

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860493

研究課題名(和文)新規の胃炎症発癌モデルによる胃炎-化生-発癌過程の細胞系譜的および免疫学的解析

研究課題名(英文) Study on gastritis, metaplasia, and gastric cancer using new mice models of gastritis and carcinogenesis

研究代表者

木下 裕人 (Kinoshita, Hiroto)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50645322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃上皮特異的な遺伝子改変のため、BACトランスジェニックの手法を用いてTff1-Creマウスを新規に作出した。Rosa-EYFPマウスと交配し、Tff1-Creの発現部位を解析した。腺窩上皮と腺窩上皮前駆細胞のほか、頸部粘液細胞および主細胞の一部でも発現を認めた。壁細胞や内分泌細胞では発現を認めなかった。Tff1-CreマウスとLSL-KrasG12Dマウスの交配により腺窩上皮で変異型Krasを発現させると、生後3か月で腺窩上皮の過形成、胃底腺の萎縮、アルシアンブルー陽性の化生性変化を生じた。今後Tff1-Creマウスと種々の遺伝子改変マウスの交配により、化生性変化や発癌を解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of stomach epithelium-specific gene modification, we newly generated Tff1-Cre mouse lines using the BAC transgenic technique. To elucidate the site of Tff1-Cre transgene expression, we crossed Tff1-Cre mice to Rosa-EYFP reporter mice, and analyzed the tissues with immunohistochemistry. Tff1-Cre positive cells were detected not only in pit and pre-pit cells but also in part of neck and chief cells. Tff1-Cre expression was not detected in parietal cells or endocrine cells. Next we crossed Tff1-Cre mice to LSL-KrasG12D mice. Tff1-Cre; LSL-KrasG12D mice displayed foveolar hyperplasia, oxyntic atrophy, and Alcian blue-positive mucous metaplasia at the age of 3 months. Now we are planning to cross Tff1-Cre mice to several other genetically modified mouse lines in order to study the mechanisms of gastric metaplasia and carcinogenesis.

研究分野：消化器内科

キーワード：胃癌マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌発症メカニズムの研究の必要性

胃癌発症における *Helicobacter pylori* の決定的な重要性が明らかになり、胃癌予防としての除菌療法が一般化した。胃癌の罹患率・死亡率はまだまだ高く、発症機序の詳細の解明と、それに基づく予防・早期発見プログラムの改良、より有効な治療の開発が求められていることに変わりはない。

(2) 胃発癌における化生性変化

慢性胃炎に伴う化生性変化の存在が発癌の危険因子であることはよく知られているが、化生性変化そのものが前癌病変なのか、慢性胃炎に対する反応性変化であって“傍癌病変”に過ぎないのかは未解決であり、化生性変化の生理的意義の検討は胃癌発症機序解明への重要な手がかりのひとつである。そこで、化生性変化から発癌に至る過程の解析を可能とする、新たな胃癌マウスモデルを確立する必要があると考えた。

(3) 胃の上皮特異的遺伝子改変を可能とする新規 Cre マウス

胃の上皮特異的プロモーターとして、これまで用いられてきた K19 や *Foxa3* は、小腸・大腸・膵臓など発現が広範で、改変する遺伝子によっては胃以外の臓器が原因で致死的となることが問題であった。*Atp4b* (*H-K ATPase*) プロモーターは胃の壁細胞に特異的であるが、慢性胃炎(壁細胞が減少~消失する)を背景とする発癌の解析にはそぐわない点もあると考えられる。そこで、より胃の上皮に特異的に発現する遺伝子として *trefoil factor 1* (*Tff1*)に着目し、*Tff1-Cre* マウスを作出することとした。

2. 研究の目的

(1) *Tff1-Cre* マウスの作出

上述の通り、胃の上皮特異的に種々の遺伝子改変を可能とするため、新規に *Tff1-Cre* マウスを作出する。

(2) *Tff1-Cre* マウスを用いた新規の化生性変化ないし胃癌マウスモデルの確立

Atp4b-Cre; *CDH1 flox/flox*; *p53 flox/flox* マウスにおける未分化型胃癌や、*K19-Kras* (*K19* プロモーターで変異型 *Kras* を発現する)マウスにおける胃の化生性変化などの既報を参考に、*Tff1-Cre* と種々の *flox* マウスの掛け合わせにより新規の胃癌モデルを確立する。

(3) Leneage tracing の手法を用いた癌の起源細胞の解析

上記(2)の胃癌マウスモデルにおいて、*Rosa-EYFP* マウスなどのレポーターマウスを掛け合わせることにより、レポーターの発現が化生性変化から腫瘍にいたるまで

保たれていれば、化生性変化そのものから腫瘍が発生すると判断できる。

3. 研究の方法

(1) BAC トランスジェニックの手法を用いた *Tff1-Cre* マウスの作出

以前、*Tff1* 遺伝子の翻訳開始点より上流約 2kb をクローニングし、*Cre* の発現コンストラクトを作成し *Tff1-Cre* マウスの作出を試みたが、期待通りの発現が得られなかった。そこで、今回は *Tff1* 遺伝子を含んだ約 100kb の BAC クローンをもとに *Cre* の発現コンストラクトを作成することとした。

4. 研究成果

(1) *Tff1-Cre* マウスの作出

上述の通り、BAC クローンをもとに *Cre* の発現コンストラクトを作成、*C57BL/6* マウスの受精卵に顕微注入し、*Tff1-Cre* マウスを作出した。最終的に 2 つのラインで、*Rosa-EYFP* レポーターマウスとの交配により、胃における *Tff1-Cre* の発現を確認できた。

トランスジェニックマウスでは、同一のコンストラクトを使用しているラインによって発現の程度や部位が異なることがあるが、*Rosa-EYFP* レポーターを用いた検討では胃における *Tff1-Cre* 発現は今回の 2 つのラインではほぼ同様であり、以下の解析は一方のラインを用いて行った。

(2) *Tff1-Cre* の発現部位の解析

マウスにおいて *Tff1* の発現を解析した過去の報告では、胎生期の一時期に胃~回盲部までの範囲に発現を認めている。今回作成した *Tff1-Cre* の発現部位を確認するため、*Rosa-LacZ* レポーターマウスとの交配後に *X-gal* 染色を行ったところ、胃、十二指腸、上部回腸と、回腸末端から近位結腸、および肝外胆管に発現を認めた(図 1)。膵臓では *Tff1-Cre* の発現を認めなかった。

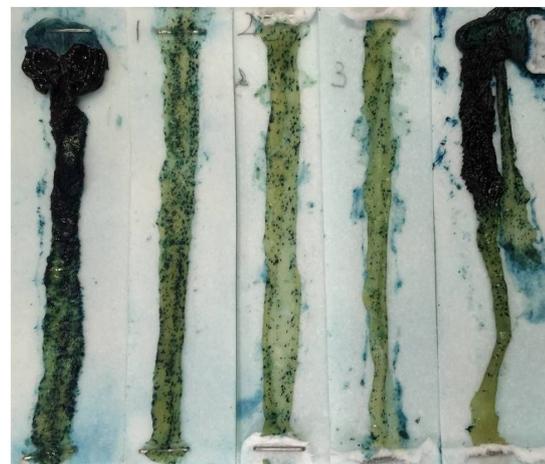


図 1 消化管の X-gal 染色 (マクロ像)

次いで、胃の上皮における Tff1-Cre の発現部位をより詳細に解析するため、Tff1-Cre ; Rosa-EYFP の胃組織において、胃上皮の各種分化マーカーの免疫染色を行ったところ、YFP 陽性細胞(Tff1-Cre 陽性細胞およびその子孫の細胞) は、腺窩上皮とその前駆細胞のみならず、頸部粘液細胞や主細胞の一部にも認められた。壁細胞や内分泌細胞には YFP 陽性細胞は認められなかった (図 2)。

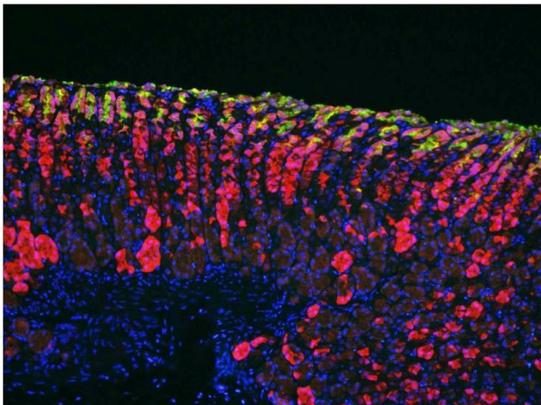


図 2 蛍光免疫染色 : 赤 YFP、緑 TFF1、青 DAPI (核)

以上のように、新規に作出した Tff1-Cre マウスは、胃の上皮表層で遺伝子改変を起こすために有用であると考えられた。また、YFP 陽性細胞の分布から、Tff1-Cre は腺窩上皮と頸部粘液細胞および主細胞に共通の前駆細胞においても発現することが示唆され、同マウスは胃の上皮の分化を検討するためにも有用であると思われる。

(3) Tff1-Cre; LSL-KrasG12D マウスの解析

マウスの胃組織において化生性変化をきたすモデルのひとつとして、K19 プロモーター下に変異型 Kras を発現させるモデル (K19-Kras マウス) が報告されている。これに習い、胃の化生性変化を解析するモデルとして Tff1-Cre; LSL-KrasG12D マウスを作成し解析した。

12 週齢の Tff1-Cre; LSL-KrasG12D マウスでは、腺窩上皮の著明な過形成と、胃底腺の萎縮 (すなわち壁細胞や主細胞の減少) を認め、また粘液はアルシアンブルー染色陽性となっており、化生性変化と言ってよいと思われる (図 3)。24 週齢の解析でも同様の変化を認めているが、異形成ないし腫瘍はこれまでのところ認められていない。

以上のように、Tff1-Cre; LSL-Kras マウスは胃の化生性変化を解析するモデルとして有用であると考えられる。今後は長期経過を見るとともに、抗炎症作用を持つ薬剤や各種阻害剤の投与などにより、化生性変化が出現するメカニズムの解析を行っていく予定である。

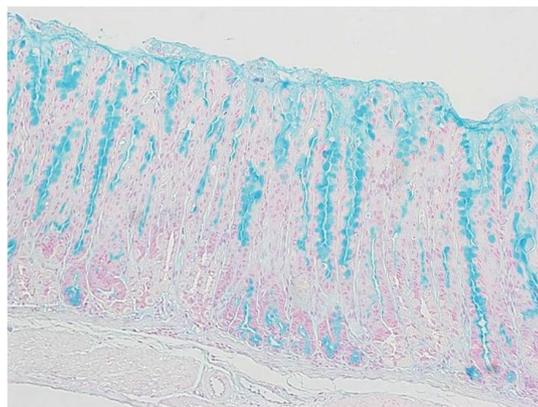


図 3 12 週齢の Tff1-Cre; LSL-KrasG12D マウス、アルシアンブルー染色

(4) Tff1-Cre; LSL-KrasG12D; Tgfr2 flox/flox マウスの解析

TGF β シグナルの異常は一部の胃癌において認められており、変異型 Kras を発現させるとともに TGF β シグナルを遮断することで胃癌モデルを作ることができるかどうかを検討した。

12 週齢の Tff1-Cre; LSL-KrasG12D; Tgfr2 flox/flox マウスでは、胃体部や前庭部には腺窩上皮の過形成および萎縮・化生性変化を認めるのみで腫瘍を認めなかったが、前胃と腺胃の境界部 (すなわち扁平上皮と腺上皮の境界部) に腫瘍を認め、組織学的には扁平上皮癌と考えられた (図 4)。

我々のグループでは、以前に K19 プロモーター下に同様の遺伝子改変を起こすマウスで、前胃と腺胃の境界部に同様の扁平上皮癌を生じることを報告しており、Tff1 と K19 の発現部位の共通性が示唆される。

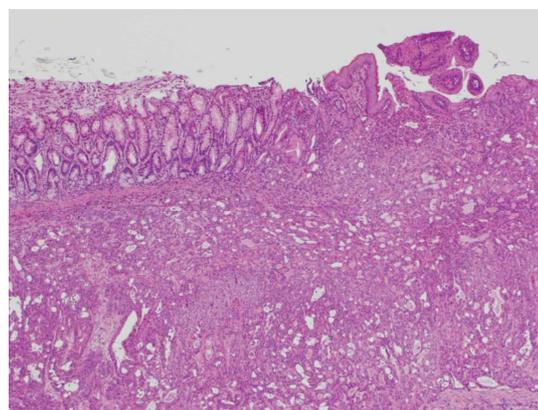


図 4 Tff1-Cre; LSL-KrasG12D; Tgfr2 flox/flox マウスにおいて前胃と腺胃の境界部にできた腫瘍

今後は、上述の扁平上皮癌の発症メカニズムや起源細胞の検討を続ける一方で、別の遺伝子改変 (E-cadherin 欠損や Wnt/ catenin シグナルの活性化など) の組み合わせにより

胃癌モデルを作成する予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 裕人 (KINOSHITA, Hiroto)

東京大学医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50645322