

## 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 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300317

研究課題名（和文） 難治消化器がんの発生・進展におけるNF- $\kappa$ Bシグナルの関与研究課題名（英文） Roles of NF- $\kappa$ B activation in gastrointestinal tumorigenesis

研究代表者

前田 慎 (MAEDA SHIN)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40415956

研究成果の概要（和文）：炎症発癌のメカニズムを担うシグナル伝達系の一つとして重要と考えられ、かつ治療ターゲットとして有力な候補であるNF- $\kappa$ B活性化の消化器癌との関与および治療の可能性について検討した。多くの消化器癌でその活性化が認められるが、中でも胃癌、膵臓癌の動物モデルおよび細胞を用いた基礎的検討においてNF- $\kappa$ B活性化は重要な悪性化因子であり、治療のターゲットになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is thought that NF- $\kappa$ B activation is one of the important signal transduction systems for inflammation-related carcinogenesis. We analyzed the relationship between the NF- $\kappa$ B activation and gastrointestinal cancer development. The activation was observed in many gastrointestinal cancers. Using in vitro culture system and mouse model, NF- $\kappa$ B activation was an important malignant factor for gastric and pancreatic cancers, suggesting that inhibition of NF- $\kappa$ B activity may become a drug target.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：発がん

キーワード：癌・動物

## 1. 研究開始当初の背景

多くの臓器において癌の発生が慢性炎症に伴い生じるため、炎症と発癌には深い関

連性があると考えられてきた。最近の検討によって発癌過程、特に、その促進過程

(promotion) における炎症の働きが明らかになりつつある。炎症から発癌への詳細なメカニズムの解析が行われれば、その過程における重要な分子に対する薬剤開発は発癌抑制において強力な対策となると考えられる。

消化器領域における慢性炎症と発癌との関連は食道炎、胃炎、小腸、大腸炎、膵炎、肝炎と多くの臓器にわたる。その中でも特に興味深いのは、胃炎、肝炎における感染症を基にした慢性炎症である。胃炎は *Helicobacter pylori* (ヘリコバクター) であり、肝炎は Hepatitis virus (肝炎ウイルス) であるが、これらの感染源を駆除することにより、胃癌、肝癌の発癌率が低下する (Uemura N et al. NEJM 2003, Yoshida H et al. Ann Intern Med 2000)。このように、明らかな炎症惹起型の発癌に加えて、明かな炎症を介さない癌においても癌微小環境における炎症の役割も明らかになりつつある。例えば腫瘍部に浸潤するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophages: TAMs) と称され、さまざまなサイトカインを分泌し、腫瘍形成に関連している。

慢性炎症の発癌促進段階における関与は近年多くの検討によって、しだいに明らかになりつつある。この促進段階は不死化 (Initiation) した細胞の増殖段階であり、増殖、抗アポトーシス、血管増殖、浸潤、転移などが重要である (Hanahan and Weinberg, Cell 2003)。慢性炎症時にはこれらの段階を促進する因子である炎症性サイトカイン、増殖因子が集積した炎症細胞より放出される。

炎症発癌のメカニズムを担うシグナル伝達系の一つとして重要と考えられ、かつ治療ターゲットとして有力な候補として NF- $\kappa$ B 活性化が挙げられる。NF- $\kappa$ B は p65, c-Rel, RelB, p100/p52, p105/p50 の 5 つの蛋白のうち 2 つ

が 2 量体として細胞質に存在し、非活性化状態では I $\kappa$ B という阻害蛋白と結合している。古典的経路では TNF $\cdot$  や IL-1 などの刺激によって IKK が活性化、それに続き I $\cdot$ B がリン酸化され分解されることにより、NF- $\kappa$ B は核に移行し、転写因子として作用する。近年では IKK $\cdot$  の活性化を介した非古典的経路の報告もある。この因子において制御される遺伝子は多岐にわたり、特に炎症性サイトカインの発現 (IL-1, IL-6, TNF) において重要である。その活性化と発癌との関連は抗アポトーシス (cIAP, c-FLIP など)、細胞増殖 (Cyclin D など) および転移 (MMP など)、血管新生 (IL-8, COX-2 など) などの遺伝子制御によると考えられている。

これまでに研究者らはいくつかの消化器臓器において、主にマウスモデルを用いて NF- $\kappa$ B 活性化と発癌について検討してきた (Maeda S et al. Cell 2005, Maeda S et al. Hepatology 2009, Sakamoto K et al. Clin Cancer Res 2009, Hayakawa Y et al. J Gastroenterol 2009)。さらにいくつかのグループからも同様の解析が行われている (Greten FR et al. Cell 2004, Pikersky E et al. Nature 2004)。しかしながら、これらで用いられているモデルは主に化学物質や薬剤を用いたモデルであり、そのヒトにおける臨床病態との違いは明白である。さらに、その詳細なメカニズムはいまだ不明であり臨床応用には至っていない。

## 2. 研究の目的

今回の目的は NF- $\kappa$ B 活性化と癌発生・進展における関連を臨床病態に類似したモデルにおける検討、さらに上下流の因子の解析を行い、治療標的としての可能性を高めることである。

### 3. 研究の方法

(1) 難治がんモデルの作成とNF- $\kappa$ B活性化との関連の検討

①胃癌モデル ヒト胃癌ではしばしばHER2の高発現が観察されている。そこで、胃特異的HER2トランスジェニックマウスを作成し、このモデルにおけるNF- $\kappa$ B活性化関与を解析した。

②膵臓癌モデル 膵特異的oncogenic K-ras発現と膵特異的TGFbetaレセプターIIノックアウトによってヒトの膵臓癌に病理学的に近い癌が観察されるが (Ijichi H et al. Genes Dev 2005)、このマウスにNF- $\kappa$ B活性化における重要なキナーゼであるIKK $\beta$  floxedを交配することにより、その影響を検討した。

(2) 恒常的IKK $\beta$ 活性化マウスの作成

恒常的IKK $\beta$ 活性化が発癌に及ぼす影響を検討するため、恒常活性型IKK $\beta$  (IKK $\beta$ E (S177E, S181E))を胃、腸で強く発現するCK-19プロモーター下に発現させ、その影響を観察した。

(3) DNAダメージ応答によるIKK $\beta$ の働き

胃癌などは食物中のアルキル化物質などによって、DNAダメージを受けている。一方NF- $\kappa$ BはDNAダメージにて活性化される。その働きの解析の目的でIKK $\beta$ ノックダウン細胞を用いて、DNAダメージ応答について解析した。

(4) NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$  阻害剤用いた治療への応用についての検討

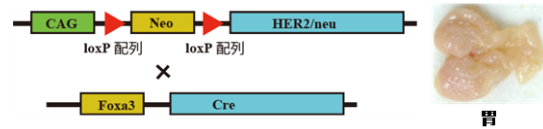
動物モデルを用いてIK $\kappa$ Bのプロテアソームでの分解を阻害するプロテアソーム阻害剤を用いて検討を行った。プロテアソーム阻害剤はすでに骨髄腫治療に臨床応用されており、固形癌への使用が期待されている。

### 4. 研究成果

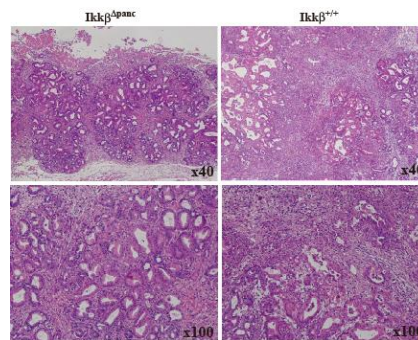
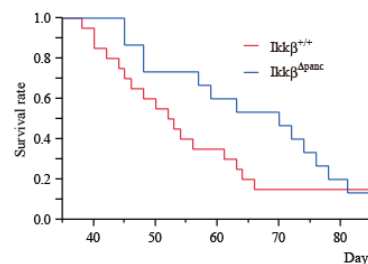
(1) 難治がんモデルの作成とNF- $\kappa$ B活性化との関連の検討

①胃癌モデル 胃特異的HER2トランスジェニックマウスでは胃粘膜の過形成が観察され、

炎症を伴っていた。しかし12ヶ月齢までは発癌は観察されていない。周囲には軽度の炎症所見を伴い、NF- $\kappa$ B活性化が観られた。



②膵臓癌モデル 膵臓におけるIKK $\beta$ ノックアウトマウスは特に異常は観られなかった。発癌モデルとの交配により、IKK $\beta$ を欠損させることによって、寿命は延長し、腫瘍発生は抑制された(下図)。その腫瘍より細胞を樹立し解析した結果、IKK $\beta$ の欠損によってTNF $\alpha$ アポトーシスの亢進および細胞増殖の抑制が明らかとなった。



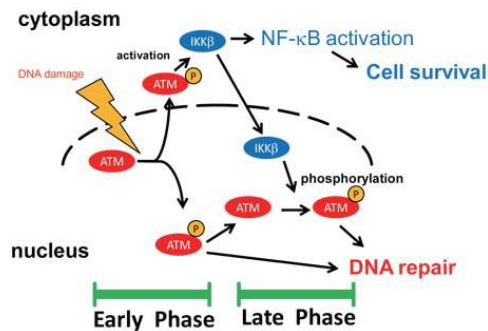
(2) 恒常的IKK $\beta$ 活性化マウスの作成

7か月目までは大きな異常は見られなかったため、炎症モデルを用いた検討した。DSS腸炎を用いた検討では、炎症が悪化の傾向を認められた。

(3) IKKbetaによるDNAダメージ応答

IKK $\beta$ はアルキル化剤によるDNAダメージにより、NF- $\kappa$ B活性化は観察されるもののこの活性化とは無関係に遺伝子修復に重要な因子であるATMをリン酸化し、DNA修復に働いてい

ることが明らかとなった。一方で、NF- $\kappa$ B活性化は細胞死を抑制し、DNA修復を促進していた。さらにIKK $\beta$ はDNAダメージによってリン酸化を受け、核移行し、核内でATMをリン酸化していることが明らかとなった。



(4) NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$  阻害剤を用いた治療への応用についての検討

プロテアソーム阻害剤を用いて胃癌細胞株における *in vitro*, *in vivo* の解析を行なった結果、極めて強い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

#### 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 10 件)

1. Sakamoto K, Hikiba Y, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, Kinoshita H, Nakata W, Sakitani K, Takahashi R, Akanuma M, Kamata H, Maeda S. Promotion of DNA repair by nuclear IKK $\beta$  phosphorylation of ATM in response to genotoxic stimuli. **Oncogene**. 2013 Apr 4;32(14):1854-62. 査読有
2. Hayakawa Y, Hirata Y, Sakitani K, Nakagawa H, Nakata W, Kinoshita H, Takahashi R, Takeda K, Ichijo H, Maeda S, Koike K. Apoptosis signal-regulating kinase-1 inhibitor as a potent therapeutic drug for the treatment of gastric cancer. **Cancer Sci**. 2012 Dec;103(12):2181-5. 査読有
3. Nakata W, Hayakawa Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Kinoshita H, Takahashi R, Hirata Y, Maeda S, Koike K. Anti-tumor activity of the proteasome inhibitor bortezomib in gastric cancer. **Int J Oncol**. 2011 Dec;39(6):1529-36.

査読有

4. Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, Tada M, Ohta M, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Maeda S, Shiina S, Yoshida H, Nakajima O, Kanai F, Omata M, Koike K. Altered Composition of Fatty Acids Exacerbates Hepatocarcinogenesis during Activation of the Phosphatidylinositol 3-kinase Pathway. **J Hepatol**. 2011 Dec;55(6):1400-8. 査読有
5. Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, Akanuma M. Colon cancer-derived factors activate NF- $\kappa$ B in myeloid cells via TLR2 to link inflammation and tumorigenesis. **Mol Med Report**. 2011 Nov-Dec;4(6):1083-8. 査読有
6. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Bierie B, Tada M, Mohri D, Miyabayashi K, Asaoka Y, Maeda S, Ikenoue T, Tateishi K, Wright CV, Koike K, Omata M, Moses HL. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. **J Clin Invest**. 2011 Oct 3;121(10):4106-17. 査読有
7. Sakitani K, Hirata Y, Watabe H, Yamada A, Sugimoto T, Yamaji Y, Yoshida H, Maeda S, Omata M, Koike K. Gastric Cancer Risk According to the Distribution of Intestinal Metaplasia and Neutrophil Infiltration. **J Gastroenterol Hepatol**. 2011 Oct;26(10):1570-5. 査読有
8. Nakagawa H, Hirata Y, Takeda K, Hayakawa Y, Sato T, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakata W, Hikiba Y, Omata M, Yoshida H, Koike K, Ichijo H, Maeda S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated mitogen-activated protein kinase. **Hepatology**. 2011 Jul;54(1):185-95. 査読有
9. Seto M, Ohta M, Ikenoue T, Sugimoto T, Asaoka Y, Tada M, Mohri D, Kudo Y, Ijichi H, Tateishi K, Otsuka M, Hirata Y, Maeda S, Koike K, Omata M. Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer. **Int J Cancer**. 2011 Mar 15;128(6):1293-302. 査読有
10. Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, S

akamoto K, Hikiba Y, Kinoshita H, Nakata W, Takahashi R, Tateishi K, Tada M, Akanuma M, Yoshida H, Takeda K, Ichijo H, Omata M, Maeda S, Koike K. Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 11; 108(2):780-5. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. 芝田 涉, 安崎 弘晃, 前田 愼: IRF1 欠損はヘリコバクター関連胃発癌に促進的に関与する. 第 54 回日本消化器病学会大会, 2012, 10, 10, 神戸国際展示場 (兵庫県).
2. 坂本啓, 平田喜裕, 前田 愼: KRAS もしくは BRAF 変異がもたらす抗癌剤負可時の大腸癌細胞のシグナル伝達の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 9, 19, ロイトン札幌 (北海道).
3. Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, Sakitani K, Kinoshita H, Takahashi R, Nakata W, Sakamoto K, Akanuma M, Maeda S, Koike K: Ask1 Plays a Critical Role in *H. pylori*-induced Gastric Inflammation and Metaplasia. *DIGESTIVE DISEASE WEEK (DDW) 2012*, 5, 20, San Diego. USA.
4. Sakamoto K, Hikiba Y, Hayakawa Y, Hirata Y, Akanuma M, Maeda S: Nuclear IKK  $\beta$  Phosphorylates ATM in Response to Genotoxic Stimuli, Which Helps Cancer Cell to Survive DNA Damage. *DIGESTIVE DISEASE WEEK (DDW) 2012*, 5, 19, San Diego. USA.
5. Shibata W, Yasuzaki H, Kubushiro Y, Hotta C, Tamura T, Maeda S: Loss of IRF Signaling Contributes to the Development of Helicobacter Associated Gastric Carcinogenesis in Vivo. *DIGESTIVE DISEASE WEEK (DDW) 2012*, 5, 19, San Diego. USA.
6. Sakamoto K, Hikiba Y, Hirata Y, Akanuma M, Kamata H, Maeda S: Nuclear IKK  $\beta$  phosphorylates ATM in response to genotoxic stimuli, which promotes DNA repair. 第 34 回日本分子生物学会年会, ワークショップ, 2011, 12, 15, パシフィコ横浜 (神奈川県).
7. Maeda S: Inflammation-and stress-related signaling pathways in gastric carcinogenesis. International Scientific Coordination Network (ISCN) Groupement de Recherche (GDRI), 2011, 11, 24. Montpellier. FRANCE
8. 坂本啓, 早河翼, 中田和智子, 平田喜裕, 前田 愼: DNA 損傷により惹起される核内 IKK  $\beta$  による ATM リン酸化と DNA 修復促進. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 10, 5, 名古屋国際会議場 (愛知県).
9. 前田 愼: ヘリコバクターピロリ感染による発癌と炎症の役割. 第 97 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 7 (ヘリコバクターピロリ感染症の徹底検証), 2011, 5, 14, 京王プラザホテル (東京都).
10. Kinoshita H, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hayakawa Y, Takahashi R, Nakata W, Sakitani K, Hikiba Y, Akanuma M, Maeda S, Koike K: Interleukin-6 (IL-6) plays an important role in epithelial-stromal interaction and promotes gastric tumorigenesis. *DIGESTIVE DISEASE WEEK (DDW) 2011*, 5, 10, Chicago. USA.
11. Takahashi R, Nakata W, Kinoshita H, Hayakawa Y, Nakagawa H, Ijichi H, Hirata Y, Maeda S, Koike K: Analysis of the role of JNK and therapeutic effect of JNK inhibition in pancreatic cancer: *DIGESTIVE DISEASE WEEK (DDW) 2011*, 5, 7, Chicago. USA.
12. 前田 愼: 炎症と胃発癌. 第 100 回日本病理学会総会 シンポジウム 3 (感染・炎症と胃癌), 2011, 4, 29, パシフィコ横浜 (神奈川県).
13. 中川勇人, 平田喜裕, 早河翼, 木下裕人, 坂本啓, 引場陽子, 高橋良太, 中田和智子, 崎谷康介, 小池和彦, 小俣政男, 前田 愼: Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は JNK-Bim 経路を介したアポトーシスを誘導し肝発癌を抑制する. 国際科学振興財団フォーラム第 18 回浜名湖シンポジウム 一般演題 (27 消化器疾患に関するもの), 2010, 12, 25, アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県).
14. 中田和智子, 早河翼, 中川勇人, 平田喜裕, 小池和彦, 前田 愼: 胃癌に対するプロテアソーム阻害薬 (bortezomib) の効果に関する検討. 第 18 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2010), 一般演題, 2010, 10, 13, パシフィコ横浜 (神奈川県).
15. 前田 愼: 肝発がんにおける IKK/NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の働き. 第 69 回日本癌学会学術総会がん征圧へ向けての知の統合 (MV2 JCA・モヴェルネ賞), 2010, 9, 24, 大阪国際会議場 (大阪府).
16. 前田 愼, 坂本啓, 中川勇人, 早河翼, 平田喜裕: 膵がん発生における IKK $\beta$  の役割の検討. 第 69 回日本癌学会学術総会がん征圧へ向けての知の統合 (動物発がんモデル (1)), 2010, 9, 23, 大阪国際会

- 議場（大阪府）。
17. 早河翼, 平田喜裕, 一條秀憲, 小俣政男, 前田慎, 小池和彦: 胃癌における Apoptosis Signal-regulating kinase 1 (ASK1) の重要性. 第69回日本癌学会学術総会がん征圧へ向けての知の統合 (シグナル伝達 1), 2010, 9, 22, 大阪国際会議場 (大阪府)。
  18. 中田和智子, 早河翼, 中川勇人, 平田喜裕, 小池和彦, 前田慎: 胃癌に対するプロテアソーム阻害薬 (bortezomib) の効果に関する検討. 第69回日本癌学会学術総会がん征圧へ向けての知の統合 (新規分子標的薬 (3)), 2010, 9, 22, 大阪国際会議場 (大阪府)。
  19. Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hikiba Y, Yanai A, Akanuma M, Ogura K, Yoshida H, Omata M, Maeda S. Apoptosis Signal-Regulating kinase 1 (ASK1) Regulates Colitis and Colitis-Associated Tumorigenesis via the Innate Immune Responses. DIGESTIVE DISEASE WEEK 2010, 2010, 5, 4, New Orleans. USA.
  20. Hirata Y, Hayakawa Y, Nakagawa H, Nakata W, Sakamoto K, Omata M, Maeda S: Role of NF- $\kappa$ B in Controlling Citrobacter rodentium-Induced Colitis. DIGESTIVE DISEASE WEEK 2010, 2010, 5, 4, New Orleans. USA.
  21. Sakamoto K, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Yanai A, Hirata Y, Ogura K, Akanuma M, Maeda S: The Impact of I $\kappa$ B Kinase Beta in Gastric Carcinogenesis. DIGESTIVE DISEASE WEEK 2010, 2010, 5, 4, New Orleans. USA.
  22. Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Okamoto M, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, Nakata W, Ijichi H, Omata M: Requirement for IKK $\beta$  in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: DIGESTIVE DISEASE WEEK 2010, 2010, 5, 3, New Orleans. USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 慎 (MAEDA SHIN)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 40415956

### (2) 研究分担者

大塚 基之 (OTSUKA MOTUYUKI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90518945  
伊地知 秀明 (IJICHI HIDEYUKI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 70463841