44k (Agilent) を利用して解析した。

(7) RT-PCR

RT-PCR は Taq polymerase (Greiner) を、定量的 RT-PCR は LightCycler 480 SYBR Green (Roche) を使用した。*Gapdh* 遺伝子を内部コントロールとして解析した。

(8) メチル化特異的 PCR

Bisulfite 処理は Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek) を使用した。

4. 研究成果

[結果]

(1) DCKO マウスの DGC 由来細胞株の樹立と生物学的特性の評価

我々は DCKO マウスの胃がん原発巣とリンパ節転移巣から細胞株の樹立にも成功した。DCKO マウスの胃がん由来細胞株 (MDGC=*Cdh1*^{-/-}*Trp53*^{-/-} gastric cancer cell

line) と、p53 ノックアウトマウス胎仔の胃粘膜上皮由来細胞株 (GIF=*Trp53*^{-/-} gastric epithelial cell line) を比較すると、MDGC 細胞株は GIF 細胞株よりも 30 倍以上強いスフェア形成能をもつ (図 1a)。ヌードマウスに皮下移植すると、MDGC 細胞株は 10² 個の細胞でも腫瘍を形成するのに対して、GIF 細胞株は 10⁵ 個の細胞でも腫瘍を形成しない (図 1b)。MDGC 細胞株は細胞傷害性の抗がん剤 (5-Fluorouracil・Paclitaxel) に対して強い耐性をもつ (図 1c) ことがわかった。

図 1a

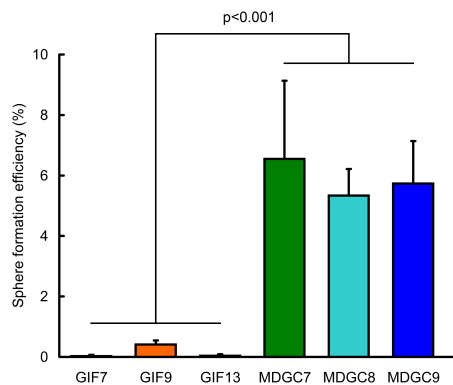
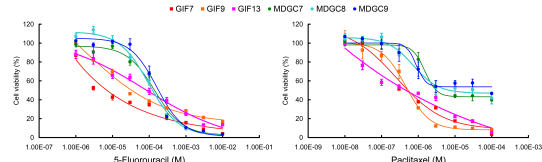


図 1b

	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	Frequency of tumorigenic cell
GIF7				0/4	0/6	$< 1/2_{136373}$
GIF9				0/4	2/6	$< 1/667543$
GIF13				0/4	0/6	$< 1/2_{136373}$
MDGC7	2/2	2/2	2/2	2/2		$> 1/428$
MDGC8	2/2	2/2	2/2	2/2		$> 1/428$
MDGC9	2/2	2/2	2/2	2/2		$> 1/428$

$p < 0.001$

図 1c



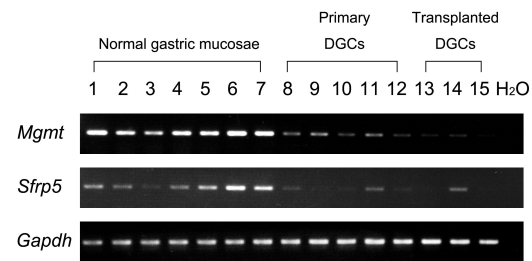
5-Fluorouracil と Paclitaxel の用量反応曲線。IC₅₀ は GIF 細胞株よりも MDGC 細胞株の方が高く、MDGC 細胞株は強い抗がん剤耐性をもつ。

(2) DCKO マウスの DGC のエピジェネティクス変化の解析

DCKO マウスの DGC のマイクロアレイ解析の結果より、DCKO マウスの DGC では、胃がんを含めた多くの悪性腫瘍で DNA メチル化が生じている遺伝子群の発現低下が認められた。実際に、*Mgmt* 遺伝子と *Sfrp5* 遺伝子については、RT-PCR 解析で発現低下 (図 2a) とメチル化特異的 PCR で DNA メチル化 (図 2b) が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、エピジェネティクス変化を制御する遺伝子群の発現上昇が認められ、定量的 RT-PCR 解析で *Dnmt3b* 遺伝子、*Suv39h1* 遺伝子、*Ezh2* 遺伝子の発現が有意に上昇していることが

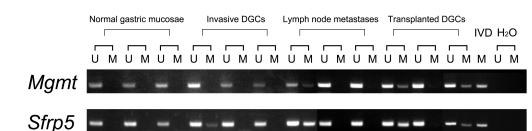
わかった (図 2c)。

図 2a



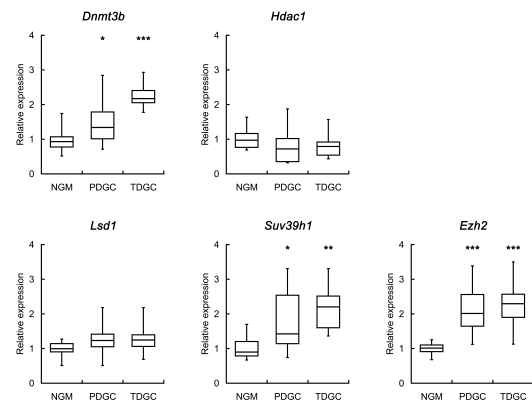
RT-PCR。マウスの正常胃粘膜 (Normal gastric mucosae) では高頻度メチル化遺伝子 *Mgmt* と *Sfrp5* が高発現しているのに対して、マウスの胃がん原発巣 (Primary DGCs) と移植腫瘍 (Transplanted DGCs) では発現が低下している。

図 2b



メチル化特異的 PCR。マウスの正常胃粘膜 (Normal gastric mucosae)、胃がん浸潤部 (Invasive DGCs)、リンパ節転移巣 (Lymph node metastases)、移植腫瘍 (Transplanted DGCs) と悪性度が高くなるに従い、メチル化が認められる。U: 非メチル化、M: メチル化、IVD: メチル化コントロール。

図 2c



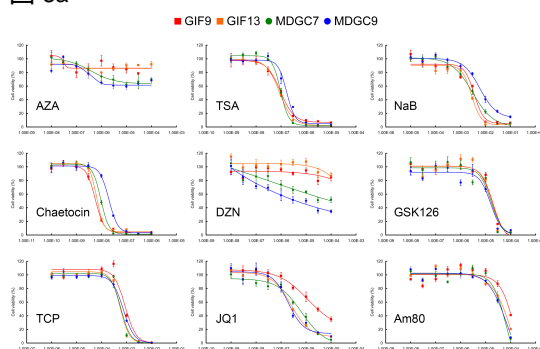
定量的 RT-PCR。エピジェネティクス制御遺伝子 *Dnmt3b*、*Suv39h1*、*Ezh2* は、マウスの正常胃粘膜 (NGM=normal gastric mucosae)、胃がん原発巣 (PDGC=primary DGCs)、移植腫瘍 (TDGC=transplanted DGCs) と悪性度が高くなるに従い、発現が亢進している。NGM: 13 症例、PDGC: 12 症例、TDGC: 7 症例。*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。

(3) 既存のエピジェネティクス治療薬のスクリーニング

MDGC 細胞株と GIF 細胞株に対して、DNA メチル化阻害剤 5-aza-dC (AZA)、ヒストン脱ア

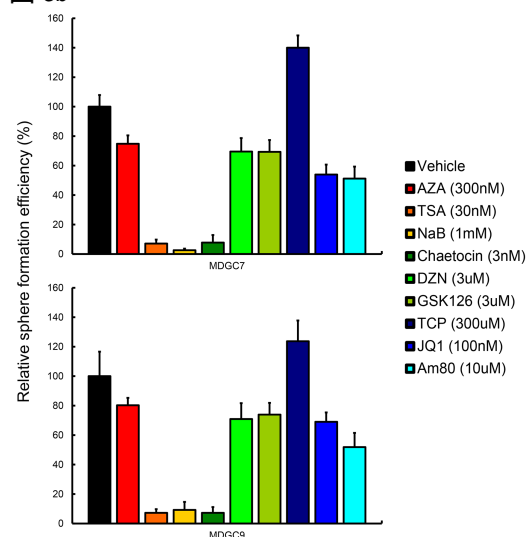
セチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 Trichostatin A (TSA) と Sodium butyrate (NaB)、Suv39h1 阻害剤 Chaetocin、Ezh2 阻害剤 3-deazaneplanocin A (DZN) と GSK126、Lsd1 阻害剤 Tranylcypromine (TCP)、Bromodomain 阻害剤 JQ1、ビタミン A 誘導体 Am80 などの既存のエピジェネティクス治療薬を処理した。その結果、AZA と DZN は MDGC 細胞株に対してのみ細胞増殖抑制を示し (図 3a)、TSA・NaB・DZN は MDGC 細胞株の形態変化を誘導した。さらに、各エピジェネティクス治療薬を低濃度 (IC_{50}) で処理してスフェア形成能アッセイを行ったところ、TSA・NaB・Chaetocin は顕著にスフェア形成を阻害し (図 3b)、TSA・NaB 処理群では分化傾向を示唆する空胞をもつ細胞も認められた。

図 3a



エピジェネティクス治療薬の用量反応曲線。AZA と DZN のみ IC_{50} が GIF 細胞株よりも MDGC 細胞株の方が低く、MDGC 細胞株特異的に作用している可能性が高い。

図 3b

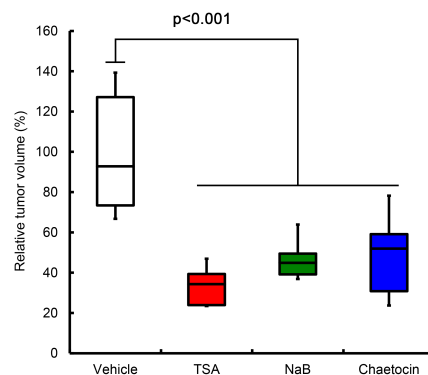


(4) エピジェネティクス治療薬の in vivo での効果検証

(1)より、in vitro でのスフェア形成能と in vivo での腫瘍形成能は相関しており、(3)のようにスフェア形成を阻害する薬剤は、腫瘍形成も阻害すると考えられた。そこで、MDGC 細胞株を皮下移植したヌードマウスに

対して TSA・NaB・Chaetocin を腹腔内投与したところ、腫瘍増大が有意に抑制された (図 4)。

図 4



ヌードマウス皮下移植腫瘍形成能アッセイを利用したエピジェネティクス治療薬の評価。Vehicle (5% Dimethyl sulfoxide)、TSA (10mg/kg/day)、NaB (1200mg/kg/day)、Chaetocin (0.5mg/kg/day)、各 8 検体。

[考察]

我々は、DCKO マウスの DGC より細胞株を樹立することに成功した。DGC 由来細胞株は、p53 のみをノックアウトした細胞と比べて、強いスフェア形成能と腫瘍形成能をもち、細胞傷害性の抗がん剤に対して耐性があることを明らかにした。その結果、ヒト DGC をよく模倣するモデルである DCKO マウスとその DGC 由来細胞株を利用して、in vivo と in vitro の両面から DGC の基礎研究と臨床研究を進展させていくことが可能になった。

我々は、DCKO マウスの DGC のマイクロアレイの結果に注目し、DGC の発症にエピジェネティクス異常が強く関与しており、DGC の治療にエピジェネティクス治療薬が有効であると推測した。実際、エピジェネティクス治療薬である TSA・NaB・Chaetocin は、in vitro でのスフェア形成を顕著に阻害し、in vivo でも腫瘍形成を有意に抑制した。以上より、DCKO マウスの DGC の治療にはエピジェネティクス制御が有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- (1) Tsuchida R, Osawa T, Wang F, Nishii R, Das B, Tsuchida S, Muramatsu M, Takahashi T, Inoue T, Wada Y, Minami T, Yuasa Y, Shibuya M. BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinally inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene* (査読有) 2014, in press. doi: 10.1038/onc.2013.358
- (2) Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama

- E, Kiyono T, Imoto I, Inazawa J, Yuasa Y, Kubota T, Yamaoka S. NF- B inducing kinase, a central signaling component of the non-canonical pathway of NF- B, contributes to ovarian cancer progression. PLoS One (査読有) 2014;9:e88347.
doi: 10.1371/journal.pone.0088347
- (3) Rotkrue P, Shimada S, Mogushi, K, Akiyama Y, Tanaka H, Yuasa Y. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model. Brit. J. Cancer (査読有) 2013: 108:932-940.
doi: 10.1038/bjc.2013.30
- (4) Fukamachi H, Seol HS, Shimada S, Funasaka C, Baba K, Kim JH, Park YS, Kawachi H, Yook JH, Eishi Y, Kojima K, Kim WH, Jang SJ, Yuasa Y. CD49^{high} cells retain sphere-forming and tumor-initiating activities in human gastric tumors. PLoS One (査読有) 2013;8:e72438.
doi:10.1371/journal.pone.0072438
- (5) Hashimoto Y, Akiyama Y, Yuasa Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. PLoS One (査読有) 2013;8:e62589.
doi: 10.1371/journal.pone.0062589
- (6) Osawa T, Tsuchida R, Muramatsu M, Shimamura T, Wang F, Suehiro J, Kanki Y, Wada Y, Yuasa Y, Aburatani H, Miyano S, Minami T, Kodama T, Shibuya M. Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor associated macrophages. Cancer Res. (査読有) 2013;73:3019-3028.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3231
- (7) Fukamachi H, Kato S, Asashima M, Ichinose M, Yuasa Y. Activin A regulates growth of gastro-intestinal epithelial cells by mediating epithelial-mesenchymal interaction. Development Growth and Differentiation (査読有) 2013;55:786-791.
doi: 10.1111/dgd.12102
- (8) Yuasa Y, Nagasaki H, Oze I, Akiyama Y, Yoshida S, Shitara K, Ito S, Hosono S, Watanabe M, Ito H, Tanaka H, Kang DH, Pan K-F, You W-C, Matsuo K. *Insulin-like growth factor 2* hypomethylation of blood leukocyte DNA is associated with gastric cancer risk. Int. J. Cancer (査読有) 2012;131:2596-2603.
- (9) Shimada S, Mimata A, Sekine M, Mogushi K, Akiyama Y, Fukamachi H, Jonkers J, Tanaka H, Eishi Y, Yuasa Y. Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer. Gut (査読有) 2012;61:344-353.
- (10) Song M-Y, Pan K-F, Su H-J, Zhang L, Ma J-L, Li J-Y, Yuasa Y, KangDH, Kim YS, You W-C. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. PLoS One (査読有) 2012;7:e33608.
- [学会発表](計 25 件)
- (1) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Yuasa Y. Targeting epigenetic alterations in a mouse model of E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer. NRF A3 Foresight Program 2013 Seminar - Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, 2013 年 7 月 6 日~9 日, 扶余, 韓国.
- (2) Nishikawaji T, Akiyama Y, Shimada S, Yuasa Y. Alterations of histone lysine methyltransferases, SETDB1 and SETDB2, in gastric cancers. NRF A3 Foresight Program 2013 Seminar - Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, 2013 年 7 月 6 日~9 日, 扶余, 韓国.
- (3) Akiyama Y, Koda Y, Nishikawaji T, Shimada S, Yuasa Y. Frequent loss of SET7/9 protein and its clinicopathological significance in gastric carcinoma. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 3 日~5 日, 横浜.
- (4) Sakamoto A, Shimada S, Akiyama Y, Yuasa Y. Function and expression of Twist1 in diffuse-type gastric cancer cell lines of an E-cadherin/p53-deficient mouse model. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 3 日~5 日, 横浜.
- (5) Fukamachi H, Shimada S, Yuasa Y. Patient-dependent differences in the features of human gastric tumor-initiating cells in primary culture. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 3 日~5 日, 横浜.
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
- [その他]
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/grad/monc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 保仁 (YUASA Yasuhito)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合
研究科・教授
研究者番号：80111558

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし