

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293284

研究課題名(和文) 遺伝子不安定性の異なるサブクラス分類に有用な新規マウス大腸癌疾患モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel mouse colon cancer disease model with different genome instability useful for subclass classification

研究代表者

檜井 孝夫 (Hinoi, Takao)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・臨床研究部室長

研究者番号：10444689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：私共が確立した2種類の遺伝子不安定性大腸浸潤癌モデル(大腸上皮細胞特異的コンディショナルApcノックアウトマウス)を応用して、Apc変異に別のドライバー遺伝子(Kras, TGF- $\beta$ 11R)を追加した複合的な遺伝子改変マウスモデルを作製した。Apc+Kras変異マウス腫瘍は中分化腺癌で分化度が低下しており、網羅的遺伝子解析によってGLUT1が上昇、RCAN2が抑制される標的遺伝子として同定した。Apc+TGF- $\beta$ 11R欠損マウスでは、GSDMCが上昇していた。これらのマウスからドライバー遺伝子のgenotype-phenotypeの相関や標的遺伝子など、治療に有用なバイオマーカーが同定できた。

研究成果の概要(英文)：We applied two types of genomic instability in advanced colon cancer mouse model (colonic epithelial cell specific conditional Apc-knockout mouse) that we established and added another carcinogen driver gene (Kras, TGF- $\beta$ 11R) mutation to Apc mutation to generate complex genetically modified mouse model. The tumor of Apc+Kras mutant mouse was moderately differentiated adenocarcinoma and by comprehensive gene analysis Glut1 and Rcan2 were identified as upregulated and downregulated target genes, respectively. In Apc + TGF- $\beta$ 11R deficient mice, the expression of GSDMC transcript and protein was elevated. From these mice models, biomarkers useful for treatment such as correlation of genotype-phenotype of oncogenic driver gene and target gene could be identified.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 マウスモデル バイオマーカー RAS TGFbetaR11

### 1. 研究開始当初の背景

切除不能進行再発大腸癌の予後と治療方針を決める因子として、癌の分化度や形態、浸潤・転移の有無が重要であるが、多様な患者背景と多段階発癌による複合的な遺伝子変異をもつ腫瘍側因子のため、大腸癌の生物学的動態を予測するバイオマーカーの同定は容易ではない。また弧発性大腸癌においても、FAP とリンチ症候群に代表される2種類の遺伝子不安定性(約85%を占める染色体不安定性型と約15%を占めるマイクロサテライト不安定性型)による発癌過程とそれに関する癌関連遺伝子が明らかにされてきているが、薬剤感受性や生物学的な悪性度などの臨床的な性格が大きく異なっていることが判明している

### 2. 研究の目的

本研究では、私共が確立した自然発生による左側大腸癌(CIN型)モデルや右側大腸癌(MSI型)モデルを応用して、これらのモデルでノックアウトされているApcに加え、Kras, p53, TGFβIIIR, Ptenなどの別の発癌ドライバー遺伝子を追加したノックアウトした複合的遺伝子改変マウスを作製する。同時に、新規大腸上皮特異的Cre発現誘導マウス(CDX2P-Cre-ER)を作製し、左側大腸型でホモのダブルノックアウトマウスを作製する。これらのマウスにおいて病態の経過観察後、腫瘍細胞(原発巣、転移巣)を回収する。腫瘍の部位別、遺伝子変異のタイプ別に腫瘍細胞の網羅的遺伝子発現(転写因子)解析やプロテオーム解析を行い、バイオマーカー候補遺伝子を絞り込む。これらを培養細胞株、マウス異種移植モデルでの検証を経たのち、候補遺伝子を絞り込み、ヒトの大腸癌での多施設臨床研究(後向き研究)で有用性を検証する。

### 3. 研究の方法

私共がこれまでに独自に作製した2種類の遺伝子不安定性(染色体不安定性、マイクロサテライト不安定性)発癌形式による大腸浸潤癌マウスモデル(大腸上皮特異的Apcノックアウトマウス)に別の発癌ドライバー遺伝子(Kras, p53, PTEN, TGFβIIIRなど)を追加した複合的な遺伝子改変マウスモデルを作製する。これらのモデルにおいて、異なる遺伝子変異パターンに対応したがんの微小環境や浸潤・転移様式を再現し、分子基盤のメカニズムの解明を行うことを目的とする。腫瘍細胞での遺伝子発現プロファイルを統合的に解析し、形態・分化度や浸潤・

転移に関するバイオマーカー候補遺伝子を絞り込む。これら候補遺伝子を培養細胞株や動物転移モデル実験系で再構築し検証するとともに、ヒトの検体を使った臨床研究によりバイオマーカーの実臨床での有用性を検討し、遺伝子変異・発現プロファイルの組み合わせによる大腸癌のサブクラス分類に有用な基礎的データを集積する。これらの発癌機序の異なるマウス大腸癌疾患モデルの構築により、大腸癌の個別化医療に必要な基盤的研究の確立をめざす。

### 4. 研究成果

(1) 複合的遺伝子改変Apc欠損+Kras変異マウスの作製: マイクロサテライト不安定性により大腸上皮特異的にCre蛋白質が発現誘導されるマウスであるCDX2P9.5-G22Creマウス(G22Creマウス)を使い、floxマウスには、Apc欠損にはApc floxedマウス(Apc<sup>flox/flox</sup>マウス)、変異型Krasの挿入には、LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウスを交配して、Apc欠損+変異型Kras(G22Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Kras<sup>G12D</sup>)を作製した。病理組織学的所見では、G22Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Kras<sup>WT</sup>マウスで高分化型腺癌、G22Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Kras<sup>G12D</sup>マウスで中分化型腺癌が発生し、変異型Krasにより分化度が低下した。Apc欠損+変異型Kras(G22Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Kras<sup>G12D</sup>)マウスとApc欠損+野生型Kras(G22Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Kras<sup>WT</sup>)マウスの2種類のマウスに発生した大腸腫瘍からtotal RNAを抽出し、Affymetrixのhigh-density oligonucleotide arrays(GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array)を用いて、転写産物の発現プロファイルの網羅的遺伝子解析を行った。

(2) 変異型Krasによって発現が上昇する候補分子の同定とその機能解析: 解析を行った約34,000個の転写産物のうち、6個の遺伝子で5倍以上の遺伝子発現亢進、19個の遺伝子で5倍以上の遺伝子発現低下が認められGlut1の転写産物の増加が確認され、ヒトの大腸早期癌でもKRAS変異とGLUT1蛋白質発現の間に有意な相関が認められた。網羅的遺伝子解析において、G22Cre;Apc<sup>flox/flox</sup>;Kras<sup>G12D</sup>マウスの腫瘍で5倍以上転写産物の発現が上昇していた11遺伝子のうち、定量的PCRによりAqp8, Ttr, Qpct、そしてSlc26a3の上昇が確認された。

(3) 変異型 Kras によって発現が抑制される候補分子の同定とその機能解析: 解析を行った約 34,000 個の転写産物のうち、定量的 RT-PCR でも発現量の低下が確認できたのは、*Ctps*, *Irx5*, *Bex1*, *Rcan2* の 4 つの遺伝子であり、*Rcan2* (regulator calcineurin 2) の解析を進めた。ヒト大腸癌の免疫組織学的染色では、RCAN2 は正常部や腺腫部では発現を認めないのに対して、大腸癌細胞特異的に強く発現し、その発現部位は腫瘍先進部に多い傾向が見られ RCAN2 が大腸癌細胞増殖に関与することが示唆された。RCAN2 の機能評価のため、SW837、RKO で RCAN2 過剰発現細胞株、Colo320 で shRNA 導入による RCAN2 発現抑制細胞株を作製し、カルシニューリン酵素活性、増殖能、遊走能に及ぼす影響を検討した。RCAN2 過剰発現株ではコントロール群と比べ、カルシニューリン酵素活性および細胞増殖能の低下を認めたが、遊走能の変化は認めなかった。一方、RCAN2 の発現抑制細胞株 (Colo320) ではコントロール群と比べ、カルシニューリン酵素活性および細胞増殖能の有意な上昇を認めたが、遊走能の変化は認めなかった。さらに、RCAN2 発現抑制細胞株 (Colo320) を用い、ヌードマウスへの皮下移植モデルでの腫瘍形成能を評価し、RCAN2 発現抑制により腫瘍形成能が亢進することが確認された。このことから RCAN2 はがん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。さらに、RCAN2 のがん細胞増殖抑制能が Calcineurin-NFAT 経路に依存していることを確認するため、RCAN2 発現抑制細胞株 (Colo320) に、カルシニューリン阻害剤(シクロスポリン、タクロリムス)を投与した際の、細胞増殖能に及ぼす影響を評価した。RCAN2 発現抑制群ではコントロール群に比べ増殖能が亢進していたが、カルシニューリン阻害剤投与により両群間の細胞増殖能の差は消失し、このことから RCAN2 のがん抑制機能は、Calcineurin-NFAT 経路依存性であることが確認された。

(4) 大腸上皮特異的に *Apc* と *Tgfr2* をノックアウトした近位大腸癌マウスモデル (*CDX2P-G19Cre;Apc<sup>flx/flx</sup>;Tgfr2<sup>flx/flx</sup>*) を作製した。網羅的遺伝子解析 (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array) にて、*Gsdmc* が *Tgfr2* 変異に伴い発現亢進していた。*GSDMC* はヒト大腸正常粘膜で発現していないのに対して大腸癌で発現しており、細胞増殖を亢進している癌関連遺伝子

であることが示唆された。*GSDMC* は、*TGFR2* 変異大腸癌において治療ターゲットになりえる可能性が示唆された。

#### 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6件)

1) Miguchi M, Hinoi T, Shimomura M, Adachi T, Saito Y, Niitsu H, Kochi M, Sada H, Sotomaru Y, Ikenoue T, Shigeyasu K, Tanakaya K, Kitadai Y, Sentani K, Que N, Yasui W, Ohdan H. Gasdermin C Is Upregulated by Inactivation of Transforming Growth Factor Receptor Type II in the Presence of Mutated Apc, Promoting Colorectal Cancer Proliferation. PLoS One. 2016 Nov 11;11(11):e0166422. (査読有) doi:10.1371/journal.pone.0166422.

2) Niitsu H, Hinoi T, Kawaguchi Y, Sentani K, Yuge R, Kitadai Y, Sotomaru Y, Adachi T, Saito Y, Miguchi M, Kochi M, Sada H, Shimomura M, Que N, Yasui W, Ohdan H. KRAS mutation leads to decreased expression of regulator of calcineurin 2, resulting in tumor proliferation in colorectal cancer. Oncogenesis. 2016 Aug 15;5(8):e253. (査読有) doi:10.1038/oncsis.2016.47.

3) Niitsu H, Hinoi T, Sentani K, Mukai S, Adachi T, Saito Y, Miguchi M, Kochi M, Sada H, Que N, Yasui W, Ohdan H. Increased Calcineurin A Expression Is Associated with a Lower Relapse-Free Survival Rate after Colorectal Cancer Surgery. Pathobiology. 2016;83(6):308-15. (査読有) doi:10.1159/000445121.

4) Koh I, Hinoi T, Sentani K, Hirata E, Nosaka S, Niitsu H, Miguchi M, Adachi T, Yasui W, Ohdan H, Kudo Y. Regulation of multidrug resistance 1 expression by CDX2 in ovarian mucinous adenocarcinoma. Cancer Med. 2016 Jul;5(7):1546-55. (査読有) doi:10.1002/cam4.697.

5) Kawaguchi Y, Hinoi T, Saito Y, Adachi T, Miguchi M, Niitsu H, Sasada T, Shimomura M, Egi H, Oka S, Tanaka S, Chayama K, Sentani K, Que N, Yasui W, Ohdan H. Mouse model of proximal colon-specific tumorigenesis driven by microsatellite instability-induced Cre-mediated inactivation of Apc and activation of Kras. J Gastroenterol. 2016 May;51(5):447-57. (査読有) doi:10.1007/s00535-015-1121-9.

6) Sasada T, Hinoi T, Saito Y, Adachi T, Takakura Y, Kawaguchi Y, Sotomaru Y, Sentani K, Que N, Yasui W, Ohdan H. Chlorinated Water Modulates the Development of Colorectal Tumors with Chromosomal Instability and Gut Microbiota in Apc-Deficient Mice. PLoS One. 2015 Jul 17;10(7):e0132435. (査読有) doi:10.1371/journal.pone.0132435.

〔学会発表〕(計3件)

1) Saito Y, Hinoi T, Adach T, Shimomura M, Miguchi M, Niitsu H, Kochi M, Ohdan H. Impact of synbiotics administration on tumorigenesis of colon cancer mouse model. American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2015.4.18-20, Philadelphia, U.S.A.

2) Niitsu H, Hinoi T, Kawaguchi Y, Sentani K, Ooue N, Sotomaru Y, Adachi T, Saito Y, Miguchi M, Kochi M, Shimomura M, Yasui W, Ohdan H. Gene expression profiling for oncogenic Kras mutation in mice and human colorectal cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2015.4.18-20, Philadelphia, U.S.A.

3) Miguchi M, Hinoi T, Shimomura M, Adach T, Saito Y, Niitsu H, Kochi M, Sotomaru Y, Ijichi H, Ikenoue T, Shigeyasu K, Tanakaya K, Sentani K, Que N, Yasui W, Ohdan H. The generation of colorectal cancer mouse model based on microsatellite instability and the identification of transforming growth factor-beta signal target. American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2015.4.18-20, Philadelphia, U.S.A.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

檜井孝夫 (HINOI, Takao)  
独立行政法人国立病院機構  
(呉医療センター臨床研究部)  
・その他部局等・臨床研究部室長  
研究者番号：10444689

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

外丸 祐介 (SOTOMARU, Yusuke)  
広島大学・自然科学研究支援開発センター  
・教授  
研究者番号：90309352

池上 恒雄 (IKENOUE, Tsuneo)  
東京大学医科学研究所・准教授  
研究者番号：80396712

大上直秀 (OUE, Naohide)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授  
研究者番号：60346484

朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi)  
独立行政法人医薬基盤研究所・プロジェクトリーダー  
研究者番号：80227644

大段秀樹 (OHDAN, Hideki)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：10363061

### (4) 研究協力者

安達智洋 (ADACHI, Tomohiro)  
斉藤保文 (SAITO, Yasufumi)  
三口真司 (MIGUCHI Masashi)  
新津宏明 (NIITSU, Hiroaki)