

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26462528
 研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた子宮頸癌発生における各種増殖因子・癌遺伝子の役割の解明

 研究課題名(英文) Roles of growth factors and oncogenes on cervical carcinogenesis in transgenic mice

 研究代表者
 松元 隆 (Takashi, Matsumoto)

 愛媛大学・医学系研究科・講師

 研究者番号：20346670
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において以下のことを明らかにできた。1)EGFRのligandであるTGF- α を過剰発現させたTgマウスにおいて,cervical intraepithelial neoplasia grade 3(CIN3)が81.3%の頻度で発生した。2)成長因子の一種であるIGF-1を過剰発現させたTgマウスにおいてCIN3の発生を21%の頻度にて観察できた。3)癌遺伝子であるc-srcを過剰発現させたTgマウスの30%にCIN3が発生していることを見出した。4)転写因子であるE2F1を過剰発現させたTgマウスにおいて子宮頸部扁平上皮癌が発生していることを明らかにした(頻度：38%)。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the impact of elevated several growth factors/oncogenes in cervical epithelium of transgenic mice. We generated transgenic mice those overexpressed transforming growth factor- α (TGF- α), c-src or insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in epithelial basal cells driven by the keratin 14 (K14) or keratin 5 (K5) promoter. Histopathologic changes were assessed in uterine cervix of 12-month-old TGF- α transgenic mice, Src transgenic mice and IGF-1 transgenic mice, compared to age-matched non-transgenic littermates. The incidence of cervical intraepithelial neoplasia 3 (CIN3) was 37.5% (6/16), 30% (6/20) and 20.8% (5/24) in TGF- α transgenic mice, src transgenic mice and IGF-1 transgenic mice, respectively. Constitutive expression of growth factors/oncogenes, including TGF- α , c-src and IGF-1, and activation of the epidermal growth factor receptor in epithelium of uterine cervix may play an important role in tumorigenesis in this tissue.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：腫瘍発生学 子宮頸癌 動物モデル トランスジェニックマウス

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はなく、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)。

本研究はこれらの研究成果および背景を踏まえて計画したものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、各種増殖因子・癌遺伝子 (E2F1, c-src, IGF-1, TGF-) のトランスジェニックマウスにおける子宮頸部病変を比較解析することにより、HPVの関与以外明らかにされていない子宮頸癌の発生メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) E2F1, c-src, IGF-1, TGF- Tg マウスにおける子宮頸部組織の採取

E2F1, c-src, IGF-1, TGF- Tg マウスを交配・繁殖させることでそれぞれマウス (NxF1) を飼育し、12ヶ月齢に安楽死させ、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。同時に野生型姉妹マウスを飼育し、同様に雌性生殖器を採取する。

(2) E2F1, c-src, IGF-1, TGF- Tg マウスにおける子宮頸部病変の病理組織学的解析

採取した組織より病理組織標本 (H&E 染色) を作製し、それぞれの Tg マウスの標的分子およびそれらの関連分子の免疫組織化学染色を実施することにより、それぞれの子宮頸部病変の病理組織学的相違点を解析する。

* 上記 (1) ~ (3) 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

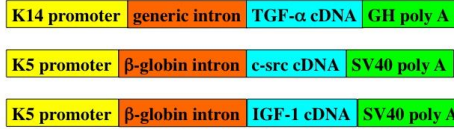
各 Tg マウスを作製する際に使用した DNA construct を示す。

Materials and Methods

Analysis of tumorigenesis in uterine cervix of growth factors/oncogenes transgenic mice

We generated transgenic mice those overexpressed c-src or insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in epithelial basal cells driven by the keratin 5 (K5) promoter. K14.TGF-α transgenic mice were obtained from Dr. Michael P Rosenberg (Piedmont Research Center, Morrisville, NC, USA). Histopathologic changes were assessed in uterine cervix of 12-month-old K14.TGF-α transgenic mice, K5.src transgenic mice and K5.IGF-1 transgenic mice, compared to age-matched non-transgenic littermates.

DNA construct of growth factors/oncogenestransgenic mice



Materials and Methods

Analysis of carcinogenesis in uterine cervix of E2F1 transgenic mice

We generated transgenic mice those overexpressed E2F transcription factor 1 (E2F1) in epithelial basal cells driven by the keratin 5 (K5) promoter. Histopathologic changes were assessed in uterine cervix of 12-month-old K5 E2F1 transgenic mice, compared to age-matched non-transgenic littermates.

DNA construct of K5 E2F1 transgenic mice



各種 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) とその頻度を示す。

CINs in K14.TGF-α Transgenic Mice

	Hyperplasia	CIN 3
Nontransgenic mice	0/10 (0%)	0/10 (0%)
Transgenic mice	13/16 (81%)	6/16 (38%)

CIN 3, severe dysplasia + carcinoma in situ (CIS).

CINs in K5.src Transgenic Mice

	Hyperplasia	CIN 3
Nontransgenic mice	0/10 (0%)	0/10 (0%)
Transgenic mice	18/20 (90%)	6/20 (30%)

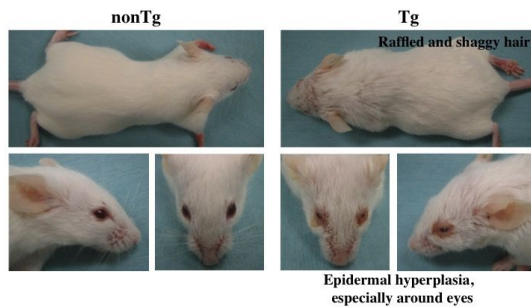
CIN 3, severe dysplasia + carcinoma in situ (CIS).

Uterine Cervical Carcinogenesis in K5.IGF-1 Transgenic Mice

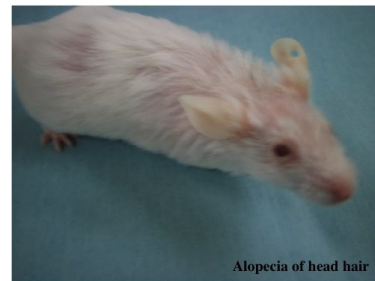
	CIN 3
Nontransgenic mice	0 / 35 (0%)
Transgenic mice	5 / 24 (21%)

*These findings indicate that constitutive expression of IGF-1 in epithelium of uterine cervix can drive tumorigenesis in K5.IGF-1 transgenic mice.

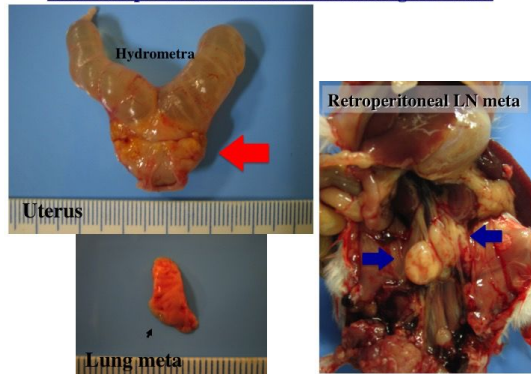
5-month-old K5 E2F1 Transgenic Mice



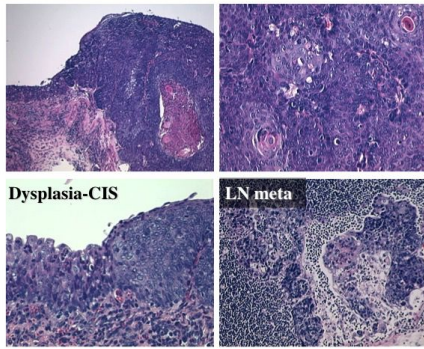
10-month-old K5 E2F1 Transgenic Mice



Macroscopic Lesions in K5 E2F1 Transgenic Mice



Microscopic Findings in K5.E2F1 Transgenic Mice



**Cervical Carcinogenesis
in K5 E2F1 Transgenic Mice**

Development of SCC	
Nontransgenic mice	
6 months	0/ 6 (0%)
12 months	0/ 7 (0%)
Transgenic mice	
6 months	0/ 8 (0%)
12 months	6/16 (38%)

SCC, squamous cell carcinoma

本研究において、以下のことを明らかにできた。1)EGFR の ligand である TGF- β を過剰発現させた Tg マウスにおいて、cervical intraepithelial neoplasia grade 3(CIN3)が38%の頻度で発生した。2)成長因子の一種である IGF-1 を過剰発現させた Tg マウスにおいて CIN3 の発生を 21%の頻度にて観察できた。3)癌遺伝子である c-src を過剰発現させた Tg マウスの 30%に CIN3 が発生していることを見出した。4)転写因子である E2F1 を過剰発現させた Tg マウスにおいて子宮頸部扁平上皮癌が発生していることを明らかにした(頻度 :38%)。

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 3 件)

Mikio Mikami, Yoichi Aoki, Masaru Sakamoto, Muneaki Shimada, Nobuhiro Takeshima, Hisaya Fujiwara, Takashi Matsumoto, Tunekazu Kita, Ken Takizawa.

Surgical Principles for Managing Stage IB2, IIA2, and IIB Uterine Cervical Cancer (Bulky Tumors) in Japan: A Survey of the Japanese Gynecologic Oncology Group. Int J Gynecol Cancer 24:1333-40, 2014. (査読 : 有)

Shoji Nagao, Shin Nishio, Satoshi Okada, Takeo Otsuki, Kiyoshi Fujiwara, Hiroshi Tanabe, Masashi Takano, Yoko Hasumi, Yuji Takei, Tetsuya Hasegawa, Takashi Matsumoto, Keiichi Fujiwara, Munetaka Takekuma, Kazuto Nakamura, Muneaki Shimada, Mitsuaki Suzuki, Junzo Kigawa. What is an appropriate second-line regimen for recurrent endometrial cancer? Ancillary analysis of the SGSG012/GOTIC004/Intergroup study. Cancer Chemother Pharmacol 76:335-342, 2015. (査読 : 有)

Koji Koizumi, Toru Fujioka, Toshiaki Yasuoka, Aya Inoue, Yuka Uchikura, Hiroki Tanaka, Katsuko Takagi, Miki Mori, Masae Koizumi, Hisashi Hashimoto, Takashi Matsumoto, Yuko Matsubara, Keiichi Matsubara, Akihiro Nawa. Clinical investigation of the safety and efficacy of a cervical intraepithelial neoplasia treatment using a hyperthermia device that uses heat induced by alternating magnetic fields. Mol Clin Oncol 13:310-316, 2016. (査読 : 有)

Koji Matsuo, Muneaki Shimada, Yoichi Aoki, Masaru Sakamoto, Nobuhiro Takeshima, Hisaya Fujiwara, Takashi Matsumoto, Mikio Mikami, Toru Sugiyama. Comparison of adjuvant therapy for node-positive clinical stage IB-IIB

cervical cancer: Systemic chemotherapy
versus pelvic irradiation. Int J Cancer
May 19, 2017 [Epub]. (査読:有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松元 隆 (Matsumoto, Takashi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 20346670

(2)研究分担者

小泉 雅江 (Koizumi, Masae)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60583028

那波 明宏 (Nawa, Akihiro)
名古屋大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号: 90242859