

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：85408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19892

研究課題名(和文) マイクロサテライト不安定性大腸癌に対する新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of target therapy for microsatellite instability colorectal cancer

研究代表者

下村 学 (Shimomura, Manabu)

独立行政法人国立病院機構東広島医療センター(臨床研究部)・診療部・外科医師

研究者番号：60457249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はApcとTgfbr2が大腸上皮特異的にノックアウトされる‘CDX2P-G19Cre; Apcflox/flox;Tgfbr2flox/flox mouse’を作製した。これらマウスの腫瘍からTgfbr2 ノックアウトに伴い19.25倍に発現亢進していた遺伝子GSDMCを同定した。さらにGSDMCの大腸癌における発現の意義を解析するために、in vitro/in vivoで機能解析を行った。In vitro / in vivoで大腸癌細胞株を用いてGSDMCをノックダウンすると細胞増殖能、腫瘍形成能は有意に低下し、逆にin vitro でGSDMCを強制発現すると細胞増殖能は有意に上昇した。

研究成果の概要(英文)：Mutations in TGFBR2 occur in high-frequency microsatellite instability (MSI-H) colorectal cancer (CRC). We generated CDX2P-19Cre;Apcflox/flox;Tgfbr2flox/flox mice, with simultaneous loss of Apc and Tgfbr2. These mice developed tumors, including adenocarcinoma in the proximal colon. We compared gene expression profiles between tumors of the two types of mice using microarray analysis. Our results showed that the expression of the murine homolog of GSDMC was significantly upregulated by 9.25-fold in tumors of DX2PG19Cre;Apcflox/flox;Tgfbr2flox/flox mice compared with those of CDX2P-G19Cre;Apcflox/flox mice. We then investigated the role of GSDMC in regulating CRC tumorigenesis. The silencing of GSDMC led to a significant reduction in the proliferation and tumorigenesis of CRC cell lines, whereas the overexpression of GSDMC enhanced cell proliferation. These results suggested that GSDMC functioned as an oncogene, promoting cell proliferation in colorectal carcinogenesis.

研究分野：surgery

キーワード：colorectal cancer microsatellite

1. 研究開始当初の背景

大腸癌においては、APC, RAS, P53などの遺伝子に順次変異が起こり、腺腫を経て癌化するという Adenoma-Carcinoma sequence という理論が知られている。さらに、変異する遺伝子の種類により、染色体不安定性経路とマイクロサテライト不安定性経路の2つに大別される。Transforming growth factor(TGF)-βシグナルは細胞周期、分化、アポトーシスなどを調整する癌抑制性シグナルで、その構成分子の一つである TGF-β receptor II (TGFBR2)は、マイクロサテライト不安定性経路で癌化する大腸癌(MSI-H 大腸癌)の約70-90%で変異を認め、その変異により TGF-βの癌抑制性シグナルが不活化され腺腫から癌への進展が促進される。今までに Wnt-β-catenin 経路の異常活性化に加えて *Tgfr2* をノックアウトした大腸癌マウスモデルが報告され、*Tgfr2* 変異による癌化の促進を示すフェノタイプの変化が確認されているが、小腸優位に腫瘍発生するモデルであった。また、*in vivo*で TGFBR2 変異に伴い変化する遺伝子プロファイルを解析しようとした研究はない。

2. 研究の目的

我々は、*CDX2*のプロモーター領域を利用して大腸上非特異的に *Apc* をノックアウトし近位大腸に高分化腺癌を発生させる大腸癌マウスモデルを報告してきた。そのモデルを応用し、大腸上皮特異的に *Apc* と *Tgfr2* の2つの遺伝子をダブルノックアウトし、大腸に腫瘍を発生させるマウスモデルを作製し、*Tgfr2* の不活化により変化している遺伝子プロファイルを網羅的に解析し、バイオマーカーや治療ターゲットになりうる新たな大腸癌関連遺伝子を検索する。

3. 研究の方法

我々は大腸上皮特異的に *Apc* がノックアウトされる大腸癌マウスモデル '*CDX2P-G19Cre;Apc<sup>flx/flx</sup>* mouse' を応用し、*Apc* と *Tgfr2* が大腸上皮特異的にノックア

ウトされる

'*CDX2P-G19Cre;Apc<sup>flx/flx</sup>;Tgfr2<sup>flx/flx</sup>* mouse' を作製した。これら2つのマウスモデルでは近位大腸に高分化腺癌成分を含む多数の腫瘍が発生した。その腫瘍からレーザーマイクロダイセクション法で回収した癌組織の total RNA を用い、*CDX2P-G19Cre;Apc<sup>flx/flx</sup>* mouse の腫瘍 (n=3) と *CDX2P-G19Cre;Apc<sup>flx/flx</sup>;Tgfr2<sup>flx/flx</sup>* mouse の腫瘍 (n=3) の遺伝子発現プロファイルを網羅的にマイクロアレイで比較した。

4. 研究成果

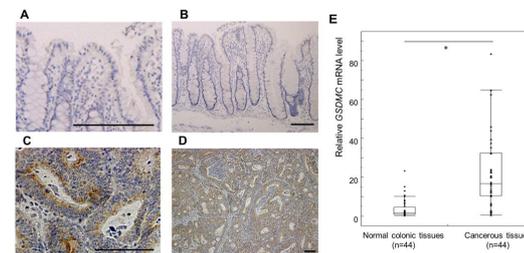
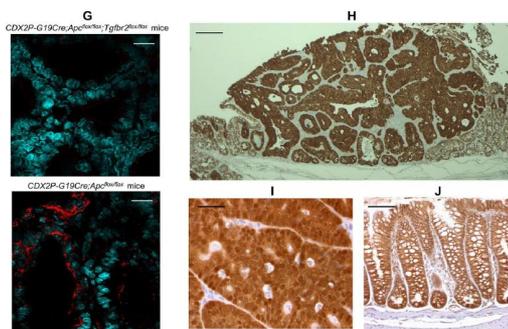
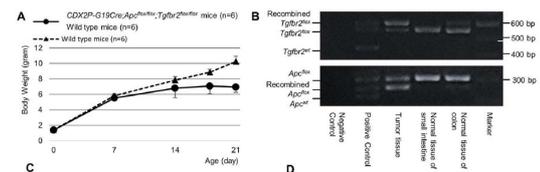
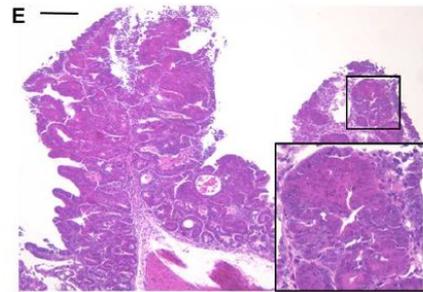
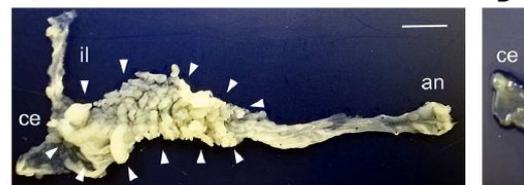
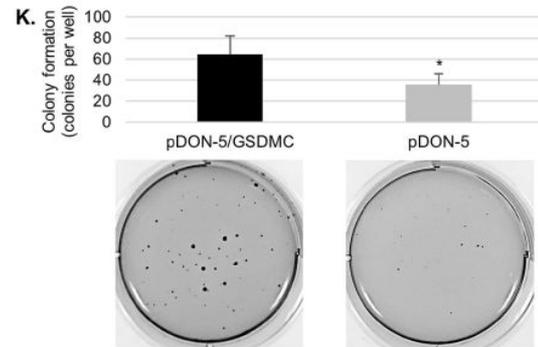
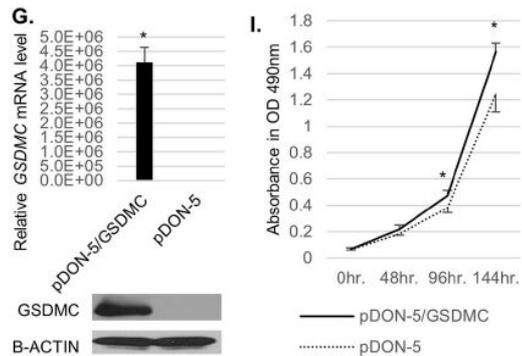
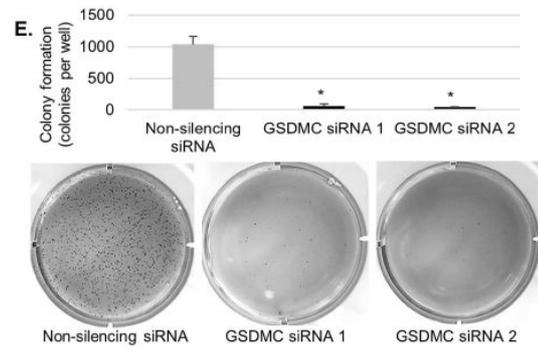
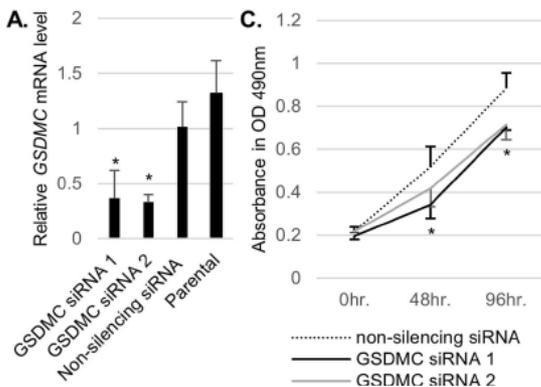
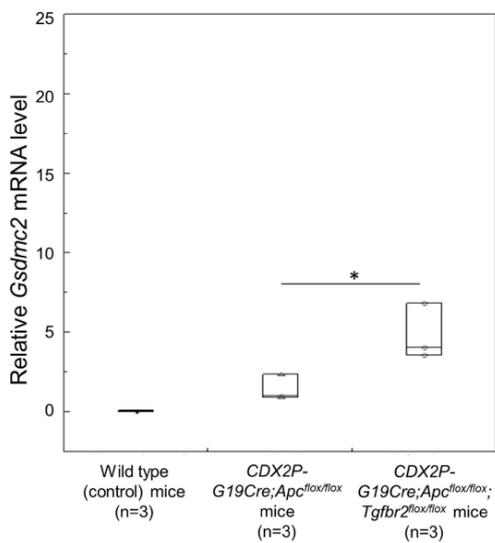
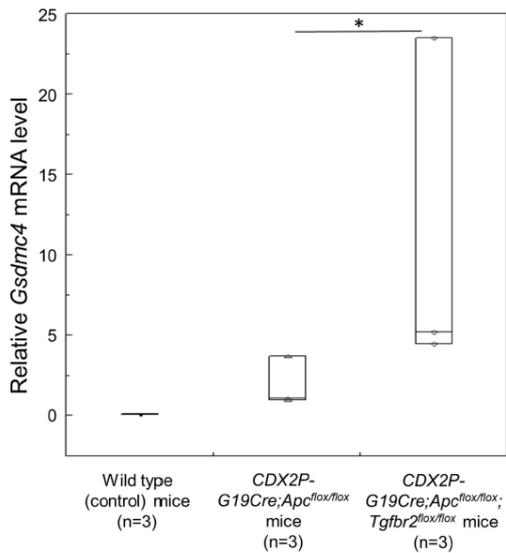


Fig 3. GSDMC immunohistochemical staining of normal colonic tissues (A, B) and CRC specimens (C, D). (A), (C) High-magnification image; (B), (D) Low-magnification image. GSDMC was not expressed in normal colonic tissues, whereas GSDMC was diffusely distributed in the cytoplasm of cancer cells. Scale bar 100 μm (E) The expression of GSDMC mRNA was significantly increased in cancer tissues compared with that in normal tissues. Data are shown as box plots. The horizontal lines represent the median score, the bottom and top of the boxes represent the 25th and 75th percentiles, respectively, and the whiskers represent the range of expression level.



*Tgfr2* ノックアウトに伴い 9.25 倍に発現亢進していた遺伝子 *GSDMC* を同定した ( $p=0.045$ )。さらに *GSDMC* の大腸癌における発現の意義を解析するために、*in vitro/in vivo* で機能解析を行った。*In vitro/in vivo* で大腸癌細胞株を用いて *GSDMC* をノックダウンすると細胞増殖能、腫瘍形成能は有意に低下し、逆に *in vitro* で *GSDMC* を強制発現すると細胞増殖能は有意に上昇した。以上の結果から *GSDMC* が *TGFBR2* 変異に伴い発現亢進し、大腸癌において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。

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 1 件)

PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0166422

November 11, 2016, Gasdermin C Is

Upregulated by Inactivation of

Transforming Growth Factor Receptor

Type II in the Presence of Mutated *Apc*,

Promoting Colorectal Cancer Proliferation

Masashi Miguchi, Takao Hinoi, Manabu

Shimomura<sup>1</sup>, Tomohiro Adachi, Yasufumi

Saito, Hiroaki Niitsu, Masatoshi Kochi,

Haruki Sada, Yusuke Sotomaru, Tsuneo

Ikenoue, Kunitoshi Shigeyasu, Kohji

Tanakaya, Yasuhiko Kitadai, Kazuhiro

Sentani, Naohide Oue, Wataru Yasui, Hideki

Ohdan

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 0 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

下村 学 (Shimomura

Manabu )

国立病院機構 東広島医療センター

外科 医師

研究者番号: 60457249

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )