

## 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 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590371

研究課題名(和文) 大腸及び膵臓発がんにおけるオステオポンチンとそのがん特異的分子の生理的役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of physical roles of osteopontin and its cancer-specific molecules in colorectal and pancreatic carcinogenesis

研究代表者 高橋 真美

(TAKAHASHI MAMI)

独立行政法人 国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90214973

研究成果の概要(和文)：ラット及びマウスの大腸化学発がんモデルとハムスター及びマウスの膵臓発がんモデルの腫瘍組織において、OPNaの顕著な発現上昇が認められた。OPN欠損が大腸発がんに及ぼす影響は明らかではなかったが、マウス膵臓発がんモデルにおいてはOPN欠損により発がん率及び発生個数の減少が認められたことから、OPNが一部のがんへの進展、浸潤等に関与しており、発がん抑制のターゲットとなりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Marked elevation of OPNa expression was observed in tumor tissues of chemically-induced colon carcinogenesis model in rats and mice and of pancreatic carcinogenesis models in hamsters and mice. Effect of OPN deficiency on colon carcinogenesis was not evident, but pancreatic cancer incidence and multiplicity were decreased by OPN deficiency in mouse pancreatic carcinogenesis model. The results suggest that OPN is partly involved in cancer development and invasion, and could be a target for cancer prevention.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

OPN は、骨形成や T-cell の活性化等に関わっている分泌型のリン酸化糖蛋白質で、カルシウムと結合能がある他、細胞接着配列を有して、インテグリンと結合し、細胞の接着や遊走に関与する (Kazanechi, C.C., et al., J. Cell. Biochem., 2007 (review)). OPN は、大腸がんや膵臓がんを含め、多様ながんが発現が上昇しており、マトリックス

タロプロテアーゼ (MMPs) の活性化等を介してがんの悪性化に関与していると考えられている (Rangaswami, H., et al. Trends Cell Biol., 2006 (review)). OPN の発現は、Ras-activated enhancer や Tcf-4、c-Jun 等により制御される (Denhardt, D.T., et al., Clin. Experim. Metastasis, 2003)。がん以外にも、糖尿病や動脈硬化の病態に関わっており、最近では、肥満者の内臓脂肪や

血清中の OPN レベルが高いという報告もある (Kiefer, F.W., et al., Endocrinology, 2008)。一方、近年の生活習慣の変化により、高脂肪食や運動不足などが肥満を介して大腸がんや膵臓がん等の発生を増加させていると考えられている。申請者らはメタボリックシンドロームの発がんへの関わりについて実験動物モデルを用いて研究しており、これまでにハムスターにおける高脂血症が膵臓がんの発生に促進的に働いている可能性を示してきた (Takeuchi, Y., et al., Carcinogenesis, 2007)。そして、*N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発ハムスター膵臓がんにおいて、がん組織および血清中で増加している因子を検索したところ、OPNの発現が顕著に上昇しており、がん組織では正常組織とは異なる分子量の OPN が存在することを見出した (未発表データ)。Azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸腫瘍においても OPN の強い発現上昇を認め、さらに、前がん病変である aberrant crypt foci (ACF) の一部でも OPN が発現上昇していることを見出した (未発表データ)。

最近、ヒトの乳がん及び膵臓がんでは OPN のスプライシングバリエントの OPNc ががん組織特異的に発現していることが報告されている (Mirza, M., et al., Int. J. Cancer, 2008; Sullivan, J., Surgery, 2009)。また、スプライシングによる分子量の違いとは別に、翻訳開始点の違いにより N 末が欠けて分泌型から細胞内型となっている OPN のアイソフォームがあることも報告されている (Shinohara, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2008)。さらに、OPN は MMP3、MMP7、MMP9 等の基質となって、短い断片を生じることがわかってきており、それらががんの悪性化に寄与していることが示唆されている (Agnihotri, R., et al., J. Biol. Chem., 2001; Takafuji, V., et al., Oncogene, 2007)。しかしながら、大腸や膵臓の動物発がんモデルにおける OPN の発現に関する報告はこれまでになく、その発がん初期過程における重要性は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

オステオポンチン (OPN) は、多様ながんで発現が上昇しており、がんの悪性化に関与していると考えられているが、発がんの初期過程における重要性は未だ明らかではない。また、最近、ヒトの乳がんや膵臓がんではがん組織特異的にスプライシングバリエントの OPNc が発現していることが報告されたが、その発現メカニズムやがん特異的な機能は未だよく解っていない。本研究では、大腸及び膵臓発がん過程における OPN 及びそのスプライスバリエントの発現を動物モデルを用いて調べ、その役割について検討する。また、発がん初

期過程における OPN の重要性を OPN 欠損マウスを用いた大腸および膵臓発がん実験により検証する。さらに、がん細胞における OPN およびそのスプライスバリエントの発現制御およびその下流のシグナルについて、培養細胞を用いて解析を行い、OPN およびそのスプライスバリエントが発がん予防のターゲットとして有用であるかどうかについて検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸及び膵臓の化学発がんモデルにおける OPN 及びスプライスバリエントの発現に関する解析

大腸及び膵臓発がんにおける OPNa 及び OPNb、OPNc の発現をラットやマウスにおける AOM 誘発大腸発がん実験、ハムスターの BOP 誘発膵臓発がんモデルと遺伝子改変マウス膵臓発がんモデルを用いて解析した。標的臓器の正常組織および腫瘍における OPN およびスプライシングバリエント、MMPs 等の遺伝子及び蛋白質の発現について RT-PCR、ウェスタンブロットにより調べた。また、免疫組織染色により、がん組織における OPN 発現細胞やその細胞内局在について調べるとともに、前がん病変での発現について調べた。

### (2) 大腸発がんにおける OPN 欠損の影響の解析

OPN 欠損マウスにおける AOM 誘発マウス大腸発がん実験を行った。OPN (+/+), OPN (+/-), OPN (-/-) の各遺伝子型のマウスに大腸発がん物質である AOM を 10 mg/kg 体重の用量で 8 週齢時より週 1 回、6 週間腹腔内投与し、30 週齢時に解剖して大腸の前がん病変及び腫瘍の発生状況について解析し、OPN 欠損が大腸発がん過程に及ぼす影響を調べた。

### (3) 膵臓発がんにおける OPN 欠損の影響の解析

膵臓特異的 K-ras トランスジェニックマウス K-ras (+/G12D) ptf1a (+/Cre) に OPN 欠損マウスを交配し、OPN 欠損の膵臓発がんへの影響を調べた。K-ras (+/G12D) ptf1a (+/Cre) OPN (-/-) マウス及び K-ras (+/G12D) ptf1a (+/Cre) OPN (+/-) マウスにおける膵臓の前がん病変及び膵臓がんの発生を K-ras (+/G12D) ptf1a (+/Cre) OPN (+/+) マウスと比較した。

### (4) がん組織を用いた、膵臓発がん過程における OPN の下流因子の解析

上記動物実験の 25 週齢時のマウス膵臓組織における遺伝子発現の違いを cDNA アレイ解析によって調べ、さらに半定量的 RT-PCR 解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸及び膵臓の発がん過程における OPN

及びスプライズバリエーションの発現

①. ラット及びマウスにおける AOM 誘発大腸発がん実験において得られた大腸の正常粘膜および腫瘍における OPN およびスプライズバリエーションの遺伝子発現を解析した結果、ラットでは非がん部粘膜でも OPNa の発現は認められ、がん組織では顕著な発現上昇 (50 倍以上) が見られた。一方、OPNb はがん組織でのみ発現が認められ、OPNc の発現は認められなかった。マウスモデルでは非がん部粘膜では OPNa, b, c の発現はいずれも認められず、がん組織で OPNa の発現のみ認められた。

② 膵臓組織における OPN 遺伝子発現を解析した結果、BOP 非投与ハムスターの正常膵臓でも、OPNa の発現は認められるが、BOP 投与群の非がん部膵臓組織ではその発現が上昇し、がん組織では顕著な発現上昇が見られた。一方、OPN b 及び OPNc は、OPNa に比べると非常に発現レベルは低いものの、がん組織でのみ発現が認められた。マウスモデルでは、正常コントロールマウスの膵臓に比べ、膵臓に病変のある K-ras 変異体発現マウスで OPNa の顕著な上昇が見られ、さらにはがん組織で発現が上昇した。OPN b 及び OPNc の発現は K-ras 変異体発現マウスのみで見られ、やはり OPNa に比べると非常に低いものの、OPNb では主にがん組織で、OPNc は非がん部およびがん組織で検出された。また、OPNc の発現は K-ras 変異体発現マウスでのみ認められた。

免疫染色による OPN 蛋白質発現解析の結果、正常膵臓でも腺房細胞全体に低レベルの発現が見られ、ハムスターでは腺房細胞やランゲルハンス島でやや高い発現が見られた。がん組織では、がん細胞および間質の線維芽細胞で発現しており、マクロファージで強い発現が認められた。マウスの正常膵臓では腺房細胞での弱い発現に加え、腺房中心細胞や介在部、小葉内導管で強い発現が認められた。K-ras 変異体発現マウスでは、腺房細胞が導管に化生を起こす時に発現が高まり、前がん病変の PanIN-1 や 2 ではいったん発現が低下した。そして異型度が増して PanIN3 になると再度発現が上昇する様子が観察された。

(2) OPN 欠損が大腸発がん過程に及ぼす影響を AOM 誘発マウス大腸発がんモデルにおいて調べた結果、前がん病変の ACF の生成数は雄 OPN (+/+) 41.5 ± 18.1, OPN (+/-) 34.2 ± 16.1, OPN (-/-) 33.7 ± 14.0, 雌 OPN (+/+) 45.8 ± 19.3, OPN (+/-) 46.9 ± 7.6, OPN (-/-) 47.1 ± 12.9 個で、有意差はみられなかった。また、大腸腫瘍の発生率は、雄 OPN (+/+) 4/12, OPN (+/-) 4/19, OPN (-/-) 3/10, 雌 OPN (+/+) 3/12, OPN (+/-) 0/14, OPN (-/-) 2/15 であり、発生個数も OPN (+/+) に比べ OPN (+/-), OPN (-/-) でやや低かったが、有意

差は認められなかった。

(3) 膵臓特異的 K-ras トランスジェニックマウスに OPN 欠損マウスを交配し、OPN 欠損の膵臓病変発生への影響を調べた結果、25 週齢時において、Intraductal papillary mucinous adenoma の発生率は、OPN (+/+) 94%, OPN (+/-) 92%, OPN (-/-) 83% で有意差は見られなかったが、発生個数は OPN (+/+) に比べ OPN (+/-) で約半分、(-/-) で 5 分の 1 であり、OPN 欠損により有意に減少した。直径 1 mm 以上の adenocarcinoma の発生率は OPN (+/+) で 28% であったのに対し、OPN (+/-) では 6%、OPN (-/-) では 0% であり、顕著に低下した。直径 1 mm 未満のものも含めた adenocarcinoma の発生率及び発生個数も OPN 欠損で有意に減少した。

(4) 上記動物実験の 25 週齢時のマウス膵臓組織における遺伝子発現の違いを調べた結果、OPN の発現は K-ras (+/G12D) ptf1a (+/Cre) OPN (+/-) では 3 分の 1 程度に減少し、K-ras (+/G12D) ptf1a (+/Cre) OPN (-/-) では発現が認められないことを確認した。これに伴い、浸潤等に関わる MMP7, MMP2, MMP13, 接着等に関わる Gjal (Cx43)、増殖や抗アポトーシスに関わる COX-2, Bcl-2, cyclinD1 の発現の低下が認められた。また、マクロファージ抗原やケモカインの CCL2 (MCP1)、EMT 誘導に関わる TGF β 1 や Snail の発現も低下率はあまり高くはなかったもののホモ欠損で有意に低下していた。一方、MMP9, CD44v1, IL-12, IL-10 等は OPN との関連が示唆されている遺伝子であるが、発現レベルに有意差は見られなかった。

以上より、膵臓発がん過程において OPN は前がん病変の発生には必須ではないが、がんへの進展、浸潤等に関与しており、OPN の発現抑制によりがんの進展が抑制されることが示唆された。

## 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 3 件)

① Ito, K., Ishigamori, R., Mutoh, M., Ohta, T., Imai, T., Takahashi, M. *A<sup>β</sup> allele promotes azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis via macrophage migration in hyperlipidemic/diabetic KK mice.* Cancer Sci., 2013, in press. 査読有。DOI: 10.1111/cas.12162

② Takahashi, M., Mutoh, M., Ishigamori, R., Fujii, G., Imai, T. *Involvement of inflammatory factors in pancreatic*

carcinogenesis and preventive effects of anti-inflammatory agents. *Seminars in Immunopathology*, vol.35, 2013, 203-227. 査読有。DOI: 10.1007/s00281-012-0340-x

③ Takahashi, M., Hori, M., Mutoh, M., Wakabayashi, K., Nakagama, H. Experimental animal models of pancreatic carcinogenesis for prevention studies and their relevance to human disease. *Cancers*, vol.3, 2011, 582-602. 査読有。DOI:10.3390/cancers3010582

〔学会発表〕(計4件)

① 高橋真美、石ヶ守里加子、小宮雅美、武藤倫弘、今井俊夫。膵臓特異的 K-ras 変異体発現マウスと肥満モデル *A<sup>y</sup>* マウスとの交配による膵臓発がん促進。第 71 回日本癌学会、札幌市教育文化会館(札幌)、J-2019(口演)。2012 年 9 月 20 日。

② 高橋真美、石ヶ守里加子、中西るり、武藤倫弘、今井俊夫。膵臓特異的 K-ras 変異体発現マウスの膵臓発がんにおけるオステオポンチンの作用。第 19 回日本がん予防学会、じゅうろくプラザ(岐阜)、P-19(示説)。2012 年 6 月 22 日。

③ 高橋真美、石ヶ守里加子、堀美香、高須伸二、今井俊夫、武藤倫弘、若林敬二。膵臓特異的 K-ras 変異体発現マウスの膵臓発がんにおけるオステオポンチンの発現上昇。第 70 回日本癌学会、名古屋国際会議場(名古屋)、P-1213(示説)。2011 年 10 月 3 日。

④ 高橋真美、石ヶ守里加子、堀美香、小宮雅美、武藤倫弘、杉村隆、若林敬二。ハムスター膵管発がんにおけるオステオポンチンとそのスプライシングバリエントの発現上昇。第 69 回日本癌学会、大阪国際会議場(大阪)、O-159(口演)。2010 年 9 月 22 日。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 真美 (TAKAHASHI MAMI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90214973