

令和元年6月19日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07111

研究課題名(和文)新規胃がんモデルの開発による悪性化進展機構の研究

研究課題名(英文) Establishment of novel gastric cancer mouse models

研究代表者

大島 浩子(Oshima, Hiroko)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：80362515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胃がんの悪性化機構を個体レベルで明らかにすることを目的とし、新規マウスモデルの開発と解析を推進した。胃炎を伴う胃粘膜上皮特異的に発現するClaudin2と、正常胃粘膜上皮で持続的に発現するClaudin18遺伝子のプロモーター領域でCreERを発現するマウスの樹立に成功した。これらのマウスを、胃がん発症マウスと胃がん悪性化への関与が指摘されるTgfbr2およびTrp53遺伝子変異マウスとの交配を行ない、胃病変の病理解析の結果、TGF-betaシグナル遮断や変異型p53発現はどちらも悪性化を誘導せず、胃がん悪性化にはさらに遺伝子変異の蓄積が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃がんは、日本人で罹患率の高いがんであるため、胃がんの悪性化を模倣するマウスモデルの開発は、胃がんの死亡率の克服のために重要な課題である。今回の研究で、新規悪性化胃がんモデルマウスの開発には至らなかったが、大腸がんと異なり、TGF-beta遮断や変異型p53発現だけでは悪性化に至らないことを個体レベルで証明した。現在、胃がん悪性化に関与が示唆される遺伝子である、K-rasの変異を導入するマウスとの交配を行っている。また、炎症反応特異的に発現するCldn2遺伝子プロモーターを使ったCre発現マウスによって、炎症反応特異的にがん関連遺伝子を発現させることにより、悪性化マウスモデル開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to establish a new mouse model for gastric cancer with metastasis using Gan mice together with conditional gene knockout mice. First we constructed CreER expressing mice in the gastric mucosa using Claudin2 and Claudin18 promoter. Claudin2 expresses in the inflamed gastric epithelial cells and Claudin18 expresses in the normal gastric epithelia. Then, we crossed Gan mice that develop gastric tumors and Tgfbr2 conditional KO mice or p53 conditional KO mice together with Cldn18-CreERT2 mice. And these mice were treated with Tamoxifen. However, disruption of Tgfbr2 gene and additional p53 gene mutation did not cause any morphological changes or invasion phenotype of gastric tumors of Gan mice. These results indicate that TGF beta signaling and p53 mutation are not sufficient for gastric tumor malignant progression.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：胃がん 悪性化 マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃がんは日本におけるがん罹患率の第1位であり、遠隔臓器への転移・再発をともなう悪性化進展した胃がん患者の5年生存率は10%以下と低い。したがって、悪性化進展胃がんの克服は、我が国における「がんの克服」に貢献する重要な課題である。胃がん発生はピロリ菌感染に起因した慢性炎症反応が発がん促進に関与していることが報告されている。一方で、ヒト胃癌を対象とした網羅的ゲノム解析および発現解析結果が報告され (The Cancer Genome Atlas Network (TCGA), *Nature*, 2014) 遺伝子変異の状況等から新たな胃がん分類が提唱されたが、未だ胃がんの悪性化進展を誘導する分子機構は解明されていない。胃がん悪性化進展の研究が進んでいない理由のひとつに、悪性化進展過程を再現する胃がんマウスモデルが開発されていないことがあげられる。がんの発生や悪性化過程は、腫瘍細胞における遺伝子変異の蓄積だけでなく、生体応答による微小環境の形成が重要であり、それらの複雑な相互作用による発がん機構を解明するためには、個体レベルでの研究が重要である。

申請者は、これまでに Wnt シグナル活性化と COX-2/PGE₂ 経路依存的炎症反応の相互作用により胃に腫瘍を発生するマウスモデル (*Gan* マウス) を開発し (Oshima H, et al. *Gastroenterology*, 2006) 炎症反応依存性な胃がん発生機構の解析を行った。Wnt 活性化は約50%以上の胃がんで認められ、COX-2/PGE₂ 経路はほとんどの胃がんで誘導されることから、*Gan* マウスはヒト胃がん発生を再現するモデルと位置づけられる。これまでの *Gan* マウスを用いた研究により、腫瘍間質の炎症性微小環境の形成には、感染刺激による自然免疫活性化が重要な役割を果たすこと (Oshima H, et al. *Gastroenterology*, 2011) およびマクロファージが産生する TNF- α が、NOX1 複合体を活性化することで活性酸素を産生し、腫瘍細胞の未分化性維持に作用することを明らかにした (Oshima H, et al. *Oncogene*, 2014)。さらに、最近の研究により、がん抑制遺伝子の TGF- β II 型受容体遺伝子 (*Tgfbr2*) を欠損した大腸粘膜で炎症反応を誘導させると、浸潤性大腸がんが発生することを明らかにした (Oshima H, et al. *Cancer Res*, 2015)。以上の結果から、炎症反応により形成される微小環境は、がんの発生過程だけでなく浸潤・転移に至る悪性化進展過程の促進にも作用する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

胃がんの罹患率は高く、遠隔転移をともなう悪性化進展した胃がん患者の生存率は低い。したがって、胃がんの悪性化進展機構の解明は、将来の新規予防・治療戦略への大きく貢献が期待される。申請者は、これまでにヒトの胃がん発生を再現するマウスモデル (*Gan* マウス) を開発し、腫瘍発生における炎症性微小環境の役割を研究してきた。本研究課題では、これまでの学術的背景、および *Gan* マウスを用いた研究により申請者が明らかにした知見を基盤とし、*Gan* マウスをベースにして胃がん悪性化進展過程を再現するマウスモデルを新規に開発し、それを用いた解析により遺伝子変異の蓄積による「腫瘍細胞の形質変化」と「腫瘍間質の微小環境の変容」機構を明らかにし、その相互作用による胃がん悪性化進展機構を解明する目的とする。本研究課題から胃がん悪性化進展機構が明らかにされれば、それを標的とした胃がん悪性化予防・治療戦略に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 新規胃粘膜上皮特異的 Cre マウス開発:

胃粘膜上皮細胞特異的に遺伝子変異をコンディショナルに導入するため、*Claudin2* 遺伝子 (*Cldn2*) プロモーター制御下に CreER を発現する *Cldn2-CreER* マウスを新規に作製する (*Cldn2-CreER(Tg)*)。 *Cldn2* はタイトジャンクションをコードする遺伝子で、正常組織では腸クリプトの上皮細胞で発現が見られるが、胃粘膜上皮では発現していない。しかし、*Gan* マウスの胃腫瘍細胞では炎症反応依存的に *Cldn2* の発現が顕著に上昇するため (図1) *Gan* マウスの腫瘍細胞特異的に遺伝子変異をコンディショナルに導入する目的に使う事ができる。腸上皮細胞で *Tgfbr2*、*Trp53* の各遺伝子を単独で変異導入しても形態変化を誘導しないことはすでに確認した。タモキシフェン投与依存的に Cre 活性を誘導できる、CreER の発現ユニットをマウス *Cldn2* 遺伝子プロモーター制御下に発現する発現ベクターを作製し、マウス受精卵前核にインジェクションする。また、バックアップとして *Cldn18* 遺伝子プロモーターを用いた *Cldn18-CreER* マウス作製のベクターも並行して作製する (*Cldn18-CreER(Tg)*)。 *Cldn18* は正常胃粘膜上皮全体で発現するため、腫瘍細胞特異的な発現ではなくなるが、*Cldn2-CreER* マウス系統の樹立が困難な場合、*Cldn18-CreER* を用いた実験を並行して遂行する。マウス樹立の過程で、DNA インジェクションによるトランスジェニックマウスは挿入した発現カセットの領域の影響などから、発現が安定しない可能性も考えられるため、CreER 遺伝子を内在性の *Cldn2* および *Cldn18* 遺伝子座に挿入したノックインマウスも作製する (*Cldn2-CreER(KI)*、*Cldn18-CreER(KI)*)。

(2) 新規悪性胃がん発生マウスを用いた経時的病理解析:

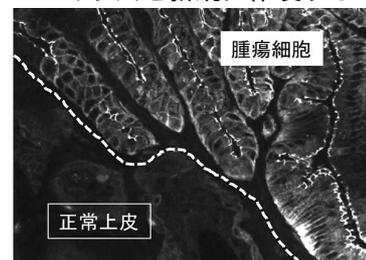


図1. *Gan* マウス胃腫瘍組織における Claudin2 の免疫染色。

作製した *Cldn2-CreER* マウスおよび *Cldn18-CreER* マウスを *Gan* マウスと交配して複合マウスを作製した。さらに、樹立した *Gan Cldn-CreER* マウス (G マウス) を、*LSL-Kras^{G12D}* マウス (K マウス)、*Tgfbr2^{fllox/fllox}* マウス (T マウス) および *LSL-Trp53^{R270H}* マウス (P マウス) とそれぞれ交配し、GK、GT、GP の複合マウスを作製し、タモキシフェン投与後の、腫瘍形成の変化を観察し、病理解析を行う。

(3) オルガノイド培養実験による悪性化進展過程の検証:

作製したマウス腫瘍細胞からオルガノイド培養を行い、腫瘍形成能についての検証を行う。

4. 研究成果

(1) 新規胃粘膜上皮特異的 Cre マウス開発:

生殖系列で導入遺伝子が伝達した4系統の *Cldn2-CreER(Tg)* トランスジェニックマウスの founder を樹立した(#14、15、30、32)。それぞれのマウスに胃炎発生モデルの K19-C2mE マウスを交配し、さらに CreER 活性化細胞を可視化するため、tdTomato (赤色蛍光) モニターマウスを交配した。作製した複合マウスにタモキシフェンを投与し、1日後に解剖を行い TdTomato 発現細胞を観察した。この結果、#15 トランスジェニック系統の Tg マウスの胃粘膜上皮細胞で、tdTomato 発現細胞を確認することができた(図2)。次に5系統の *Cldn18-CreER(Tg)* トランスジェニックマウスの founder を得た(#1、4、7、12、13)。これらのマウスに tdTomato (赤色蛍光) モニターマウスを交配し、複合マウスにタモキシフェンを投与して1日後に解剖し、tdTomato 発現細胞を観察した。この結果、#4 トランスジェニック系統の胃粘膜上皮で強い発現が確認され、#13 トランスジェニック系統で弱い発現が確認された。また、相同組み換え法を用いて CreER 遺伝子を内在性の *Cldn18* 遺伝子座に挿入したノックインマウスは、共同研究者より先行して導入した(*Cldn18-CreER(KI)*)。また、*Cldn2* 遺伝子のノックインマウスは、理化学研究所との共同研究で作製した(*Cldn2-CreER(KI)*)。ノックインマウスもトランスジェニックマウスと同様の交配実験で複合マウスを作成し、胃粘膜上皮細胞での発現が確認された(図3)。今後の安定的な CreER の発現を考えると、ノックインマウスを中心に胃がん悪性化マウス作製を進めた。

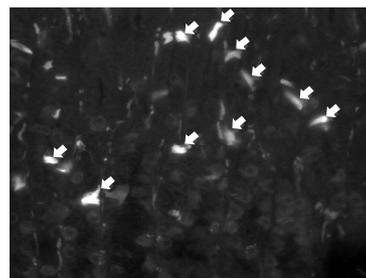


図2. C2mE *Cldn2-Cre* マウスの tdTomato 陽性細胞。

(2) 新規悪性胃がん発生マウスを用いた経時的病理解析:
先行して導入した *Cldn18-CreER(KI)* マウスと胃がん発症モデルマウス *Gan* マウス (G マウス) を交配した。このマウスに *LSL-Kras^{G12D}* マウス (K マウス)、*Tgfbr2^{fllox/fllox}* マウス (T マウス) および *LSL-Trp53^{R270H}* マウス (P マウス) とそれぞれ交配し、GK、GT、GP の複合マウスを作製した。最初に、GT マウスを用いてタモキシフェンの投与スケジュールを検討した。タモキシフェンの投与により、胃粘膜障害が誘導され、再生過程が引き起こされる (Huh W. J., et al. *Gastroenterology*, 2012) ため、腫瘍発生にタモキシフェン投与が影響する可能性が考えられた。そこで、*Gan* マウスで腫瘍が発生する30週令より前の10週令、また、腫瘍発生後の40週令、さらに腫瘍発生前から病理解剖前(10週令から40週令)まで、2週に一回連続投与の3グループに分けてタモキシフェンを投与した。この結果、連続投与では腫瘍形成が抑制される傾向が認められた。また、どのタモキシフェン投与方法でも、*Tgfbr2* 欠損による腫瘍の悪性化は認められなかった。同時に、変異型 p53 遺伝子を持つ GP マウスを作製したが、変異型 p53 遺伝子による胃がん腫瘍悪性化も認められなかった。

(3) オルガノイド培養実験による悪性化進展過程の検証:

GT および GP マウスで胃がん悪性化が認められなかったため、それぞれの腫瘍細胞からオルガノイドを作製し、*in vitro* 実験を実施した。当研究室の研究成果により、変異型 p53 は、腸管腫瘍形成において gain of function として働き、その際に野生型 p53 が欠損することでさらに悪性化が誘導されるという知見を得ている。そこで、作製したオルガノイドを 2D 培養にて細胞ストレスを与えることで、野生型 p53 を欠損した細胞を樹立した。今後、これらを用いて免疫不全マウスへ移植して、悪性化を再現できる系を構築する。

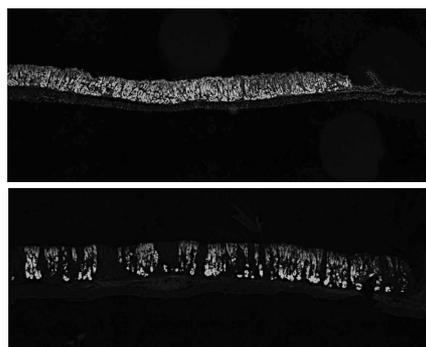


図3. *Cldn18-Cre(KI)* の tdTomato 陽性細胞(上)。*Cldn18-Cre(Tg)* の tdTomato 陽性細胞(下)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. Echizen K, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, Oshima M.

NF- κ B-induced NOX1 activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. *Oncogene*. in press.

2. Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong ZWE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, Oshima M. Interleukin 1 Up-regulates MicroRNA 135b to Promote Inflammation-Associated Gastric Carcinogenesis in Mice. *Gastroenterology*, 156: 1140-1155, 2019.
3. Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, Voon DC, Kimura T, Oshima M. Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis. *FASEB J.*, 33: 1873-1886, 2019.
4. Echizen K, Oshima H, Nakayama M, Oshima M. The inflammatory microenvironment that promotes gastrointestinal cancer development and invasion. *Adv Biol Regul*, 68: 39-45, 2018.
5. Ohtsuka J, Oshima H, Ezawa I, Abe R, Oshima M, Ohki R. Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. *Sci Rep*, 8: 2291, 2018.
6. Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Kouyama Y, Niida A, Fujii S, Ochiai A, Nakayama KI, Mimori K, Suzuki Y, Hong CP, Ock CY, Kim SJ, Oshima M. Combined Mutation of Apc, Kras, and Tgfr2 Effectively Drives Metastasis of Intestinal Cancer. *Cancer Res*, 78: 1334-1346, 2018.
7. Nakayama M, Sakai E, Echizen K, Yamada Y, Oshima H, Han TS, Ohki R, Fujii S, Ochiai A, Robine S, Voon DC, Tanaka T, Taketo MM, Oshima M. Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation. *Oncogene*, 36: 5885-5896, 2017.

〔学会発表〕(計6件)

1. 大島浩子. がん転移における遺伝的多様性の役割、第1回日本遺伝学会春季分科会. 2019年3月8日(三島)
2. Oshima H. Stat3 is requires for intestinal regeneration but not for Wnt-driven tumorigenesis. 37th Sapporo International Cancer Symposium(国際学会), 2018年7月18日(札幌)
3. Oshima H. Stat3 activation is indispensable for mucosal regeneration but not for Wnt-driven tumorigenesis. 9th General Assembly and International Conference of Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP)(国際学会), 2018年4月8日(韓国)
4. Oshima H, Sakai E, Nakayama M, Moshima M. Critical role of Stat3 in intestinal regeneration but not in Wnt-activated tumorigenesis. 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28日(横浜)
5. Oshima H, Nakayama M, Oshima M. Inflammatory microenvironment induces invasive colon cancer in the TGF- suppressed epithelia. The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience "Chronic Inflammation". (国際学会) 2017年01月20日(大阪)
6. Oshima H, Nakayama M, Oshima M. Chronic inflammation and Stat3 in intestinal tumorigenesis. 第75回日本癌学会学術総会(招待講演) 2016年10月06日~ 2016年10月08日(横浜)

〔図書〕(計5件)

1. 大島浩子、越前佳奈恵、中山瑞穂、大島正伸. 自然免疫・慢性炎症と胃癌, 日本臨床(日本臨床社) 76: 520-525, 2018.
2. 大島浩子、越前佳奈恵、中山瑞穂、大島正伸. 炎症性微小環境が促進する消化器がんの発

生と悪性化進展, リンパ学 (日本リンパ学会) 40: 43-47, 2017.

3. 大島浩子、大島正伸. NSAIDs と消化器がん発生, Bio Clinica (北隆館) 32: 1082-1086, 2017.
4. 大島浩子、大島正伸. 慢性炎症と発がん, 最新医学社 197: 2351-2356, 2016.
5. 大島浩子, 越前佳奈恵, 大島正伸. 遺伝子変異と微小環境の相互作用による発がん, 実験医学 (羊土社) 34: 2294-2299, 2016.

〔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 :
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 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者 1名

研究協力者氏名 : 伊田 幸

ローマ字氏名 : Ida Miyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。