

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860230

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた胃がん形成における炎症反応の役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of inflammation on gastric cancer formation using a mouse model

研究代表者

武田 はるな (TAKEDA, Haruna)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80647975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症が胃がん形成に与える影響を解析するために、マウスにヘリコバクターフェリスを感染させる実験を行った。しかしながら、惹起される炎症の度合いが個体によって大きく異なり再現性の精度に欠けたため、この実験系を用いての解析は終了させた。次に、マウス生体内で大腸がんのスクリーニングを行った実験に関しての解析を行った。Sleeping Beautyトランスポゾン挿入変異システムをマウスの腸上皮に導入し、腸の腫瘍を得た。これら腫瘍のゲノムをシーケンスすることで1333個の大腸がん形成に関わる遺伝子を同定した。また、悪性度の高い腫瘍で高頻度に変異の入る6つの遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：H. Pylori infection causes chronic inflammation and correlates to the high incidence of gastric cancers. To analyze the effect of inflammation on gastric cancer formation, Helicobacter Felis was infected to the mouse stomach. Thirty weeks post infection, mouse stomachs were analyzed histopathologically. However, considerable individual variation in the degree of the inflammation was observed, showing to be difficult to reproduce the results, therefore I finished this experiments.

Previously I performed SB transposon based insertional mutagenesis screening in mice to identify colorectal cancer (CRC) genes, I then analyzed these results. From this screen, we could identify 1333 CRC genes, and 6 genes involving the tumor progression. These 6 genes include Rnf43, which is a negative regulator of Wnt and often mutated in human CRC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：マウスモデル がん

1. 研究開始当初の背景

(1) ピロリ菌の感染によって引き起こされる慢性胃炎が、胃癌発症の最も高い危険因子であることが明らかであり、中でも *CagA* 遺伝子を持つ系統のピロリ菌の感染が、発がんとの強い相関があることが疫学調査の結果より明らかになっている。*CagA* 依存的な発がんとの慢性炎症がどのように協調作用を示し発がん過程に関与するかは未知の部分が多い。本研究ではマウスモデルを用いこの点について検証する。*CagA* たんぱく質を発現させたトランスジェニックマウスと野生型マウスにヘリコバクターフェリス(HF)をそれぞれ感染させ、*CagA* の有無で炎症の度合いや腫瘍形成に差が出るかについて、感染後約 30 週の時点でマウスの胃を病理学的に解析した。HF は猫から単離された菌であり、マウス胃上皮への感染とそれに伴う炎症反応を効率よく惹起することができる。炎症細胞の浸潤度や上皮細胞の萎縮などに関して数値化して評価したが両者の間で差は見られず、前がん病変となる部位も観察されなかった。更に、個体間で炎症の度合いに大きく差が出ることから、菌感染を用いて炎症の度合いを数値化し比較していくことは実験の再現性の観点から適切ではないと考え解析はここで終了した。

(2) 人のがんゲノム解読の研究が進み、どのような遺伝子に変異があるのか明らかになってきている。大腸がんに関しては、一つの腫瘍に約 70 個の遺伝子変異が含まれているとの報告がある。変異のあるこうした数多くの遺伝子の中でも、高頻度に変異の入る遺伝子は *APC*, *KRAS*, *TP53*, *PTEN* など数少なく、残りの多くの遺伝子は低頻度にしかならぬ変異が観察されない。低頻度にしかならぬ変異が入らない遺伝子に関しては、がん形成に関与するドライバー遺伝子と、がん形成に関与していないパッセンジャー遺伝子の区別をつけるのは困難な状況である(文献 1)。しかしながら、低頻度なドライバー遺伝子を同定し、どのようなシグナル経路や生理学的機能ががんにおいて脱制御されているかを明らかにしていくことは、抗がん剤の開発を考えていく上で非常に重要である。

2. 研究の目的

低頻度に観察される遺伝子変異の中からドライバー遺伝子を同定することを目的とし、マウス生体内で大腸がんのドライバー遺伝子のスクリーニングを行う。次に同定された遺伝子に関し、人の大腸がんに変異のある遺伝子と比較する。共通して変異のある遺伝子を得ることで、がん形成に関

与するドライバー遺伝子を同定することを目的とする。

マウス生体内でがんに関わる遺伝子のスクリーニングを行うために、近年開発された Sleeping Beauty (SB) トランスポゾン挿入変異システムを利用した。このスクリーニングシステムはトランスポゾンがマウスゲノム上を比較的ランダムに動き回ることのできる性質を利用している。用いたトランスポゾンは近傍の遺伝子の発現を誘導したり、発現を阻害したりすることのできる変異原性を持つトランスポゾンである。がんに関わる遺伝子内に挿入され機能阻害を引き起こした場合には、選択的に腫瘍組織内で変異が保持されるが、がんに関わりの低い遺伝子近傍にトランスポゾンが挿入された場合には、別のゲノム部位に再転位する可能性が高い性質を持つので、効率よくがん形成に関わる遺伝子のスクリーニングができることが報告されている(文献 2)。

3. 研究の方法

SB トランスポゾン挿入変異システムを用い、マウス腸上皮特異的に挿入変異を誘発し腫瘍を得た。腫瘍形成の効率を上げるために、人の大腸がんを高頻度に変異が見つかる遺伝子(*Apc*, *Kras*, *Smad4*, *p53*) にそれぞれあらかじめ変異を入れた 4 つのマウス群を用意した。腫瘍ゲノムを抽出し、LM-PCR 法でトランスポゾン挿入部位をクローニングして高速シーケンサーで配列を決めた。これらの挿入部位をマウスゲノム上にマップした。高頻度にトランスポゾンが挿入されている遺伝子を統計学的な処理を行うことで同定し、ドライバー遺伝子とした。このスクリーニングは Nancy Jenkins 博士と Neal Copeland 博士の研究室に在籍中に行った。

4. 研究成果

SB トランスポゾンシステムは、ゲノム上を転移する DNA 断片であるトランスポゾンと、この転移を触媒する SB トランスポゼーゼスの二つの要素からなる。このシステムをマウスの腸上皮特異的に誘導するために、SB トランスポゼーゼス (*Rosa26-lox-STOP-lox-SB11*)、SB トランスポゾン (*T2/Onc2*)、腸上皮特異的に Cre リコンビネースを発現する *Vil1-CreERT2*、*Apc^{min}* 又は *Kras^{G12D}* 又は *Smad4^{KO}* 又は *p53^{R172H}* アリルをそれぞれ持つマウス群を用意した(以後、*Apc^{min};SB*, *Kras^{G12D};SB*, *Smad4^{KO};SB*, *p53^{R172H};SB* とする)。数ヶ月から一年半の間にマウスは腸管に腫瘍を形成した。SB トランスポゾンシステムを持たない各群の対照マウス群に比べ、腫瘍の数は有為に増加し、マウスの平均寿命は有為に短くなった。4 つのマウス群の間で平均寿命に差があったことより、各群において異なる遺伝子変異が SB トランスポゾ

ンによって誘導され、それらが協調して腫瘍形成を誘導していることが示唆された。得られた腫瘍を病理学的に解析したところ、良性の腫瘍に加えて腫瘍上皮細胞の筋層への浸潤が観察される悪性度の高い腫瘍も形成されており、人の大腸がんをよくモデルしていることが示された。

次に、Kras^{G12D}:SB, Smad4^{KO}:SB, p53^{R172H}:SBのみから腫瘍 220 個を集めてゲノムを抽出し LM-PCR 法でトランスポゾン挿入部位をクローニングし、高速シーケンサーで配列を決めた。Apc^{min}:SB の研究はすでに報告されているので(文献 3) 結果を比較のために利用した。これらのトランスポゾン挿入部位をマウスゲノムにマップし、統計学的手法を用いることで、Apc^{min}:SB, Kras^{G12D}:SB, Smad4^{KO}:SB, p53^{R172H}:SB から合計 1383 個のトランスポゾンが高頻度に挿入されている部位を同定した。この中で、遺伝子内又は遺伝子近傍にマップされた共通挿入部位は 1333 個であった。これら遺伝子のがん形成に関わる遺伝子とした。

これらの遺伝子がどのようなシグナリング経路に属しているのかをオンラインアノテーションツール(DAVID)を用いて解析したところ、Wnt 経路と TGF-β 経路に属する遺伝子に高頻度に変異が入っていることが示された。これらの経路は人の大腸がんでも重要性が報告されている。更に、クロマチンリモデリングに関わる遺伝子にも高頻度に変異が入っていることが示された。クロマチンリモデリングに関わる遺伝子は、人の様々な腫瘍においても同様に高頻度で変異が入っていることが報告されており、その重要性が示されている。

4 つのマウス群から同定されたがん形成に関わる遺伝子は、それぞれの群において共通して同定されてきたものや、ある特定のマウス群からのみ同定されてきた遺伝子が含まれていた(図 1)。4 つのマウス群において共通して変異が見つかった遺伝

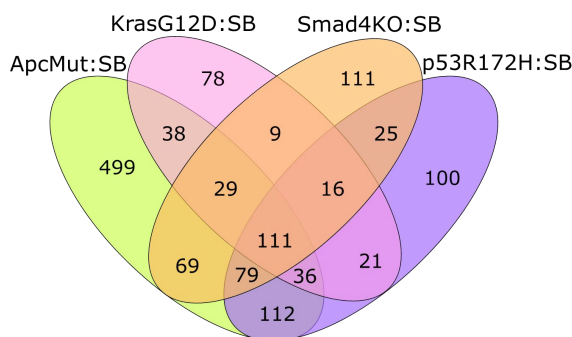


図1 4つのマウス群より同定された遺伝子の重なりを示すVenn diagram

子は 111 個であり、異なる遺伝的背景においても共通して変異が入るため、非常に重要な遺伝子であることが予想できる。実際

に、これらの中には *Apc*, *Pten*, *Fbxw7*, *Smad4* など大腸における重要な腫瘍抑制遺伝子が含まれていたことから、これら 111 個の遺伝子は大腸がん形成に特に重要であることが示された。

得られた遺伝子を、人の大腸がんの変異のある遺伝子のデータベース(COSMIC)や既に報告されている大腸がんゲノム解読の研究結果と比較したところ、人とマウスで共通して変異のある遺伝子が有為に重なっていた(図 2)。この結果は、

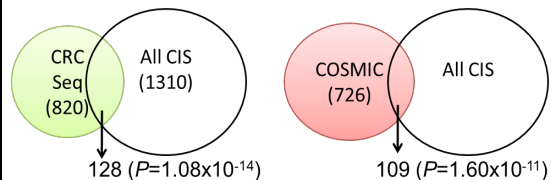


図2 マウスのスクリーニングより同定された遺伝子1333個と人の大腸がん変異のある遺伝子のデータベース(CRC Seq又はCOSMIC)との重なりは統計学的に有為である

SB トランスポゾンシステムを用いて形成された腫瘍が、人の大腸がんをよくモデルしていることを示している。さらに、これら共通して変異のある遺伝子は、人のがん化の過程に関与するドライバー遺伝子の可能性がかなり高いことを示している。

得られた腫瘍には悪性度の低い腫瘍と高い腫瘍が含まれていた。がんの悪性化に関わる遺伝子を同定することを目的として、腫瘍を悪性度によって分類し、悪性度の高い腫瘍で高頻度に変異の入る遺伝子 37 個を同定した。この中には、Wnt 経路の負の制御因子である *Axin1* や ErbB 経路の負の制御因子である *Lrig1* などが含まれていた。*Lrig1* を腸上皮で欠損させると腸に浸潤性のがんを発症する結果が報告されていることから、このスクリーニングの信頼度の高さを示している。更に、これら遺伝子のいくつかに対する siRNA を用い、HT29 と HCT15 の 2 種類の大腸がん細胞株にて発現をノックダウンし、マトリジェルへの浸潤能を定量したところ、6 つの遺伝子に関して浸潤能が促進するという結果が得られた。この中には、Wnt 経路の分子であり、大腸がんや胃がんゲノムで高頻度に変異が入っていることが最近報告された *Rnf43* 遺伝子が含まれていた。その他、消化管のがんでの機能は未知であるが、転写制御に関わる遺伝子である *Sin3a* や *Mkl2* など含まれていた。*Sin3a* は *Drosophila melanogaster* において機能阻害させるとがん浸潤様の表現型を示すことが報告されている。これらの結果は、これら 6 つの遺伝子は腫瘍抑制遺伝子であり、機能が抑制されることでがんの浸潤段階を促進している可能性があることを示している。

本研究では、1333 個の大腸がん形成に

関わる遺伝子をマウスにて同定し、人の大腸がんと比較することで共通して変異のある遺伝子を絞り込んだ。こうした結果は、この先に抗がん剤の開発を考えていく上で非常に重要である。

引用文献

(文献 1) Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-58 (2013)

(文献 2) Copeland, N.G. & Jenkins, N.A. Harnessing transposons for cancer gene discovery. *Nat Rev Cancer* **10**, 696-706 (2010).

(文献 3) March H.N. *et al.*, Insertional mutagenesis identifies multiple networks of cooperating genes driving intestinal tumorigenesis. *Nat. Genet.* **43** 1202-1209 (2011)

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 1 件)

(1) Haruna Takeda, Zubo Wei, Hideto Koso, Alistair G. Rust, Christopher Chin Kuan Yew, Michael B. Mann, Jerrold M. Ward, David J. Adams, Neal G. Copeland and Nancy A. Jenkins

Transposon mutagenesis identifies genes and evolutionary forces driving gastrointestinal tract tumor progression

Nature Genetics (2015) **47**:142-50. doi: 10.1038/ng.3175.
査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 武田はるな
SB トランスポゾン挿入変異を用いた、大腸がんの悪性化に関わる遺伝子のスクリーニング
第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25-27 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

(1) ライフサイエンス新着論文レビュー
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9773>

(2) つなごう医療 中日メディカルサイト
<http://iryuu.chunichi.co.jp/article/detail/20150427142924879>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 はるな (TAKEDA, Haruna)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80647975