

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 4日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390118

研究課題名（和文）COX-2/PGE₂経路と炎症反応による胃がん発生促進機序の研究研究課題名（英文）Gastric tumorigenesis through cooperation of COX-2/PGE₂ pathway and inflammatory responses

研究代表者

大島 正伸（OSHIMA MASANOBU）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：40324610

研究成果の概要（和文）：TGF- β シグナル遮断とCOX-2/PGE₂経路の相互作用による、胃がん発生への関与を解析するための新規マウスモデル作製を試みた。TGF- β 受容体遺伝子を条件付きに欠損させるため、胃粘膜で特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウスを作製した。その結果、発現に使用したK19遺伝子プロモーターは発生初期に全身で一過性に発現することや、成熟マウスにおいては転写活性が極めて低いことなどが明らかとなり、K19以外のプロモーターの使用が必要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：To generate a novel mouse model in which TGF- β signaling is blocked and COX-2/PGE₂ pathway is activated, we tried construction of transgenic mice expressing Cre in gastric epithelial cells using K19 gene promoter. However, we found that K19 promoter is active in whole body during embryogenesis and its expression efficiency is very low in adult stomach, indicating that other promoter than K19 is required for future construction of stomach specific Cre mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：胃がん、炎症、COX-2、PGE₂、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

消化器がんの発生には、上皮細胞内での遺伝子変異と炎症反応などの生体反応の双方が必要であると考えられている。とくに誘導型プロスタグランジン合成酵素であるCOX-2とその下流で産生されるPGE₂は、炎症反応に重要であるが、消化器がん組織での発現誘導が認められており、COX-2/PGE₂経

路は発がん重要な生体反応の中心的な役割を果たすと考えられている。一方で、消化器がん発生に重要な上皮細胞内での遺伝子変異として、Wntシグナル亢進やTGF- β シグナル遮断に作用するものが知られている。Wntシグナルは上皮細胞の未分化性の維持に重要であり、TGF- β は逆に分化を誘導する。研究代表者らは、胃がん発生におけるWntシグナル亢進とCOX-2/PGE₂経路の相

相互作用に着目して、*K19-Wnt1/K19-C2mE* 複合トランスジェニックマウス (*Gan* マウス) を作製して解析を行なった。*Wnt* シグナルを亢進させた *K19-Wnt1* マウスでは前がん病変が胃粘膜に発生し、*PGE₂* 経路を誘導した *K19-C2mE* マウスでは胃粘膜の炎症と過形成病変形成が誘導された。一方で、*Gan* マウスでは胃がんを自然発生し、*Wnt* シグナル亢進により未分化性が誘導された上皮細胞が、*COX-2/PGE₂* 経路で誘導される炎症反応により増殖促進して腫瘍が形成したと考えられた。一方で、*TGF-β* シグナル遮断などの *Wnt* シグナル活性化以外の遺伝子変異に起因する発がんにおいて *COX-2/PGE₂* 経路の誘導が腫瘍形成に関与するかについて、個体モデルを用いた解析はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では *Wnt* シグナル活性化以外の遺伝子変異として、*TGF-β* シグナル遮断に着目して研究を行なった。*TGF-β* リガンドは *TGF-β* II 型受容体に結合して *TGF-β* I 型受容体を活性化し、活性化 I 型受容体は *Smad2* または *Smad3* をリン酸化して *Smad4* との複合体を形成し、核内にシグナルを伝える。したがって、*TGF-β* II 型受容体遺伝子 (*Tgfr2*) の欠損により *TGF-β* シグナルは遮断される。

TGF-β シグナルは発生段階に必要なため、*Tgfr2*^{-/-} マウスは胎性致死である。したがって、*Cre-loxP* システムを使って胃粘膜上皮だけで特異的に *Tgfr2* を欠損させる必要がある。本研究では胃粘膜特異的に転写活性のある *K19* 遺伝子プロモーターを用いて、胃上皮細胞で特異的に *Cre* を発現させるマウスを作製し、最終的に *K19-Cre; Tgfr2* (*loxP/loxP*): *K19-C2mE* マウスを作製し、胃発がんにおける *TGF-β* シグナル遮断と *COX-2/PGE₂* 経路の相互作用について解析することを目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) *K19-Cre* マウス作製

Tgfr2 (*loxP/loxP*) マウスは米国がん研究所 (NCI) のマウスコンソーシアムから導入した。すでに単離しているマウス *K19* 遺伝子プロモーターに *Cre* 遺伝子を繋いだ発現ベクターを作製し、受精卵へのマイクロインジェクションにより *K19-Cre* マウスを作製した。複数系統を作製し、*Tgfr2* (*loxP/loxP*) マウスと交配して胃粘膜上皮で特異的に *Tgfr2* 遺伝子を欠損するか、PCR 法にて解析した。

(2) *K19-CreER* マウス作製

時期的な *Cre* 発現を制御するためにタモキシフェン投与により *Cre* の活性を誘導でき

る *CreER* の遺伝子を *K19* プロモーターに繋いだ発現ベクターを作製し、*K19-CreER* マウスを作製した。こちらも複数系統作製し、*Cre* の活性誘導を確認するためにレポーターマウス *ROSA26-loxP-STOP-loxP-LacZ* マウス (*ROSA26-LacZ* マウス) と交配し、タモキシフェン投与による *LacZ* の発現誘導について解析した。

(3) *ROSA26-CreER* マウスを用いた実験

以上の実験で作製したマウス胃粘膜上皮細胞で *Cre* の発現誘導が認められない場合、全身の組織で転写活性のある *ROSA26* 遺伝子プロモーターを用いた *Cre* 発現マウス、*ROSA26-CreER* を導入して同様の実験を行なう。

4. 研究成果

(1) *K19-Cre* マウスの作製

K19 プロモーターに *Cre* 遺伝子を繋いだ発現ベクターを *C57BL/6* マウスの受精卵前核にマイクロインジェクションし、*K19-Cre* マウスを 3 系統 (#1~#3) 作製した。#1 および #3 の 2 系統で導入遺伝子の生殖系列での伝達を確認した。胃粘膜組織を用いたウェスタンブロットティングにより #1 系統の *Cre* 発現が強かったため *K19-Cre#1* マウスと *Tgfr2* (*loxP/loxP*) の交配実験を行なった。その結果、*K19-Cre#1; Tgfr2* (*loxP/+*) マウスの胃粘膜で *Tgfr2* 遺伝子がコンディショナルに欠損した DNA が PCR により確認できた。しかし、*K19-Cre#1; Tgfr2* (*loxP/loxP*) マウスは胎性致死を回避できなかった。詳細な *K19-Cre#1; Tgfr2* (*loxP/+*) マウスの解析の結果、胃以外にも全身組織で *Tgfr2* 遺伝子の欠損が検出されていた。したがって、使用した *K19* プロモーターは成熟マウスでは胃上皮だけで転写活性が確認されているが、胎仔期では一過性に全身で発現しており、そのために *loxP* が導入された *Tgfr2* は全身組織で欠損してしまったと考えられた。

そこで、発現量の低い #3 系統と *Tgfr2* (*loxP/loxP*) との交配実験を行なったが、#3 系統で発現する *Cre* リコンビナーゼ活性は弱く、*K19-Cre#3; Tgfr2* (*loxP/loxP*) マウスは生まれるが、胃粘膜での *Tgfr2* 遺伝子欠損は検出できなかった。以上の結果から、タモキシフェンの投与により *Cre* によるリコンビナーゼ活性が誘導できる、*CreER* 遺伝子の発現マウス作製が必要となった。

(2) *K19-CreER* マウス作製

K19 プロモーターに *CreER* 遺伝子を繋いだ発現ベクターを作製し、上記と同様の方法により *K19-CreER* マウスを作製した。#1-2 の 2 系統で生殖系列での伝達に成功したので、それぞれの系統マウスを *ROSA26-LacZ*

マウスと交配し、*K19-CreER: ROSA26-LacZ* マウスを作製した。得られたマウスにタモキシフェンを5日間連投し、1週間後に病理解剖してX-gal染色を行なった結果、胃粘膜で青染される細胞は認められたが、その頻度は極めて低く、*Tgfr2* 遺伝子欠損による影響を解析する目的には不十分と考えられた(図1)。一方で、*K19-C2mE* マウスで発生する



図1
K19-CreER:
Rosa26-LacZ
マウス胃粘膜のX-gal染色。青染される細胞数の頻度が低い。

胃粘膜過形成病変では K19 プロモーターの転写活性を認める胃上皮細胞数が増えるので、CreER 発現細胞数の増加が期待された。そこで、*K19-CreER: K19-C2mE* および *ROSA26-LacZ*:マウスを作製し、過形成を認める15週齢から30週齢までタモキシフェンを毎週1回の頻度で連投した。しかし、青染する上皮細胞数の増加は認められず、作製した *K19-CreER* マウスも *Tgfr2* 遺伝子欠損モデル作製には組換え活性が不十分と判断された。

(3) ROSA26-CreER マウスを用いた実験

ROSA26 遺伝子は全身の細胞で発現するため、遺伝子変異による致死を回避する目的には適していない。しかし、CreER を用いて、タモキシフェンによる組換え効率を低下させることで、致死を回避しながらも胃粘膜における症状を解析するために十分な組換えを誘導することも可能と考えられた。そこで、新たに *ROSA26-CreER* マウスを導入し、交配実験を行なった。本研究課題による研究期間内に、*ROSA26-CreER: ROSA-LacZ* マウスの作製まで実施した。今後、作製したマウスモデルを使って、タモキシフェンの投与頻度と胃上皮細胞での組換え効率との関連について解析を行ない、*Tgfr2* (loxP/loxP) マウス、*K19-C2mE* マウスとの交配を行なうことで TGF- β シグナル遮断と COX-2/PGE₂ 経路の胃がん発生における相互作用の解析が可能となる。

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9件)

1. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T,

Ishikawa T, and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene*, 2012, in press. (査読有り) doi: 10.1038/onc.2011.558.

2. Oshima H, and Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: Lessons from mouse models. *J Gastroenterol* 47: 97-106, 2012. (査読有り) doi: 10.1007/s00535-011-0523-6
3. Oshima H, Hioki K, Popivanova BK, Oguma K, van Rooijen N, Ishikawa T, and Oshima M. Prostaglandin E₂ signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology* 140: 596-607, 2011. (査読有り) doi:10.1053/j.gastro.2010.11.007
4. Oshima H, Popivanova BK, Oguma K, Kong D, Ishikawa T, and Oshima M. Activation of epidermal growth factor receptor signaling by the prostaglandin E₂ receptor EP4 pathway during gastric tumorigenesis. *Cancer Sci* 102: 713-719, 2011. (査読有り) doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01847.x.
5. Oshima H and Oshima M. Mouse models of gastric tumors: Wnt activation and PGE₂ induction. *Pathol Int* 60: 599-607, 2010. (査読有り) doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02567.x
6. Oguma K, Oshima H, and Oshima M. Inflammation, tumor necrosis factor and Wnt promotion in gastric cancer development. *Future Oncol* 6: 515-526, 2010. (査読有り) URL: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fon.10.13>
7. Du Y-C, Oshima H, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, Piao YS, Yoshimoto T, Minamoto T, Taketo MM, and Oshima M. Induction and downregulation of *Sox17* and its roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 137: 1346-1357, 2009. (査読有り) doi:10.1053/j.gastro.2009.06.041
8. Oshima H, Itadani H, Kotani H, Taketo MM, and Oshima M. Induction of prostaglandin E₂ pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res* 69: 2729-2733, 2009. (査読有り) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4394
9. Oshima H, Oguma K, Du Y-C, and Oshima M. Prostaglandin E₂, Wnt and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* 100: 1779-1785, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 31 件)

1. Oshima M. Inflammatory-associated promotion of gastric tumorigenesis. *9th Japan-China Cancer Research Workshop*, 2011. 12. 23, Oriental Riverside ホテル (中国)
2. Ishikawa T., and Oshima M. Effects of inflammatin on the epithelial differentiation and tumorigenesis. *16th Japan-Korea Cancer Research Workshop*, 2011. 12. 10, 北海道大学 (北海道)
3. Oshima M. TNF- α and infectious stimulation in gastric tumorigenesis. *1st International Scientific Coordination Network (ISCN)* <日仏がんワークショップ>, 2011. 11. 22, モンペリエ・メルキュールホテル(フランス)
4. Oshima M. TNF- α and inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. *23th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology*, 2011. 10. 6, ソウル COEX (韓国)
5. Oshima M. Inflammatory responses in gastric cancer development. *70th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, 2011. 10. 5, 名古屋国際会議場 (愛知県)
6. Oshima H., and Oshima M. Inflammatory responses and TNF- α in mouse gastric tumorigenesis. *70th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, 2011. 10. 4, 名古屋国際会議場 (愛知県)
7. Ishikawa T., and Oshima M. Cox-2 deletion in myeloid and endothelial cells, but not in epithelial cells, exacerbates murine colitis. *70th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, 2011. 10. 3, 名古屋国際会議場 (愛知県)
8. Oshima M. Mouse models of gastric cancer by Wnt activation and PGE₂ induction. *4th Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium*, 2011. 7. 5, 国立シンガポール大学 (シンガポール)
9. Oshima H., and Oshima M. COX-2/PGE₂ signaling and infectious stimulation in mouse gastric tumorigenesis. *9th International Gastric Cancer Congress (IGCC)*, 2011. 4. 21, ソウル COEX (韓国)
10. 大島 正伸. 炎症性微小環境と消化管発がん. 第 1 回「がん微小環境」公開ワークショップ (特別講演). 2011. 6. 17, 東京大学 (東京)
11. Oshima H, Kong D, Ju XiaoLi, and Oshima M: Inflammatory microenvironment by cooperation of PGE₂ and bacterial infection in mouse gastric tumors. 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム/金沢国際がん生物学シンポジウム, 2011. 5. 25, 石川県立音楽堂 (石川県)
12. Oshima H, and Oshima M: Inflammatory microenvironment by cooperation of PGE₂ and bacterial infection in mouse gastric tumors. *15th Japan-Korea Cancer Research Workshop*, 2010. 12. 22, 仁川シェラトンホテル (韓国)
13. Oshima M. Promotion of gastric tumorigenesis by inflammatory prostaglandin E₂. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会 [BMB2010], 2010. 12. 7, 神戸ポートピア (兵庫県)
14. Oshima M. Gastric cancer mouse models to understand the “biology of cancer”. *Seoul National Univ. Cancer Research Institute Symposium –Linking Systems Biology to Cancer Research*, 2010. 11. 6, ソウル大学 (韓国)
15. Oshima M. Inflammatory responses and infection in Gastric tumorigenesis of mouse model. *International symposium on TGF- β signaling, Inflammation and Cancer Prevention*, 2010. 11. 5, CHA メディカルセンター (韓国)
16. Oshima H., and Oshima M. Gastric tumorigenesis through bacterial infection and COX-2/PGE₂ signaling pathway. *69th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, 2009. 9. 23, リーガロイヤルホテル (大阪府)
17. Oshima M. Gastric tumorigenesis in mice through Wnt activation and PGE₂-induced inflammatory responses. *International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa –Satellite Symposium of 14th International Congress of Immunology*, 2010. 8. 28, KKR ホテル (石川県)
18. 大島 正伸. 胃発がんにおける炎症反応とプロスタグランジン E₂ の役割. 第 25 回発癌病理研究会, 2010. 8. 26, 松島一の坊 (宮城県)
19. 大島 正伸. 胃癌発生を促進する炎症反応の分子機序. 第 7 回日本病理学会カンファレンス. 2010. 8. 6, 岡山全日空ホテル (岡山県)
20. 大島 正伸. Wnt 活性化と炎症による胃がん発生の分子機序. 第 29 回分子病理学研究. 2010. 7. 31, 筑波大学 (茨城県)

21. Oshima M. Inflammatory responses in gastrointestinal tumorigenesis. 5th *International Symposium of Institute Network*, 2010. 6. 24, KKR ホテル (石川県)
22. 大島 正伸. 胃癌モデルマウスにおける initiation-promotion 解析. 第19回日本がん転移学会学術集会. 2010. 6. 16, 金沢市文化ホール (石川県)
23. Oshima H., Oguma K, Hioki K, and Oshima M. Recruitment of tumor-associated macrophages by cooperation of PGE₂ pathway and infectious stimulation. 101th *Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR)*, 2010. 4. 21, Washington DC コンベンションセンター (米国)
24. 大島 正伸. 炎症と胃癌発生: Pathway specific マウスモデルからのアプローチ. 第26回日本毒性病理学会, 2010. 2. 3, 石川県立音楽堂 (石川県)
25. Oshima M., Oguma K, and Oshima H. Tumor macrophages and inflammatory pathway on gastric tumorigenesis. 14th *Korea-Japan Cancer Research Workshop*, 2009. 12. 20, 金沢 ANA クラウンプラザホテル (石川県)
26. Oshima M. Gastric tumorigenesis through cooperation of oncogenic activation and COX-2/PGE₂ pathway. *International Symposium on TGF-β, Inflammation, and Cancer Prevention*, 2009. 11. 20, 仁川シェラトンホテル (韓国)
27. 大島 正伸. 胃癌発生における COX-2/PGE₂ 経路の役割. 第51回日本消化器病学会大会. 2009. 10. 16, 国立京都国際会館 (京都府)
28. Oshima H., and Oshima M. Gastric tumorigenesis through suppression of BMP signaling [International Session]. 68th *Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, 2009. 10. 1, パシフィコ横浜 (神奈川県)
29. Oshima H., Oguma K, and Oshima M. Inflammation and gastric tumor mouse model [Symposium]. 68th *Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, 2009. 10. 2, パシフィコ横浜 (神奈川県)
30. Oshima M. Prostaglandin E₂ signaling and inflammation in gastric tumorigenesis. 29th *International Symposium on Cancer*, 2009. 7. 13, 北海道大学学術交流会館 (北海道)
31. Oshima M. Gastric tumorigenesis caused by cooperation of inflammation and oncogenic activation: 17th *International Symposium on Molecular Cell Biology of*

Macrophages, 2009. 7. 3, KKR ホテル (石川県)

[図書] (計9件)

1. 大島 正伸, 中山書店, 消化管 (胃・腸管) (疾患モデルマウス表現型解析指南) 2011年, 175頁-180頁
2. 大島 正伸, メジカルビュー社, 炎症とがん-最新の知見・総論- (侵襲と免疫) 2011年, 20巻, 128頁-134頁
3. 大島 正伸, メディカルレビュー社, 癌と炎症 (血管医学) 2011年, 12巻, 67頁-72頁
4. 大島 正伸, 医歯薬出版, 消化器がん発生における慢性炎症の役割 (医学のあゆみ) 2011年, 236巻, 267頁-270頁
5. 大島 正伸, 羊土社, COX-2/PGE₂ 経路と発がん (実験医学) 2011年, 29巻 1599頁-1604頁,
6. 大島 正伸, 羊土社, 炎症反応による発癌促進のメカニズム (実験医学) 2011年, 29巻, 242頁-248頁
7. 大島 浩子, 大島 正伸, 羊土社, 慢性炎症と発がん: 炎症性微小環境による発癌機構 (実験医学) 2011年, 28巻, 1698頁-1704頁
8. 大島 浩子, 大島 正伸, 秀潤社, 胃癌発生における炎症反応の役割 (細胞工学) 2010年, 29巻, 576頁-580頁
9. 大島 正伸: COX-2/プロスタグランジンと消化器がん, *The Lipid*, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://genetics.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 正伸 (OSHIMA MASANOBU)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号: 40324610

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大島 浩子 (OSHIMA HIROKO)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 80362515

石川 智夫 (ISHIKAWA TOMOO)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 70322162