

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870025

研究課題名(和文)肝発癌に関わる癌遺伝子の腫瘍維持・進展における役割の検討

研究課題名(英文) Roles of oncogenes on tumor maintenance and progression

研究代表者

山本 雅大 (Yamamoto, Masahiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：30431399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍は遺伝子の異常が蓄積して多段階的に進行するが、発癌初期に働いた遺伝子異常が腫瘍の進展や維持においてどのような働きがあるのかは不明な点が多い。本研究では、マウス肝発癌モデルにおいて、誘導性Cre-LoxPシステムおよびテトラサイクリンシステムを用いて発癌に要した遺伝子の発現を制御する方法を検討した。その結果今回検討した方法は、効果のある腫瘍細胞の頻度が低かったり、制御効率が低かったりと、全ての腫瘍細胞で遺伝子発現を十分に制御することはできなかった。しかしながら、本研究により遺伝子改変マウスを用いた方法や阻害蛋白質を用いる方法が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In carcinogenic process, multiple gene abnormalities accumulate, but it has not been fully elucidated if the gene abnormalities in the early carcinogenic process are also important in the late carcinogenic processes; maintenance and progression of tumor cells. In this study, we evaluated the methods to control the gene expression required in the early carcinogenic process by inducible Cre-LoxP system and tetracycline system in mouse liver cancer model. As a result, the methods controlled gene expression only in parts of the tumor cells, or in a low efficiency. Although the methods were not able to efficiently control in the all tumor cells, the results suggest that methods using genetically modified mice or induction of inhibitory molecules would be useful for controlling the oncogenic genes.

研究分野：肝発癌

キーワード：liver cancer

1. 研究開始当初の背景

発癌は、その過程において複数の遺伝子異常が蓄積していくことにより、段階的に進行することが知られている。実際、Vogelsteinにより、良性の大腸腺腫から悪性の大腸癌へ発癌する過程において *APC*、*KRAS*、*SMAD* 及び *TP53* 遺伝子の順で異常が起こり、それに伴い悪性転化、浸潤及び転移等の変化が腫瘍に起こる、いわゆる多段階発癌モデルが提唱され (Fearon and Vogelstein et al., Cell 1990)、膵癌等の他の癌においても同様の発癌様式が言われている。しかしながら、これら複数の遺伝子異常が腫瘍の維持・進展にどの程度必要なかは不明な点が多く、特に発癌初期に働いた遺伝子異常が発癌の後期においても継続的に必要なかは不明な点が多い。実験的には Schachaf らが、Tet-OFF システムを用いて癌遺伝子 *Myc* を肝細胞に過剰発現させることで肝腫瘍を形成させた後に、*Myc* 遺伝子の発現を低下させると肝腫瘍が退縮すること、さらにその後 *Myc* の発現を再び亢進させると腫瘍が再発することを報告している (Schachaf et al., Nature 2004)。このことは、発癌に要した癌遺伝子が腫瘍の維持に重要な役割を果たしていることを示している。一方で、悪性黒色腫においては、最初に *BRAF* 遺伝子の活性変異が起こり、前癌病変である母斑が形成され、さらに何らかの遺伝子変化が加わり PI3 キナーゼ経路が活性化することが発癌に必要であることが知られている。興味深いことに、悪性黒色腫細胞の増殖は、活性変異型 *Braf* に対する阻害剤だけでは十分に抑制されず、同時に PI3 キナーゼ経路阻害剤を作用させることではじめて完全に抑制される (Vredeveld et al., Genes Dev 2012)。これは、発癌過程の後期に新たに加わった遺伝子の活性化により、発癌初期に活性化した癌遺伝子に対する依存度が低下する場合があることを示唆している。

2. 研究の目的

我々は SB トランスポゾンと Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法を用いたマウス *in vivo* 肝癌モデルを用いて、複数の癌関連遺伝子の肝癌における役割を検討していた。この方法は、プラスミド上のトランスポゾンカセット内に導入したい遺伝子をクローニングしておき、HTVi 法を用いてトランスポゼース発現プラスミド同時にマウス尾静脈より注射することで、マウス肝細胞のゲノム内に導入したい遺伝子を取り込まれ、安定的に遺伝子を発現させる方法である。恒常活性型のミリスチル化 AKT (*myrAKT*) と活性変異型の *HRAS*^{V12D} (*HRAS*) による発癌を検討していた。これは、*myrAKT* 単独または *HRAS* 単独では腫瘍が形成するまでにそれぞれ 9 ヶ月、5 ヶ月と長い期間が必要であったが、両者を組み合わせると 6 週間と非常に短期間に腫瘍が形成され、これら遺伝子が同時に作用することが腫瘍の形成に重要であることが明らかであった。また、この腫瘍形成過程において、初めに遺伝子導入細胞は強い脂肪化を起こし、それらのうちより脂肪化の少ない増殖性の高い細胞集団が小結節を形成し、やがてそれが腫瘍を形成することが分かっており、その細胞の変化には初めに導入した遺伝子に加えて何らかの遺伝子発現の変化が必要であることが示唆されていた。そこで、*myrAKT* と *HRAS* は発癌に重要であるが、形成された腫瘍の維持や進展にどのような役割を果たしているのかということを検討したいと考え、本研究では腫瘍形成期に働いた遺伝子をのちに不活性化する方法の検討を行った。

3. 研究の方法

一度発現していた遺伝子をのちに不活性化する方法として、(1) Cre リコンビナーゼ (Cre) による遺伝子ノックアウト、(2) テトラサイクリン誘導性の遺伝子発現制御法の 2 種類の方法を試みた。

(1) Creによる遺伝子ノックアウト法

我々の用いている遺伝子はCreで認識されるLoxPサイトにより挟まれており、Creが作用することにより遺伝子がノックアウトされることが確かめられている。Creの発現を

Mx1-Cre マウス、Adeno-associated virus serotype 8-CAG-Cre (AAV8-Cre) 及び

TetON-Cre の3種類の方法を用いてその効果を検討した。Creの発現を確認するために、Creの発現によりβ-galactosidaseが発現する*Rosa26R* マウスを用い、Cre発現細胞をX-gal染色にて同定した。

Mx1-Cre マウス

Mx1-Cre マウスは肝細胞及び造血細胞においてCreを誘導することのできるマウスである。Mx1-Cre マウスはインターフェロンの活性化に伴い働くMx1プロモータ下にCreが発現するマウスで、ウイルスを模倣したRNA体のpoly(I:C)を投与することでマウスの肝臓及び造血細胞でCreを誘導することができる。このマウスに腫瘍を誘導し、poly(I:C)を投与し、その遺伝子ノックアウト効率及び組織像の変化を検討した。

AAV8-Cre

AAV8は肝細胞に比較的特異的に感染するウイルスである。AAV8-CAG-Creは、様々な細胞で遺伝子発現の誘導が期待できるCAGプロモータ下にCreを発現する遺伝子をAAV8にパッケージングしたウイルスである。腫瘍形成後に、AAV8-CAG-Creをマウスに静脈注射し、その遺伝子ノックアウト効率及び組織像の変化を検討した。

Tet-ON-Cre

テトラサイクリン誘導性にCreの発現の誘導を試みた。テトラサイクリン誘導性システム(Tet-ON)はテトラサイクリンの類縁物質のドキシサイクリン存在下に遺伝子発現が誘導されるシステムである。Tet-ON-CreのシステムをmyrAKT及びHRASと同時に導入し、

腫瘍形成後にDoxを飲水投与し遺伝子ノックアウト効率及び組織像の変化を検討した。

(2) テトラサイクリン誘導性の遺伝子発現制御法

Tet-ON-MadMycによる腫瘍抑制効果の検討
myrAKTとHRASによる腫瘍形成過程において、脂肪蓄積の少ない増殖性の高い細胞はMyc蛋白質を発現していることが分かり、myrAKTとHRASに加えMycを同時に導入するとそれら脂肪蓄積の少ない細胞と類似した細胞が見られることより、Mycの発現誘導がmyrAKTとHRASによる腫瘍進展に重要であることが推測された。これを更に検討するために、Mycの競合的阻害分子であるMadMycをTet-ONシステムを用いて誘導することを試みた。myrAKTとHRASと同時にTet-ON-MadMycを導入後、Mycの発現が起こる2週間後にマウスにDoxを飲水投与し、腫瘍形成及び組織像を検討した。

Tet-Off-YAPによる胆管腫瘍形成への影響の検討

Tet-OffシステムはTet-ONとは逆に通常は遺伝子発現が起こるが、Dox処理により遺伝子発現がなくなるシステムである。我々はmyrAKTと活性化変異型YAP^{S127A}(YAP)を同時に肝細胞に導入すると肝細胞から胆管癌が誘導されることを見出した。Tet-Offシステムで通常の方法と同様の効率で胆管腫瘍が誘導できるかを検討した。

4. 研究成果

(1) Creによる遺伝子ノックアウト法

Mx1-Cre マウス

Mx1-Cre マウスにおいて、myrAKTおよびHRASで腫瘍を導入後に、poly(I:C)を投与し腫瘍細胞にてCreの発現の誘導を試みた。poly(I:C)投与3-7日後に肝腫瘍でのX-gal陽性像を検討したが、ほとんどの細胞で陰性で、陽性細胞は腫瘍のごく一部であった。

AAV8-CAG-Cre

myrAKT および HRAS で腫瘍を導入後に、AAV8-CAG-Cre を静脈注射し、3-7 日後に肝腫瘍内での Cre 導入効率を検討した。結果、X-gal 陽性像は腫瘍の 5-10%程度に認められた。また、myrAKT 蛋白質には haemagglutinin (HA) tag がついているので、HA に対する免疫組織化学染色で myrAKT の発現の低下を検討したところ、X-gal 陽性部において HA の陰性化が確認された。

Tet-ON-Cre

Dox にて Cre を誘導する系(TetON-Cre)を Akt/Hras と同時にマウス肝細胞に導入した。腫瘍形成後に Dox 投与し myrAKT の欠失を HA 染色で検討したが、腫瘍の一部でしか myrAKT が欠失しなかった。

(2) テトラサイクリン誘導性の遺伝子発現制御法

Tet-On-MadMyc による腫瘍抑制効果の検討
myrAKT および HRAS と同時に Tet-On-MadMyc のシステムを導入し、遺伝子導入 2 週間後より 2 週間の間 Dox を飲水投与し、Dox を投与しなかったマウスと比較した。Dox を投与したマウスの肝臓は肉眼的に明らかに肝臓のサイズが小さく、肝体重比も有意に低かった。肝臓における遺伝子導入細胞の割合を HA 免疫組織化学染色で検討したところ、Dox 投与群で明らかに HA 陽性細胞の割合が低く、それら腫瘍細胞は著明な脂肪蓄積が認められた。

Tet-Off-YAP による胆管腫瘍形成への影響の検討

Tet-Off システムの導入には 2 種類のプラスミドが必要である。はじめにプラスミドの比を本研究室で通常用いている SB トランスポゼース発現プラスミド 1 に対し、AKT 及び Tet-Off-YAP (2 種類のプラスミドからなる) をそれぞれ 2 のモル比で導入した。結果、コントロールとして用いた AKT/YAP に比べて、AKT/Tet-Off-YAP では腫瘍形成期間が大幅に

遅れ、また、組織学的にも肝細胞腫瘍が主で胆管癌への転換効率が非常に低かった。YAP の発現が不十分と考えて次に、AKT と Tet-Off-YAP のプラスミドのモル比を SB とランスポゼース発現ベクター 1 に対しそれぞれ 2:2、2:4、1:4 及び 0.5:2 とプラスミドの比を変えて導入してみた。結果、いずれのプラスミド比においても AKT/Tet-Off-YAP は、AKT/YAP に比べ腫瘍形成期間が長く、胆管癌への転換効率も低かった。形成された腫瘍における AKT 及び YAP の遺伝子発現を RT-qPCR で検討したところ、AKT/YAP 腫瘍での遺伝子発現に比べていずれのプラスミド比の AKT/Tet-Off-YAP においても、YAP のみならず AKT の発現低下が見られ、これが腫瘍形成効率が悪い原因と判明した。

今回検討した 3 種類の Cre 誘導による遺伝子ノックアウト法はいずれも遺伝子のノックアウト効率が低く、腫瘍のほとんどでのノックアウトが必要な研究には使用することができないことが明らかになった。今後は、Dox 投与により全身の細胞で Tet-On システムが働く Rosa26-M2rtTA マウスやエストロゲンの誘導体である tamoxifen により Cre が活性化する UBC-Cre/ERT2 マウスなどの遺伝子改変動物を用いた方法を検討したい。

Tet-On-MadMyc は、腫瘍全体に Myc の抑制効果が見られ非常に有用な方法であることが明らかになった。今後は、この方法を利用して shRNA や特定のシグナルや分子を阻害する蛋白質を誘導することで、腫瘍の進展・維持機構の解明に応用することが可能である。

Tet-Off-YAP の実験により、プラスミドによる Tet-Off 法は遺伝子導入効率に問題があることが分かったので、プラスミドではなく上に挙げた Rosa26-M2rtTA 等の遺伝子改変動物を用いた検討を行いたい。

以上のように Cre 誘導による遺伝子ノックアウト法を 3 種類と Tet-On および Tet-Off

による遺伝子制御を試みた。その多くは実験に必要な十分な効率が得られなかったが、今回得られた結果により今後検討すべき方向性が明らかになった。また、Tet-ON-MadMycはMadMycを他の分子にすることにより、様々なシグナルや分子の活性化や抑制が可能であることが分かった。

<引用文献>

- Xin, Yamamoto, et al. Critical role of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways. *Oncogene* 2017 [Epub ahead of print]
- Vredeveld et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* 2012 26(10):1055-69.
- Shachaf, et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumor dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004 431(7012):1112-7.
- Fearon and Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 61(5):759-67.

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)

- Xin, Yamamoto, et al. Critical role of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways. *Oncogene* 2017 [Epub ahead of print] 査読有
- Tanimizu, Ichinohe, Yamamoto et al. Progressive induction of hepatocyte progenitor cells in chronically injured liver. *Sci Rep* 2017 DOI:10.1038/srep39990. 査読有
- Yamamoto et al. Role of the BrafV637E mutation in hepatocarcinogenesis induced by treatment with diethylnitrosamine in neonatal B6C3F1 mice. *Mol Carcinog* 2017 56(2):478-488. 査読有

[学会発表](計8件)

- 山本雅大、動物実験肝癌モデルからみた遺伝子異常と肝癌形質の関連、第6回北海道探索病理学研究シンポジウム、2016年9月17日、北海道
- 山本雅大ら、マウス肝細胞におけるNotch経路とPI3 kinase経路の活性化による胆

管性腫瘍の誘導：Myc過剰発現の腫瘍促進効果、第31回発癌病理研究会、2016年8月23日、長野

山本雅大ら、マウス肝腫瘍表現決定におけるYap、Notch、MycおよびPI3 kinase経路の相互作用の検討、第23回肝細胞研究会、2016年7月7-8日、大阪

Yamamoto et al、Effects of the interaction of the PI3 kinase pathway, Hippo-Yap pathway, and c-Myc on the phenotype of mouse liver tumors、The 105th Annual Meeting of the Japan Society of Pathology、2016年5月12-14日、仙台

山本雅大、Sleeping Beautyトランスポゾンによるマウス肝発癌モデル - 発癌関連遺伝子と肝腫瘍形質の関連の検討、第32回日本毒性病理学会総会および学術集会、2016年1月28-29日、高松

Yamamoto et al、Effects of c-Myc and Hippo-Yap pathways on phenotypic determination of mouse liver tumors、第74回日本癌学会、2015年10月8-10日、名古屋

山本雅大ら、マウス肝細胞性腫瘍におけるHippo-Yap経路とc-Mycの活性化の胆管上皮細胞分化に対する影響、第104回日本病理学会総会、2015年4月30-5月2日、名古屋

Yamamoto et al、Opposing effects of the Hippo-Yap pathway and c-Myc in phenotypic determination of mouse hepatocytic tumors induced by myrAkt、Annual Meeting of American Association of Cancer Research、2015年4月18-22日、フィラデルフィア、米国

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 雅大 (YAMAMOTO, Masahiro)
旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：30431399