

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17016032

研究課題名（和文） 上皮-間質相互作用の解析と分子標的治療

研究課題名（英文） Epithelial-stromal interactions and molecularly targeted therapy

研究代表者

武藤 誠 (TAKETO MAKOTO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70281714

研究成果の概要（和文）：がん組織にはがん細胞以外に、血管を構成する細胞や炎症細胞などの間質細胞と総称される細胞群が存在し、がんの成長や悪性化に関わっている。この研究では、がん細胞が周辺の組織を溶かすために放出する MMP7 と呼ばれるタンパクが、腸がんの成長を促進すること、mTORC1 という経路が腫瘍に酸素や栄養を与える血管を増やすこと、更に Wnt シグナルという経路が胃がんや肝がんの悪性化に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cancer tissues consist of cancer cells and stromal cells, including inflammatory cells and those forming blood vessels. We have shown that MMP7, an enzyme that cancer cells secrete to help degrade the surrounding tissues, enhances the growth of intestinal cancer. We have also found that activation of a signaling complex called mTORC1 enhances blood vessel formation to improve oxygen/nutrient supply to the tumor cells. In addition, our studies have revealed that a signaling pathway called the Wnt pathway plays essential roles in malignant progression of stomach and liver cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	14,300,000	0	14,300,000
2006 年度	14,800,000	0	14,800,000
2007 年度	14,800,000	0	14,800,000
2008 年度	17,300,000	0	17,300,000
2009 年度	17,300,000	0	17,300,000
総計	78,500,000	0	78,500,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌、炎症、血管新生、シグナル伝達、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

正常上皮細胞から癌が発生・進行する過程では、上皮細胞において癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の変異が蓄積する。培養癌細胞株を用いた研究により、これらの遺伝子変異が腫瘍細胞自身の増殖・接着・移動などを異常にする

ことが明らかにされていた。しかし、近年のモデルマウスを用いた個体レベルでの解析により、腫瘍組織内の間質が癌の発生・進行・転移などに重要な役割を果たしている事が明らかになってきた。従って、間質側から腫瘍細胞に作用する分子機序を解明するこ

とにより、新たな癌治療の分子標的を確立できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、当研究室で作出した遺伝子改変モデルマウスを用いて上皮細胞の腫瘍化・悪性化の過程での腫瘍上皮と間質の相互作用の分子機序を解明すること、そしてその知見を元に癌治療に有効な新たな標的分子を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Apc*^{Δ716} 変異マウス (以下、*Apc* 変異マウス) は腸管に良性の腺腫を発症する一方、*cis-Apc*^{Δ716}/*Smad4*^{-/-} マウス (以下、*Apc/Smad4* 複合変異マウス) は悪性の腺癌を発症し、顕著な間質増生を伴い、浸潤先端には多数の間質細胞が存在することが分かっていた。腸管腫瘍悪性化に伴い発現の増加する遺伝子を、cDNA マイクロアレイを用いて同定し、それら遺伝子のノックアウトマウスと *Apc/Smad4* 複合変異マウスとのトリプル複合変異マウスを作成し、腫瘍形成、浸潤能に対する影響を調べた。

(2) *Apc* 変異マウスの腸管腺腫における mTORC1 経路の活性化状態を免疫組織化学、ウェスタンブロット法を用いて調べ、mTORC1 阻害薬の RAD001 を投与することによりその腫瘍形成、細胞増殖、血管新生における役割を検討した。更に大腸癌細胞株を用いて、mTORC1 経路活性化機序について解析した。

(3) COX-2 および PGE2 変換酵素 mPGES-1 を同時に発現するトランスジェニックマウス (*K19-C2mE*) は、胃粘膜での PGE2 産生により著しいマクロファージ集簇が誘導され、更に細菌感染に伴ってマクロファージが活性化し、過形成性腫瘍が発生する。これら良性腫瘍の胃癌への悪性化モデルを確立するため、Wnt 経路を活性化するトランスジェニックマウス (*K19-Wnt-1*) を作出し *K19-C2mE* マウスと交配し、腫瘍形成への影響を調べた。

(4) *Lkb1*^{+/-} マウスは肝細胞癌 (HCC) を自然発生するが、正常肝細胞から前癌病変、HCC へと段階的に癌化が進展する。*Lkb1* 野生型対立遺伝子は前癌病変で既に消失しており、HCC への進行にはさらに別の変化が必要であると考えられたため、cDNA マイクロアレイ解析により、正常部と比較して HCC で発現の変化した遺伝子群を同定した。また、活性型 β -catenin を誘導的に発現するマウスとの複合変異マウスを作成し、Wnt シグナル活性化の悪性化への寄与について調べた。

4. 研究成果

(1) cDNA マイクロアレイを用いた解析により、*Apc/Smad4* 複合変異マウスの腺癌では *Apc* 変異マウスの腺腫と比べて matrix metalloproteinase 7 (Mmp7) をコードする遺伝子の mRNA レベルが上昇していることが分かった。タンパクレベルでも *Apc/Smad4* 複合変異マウスの腺癌における活性型 MMP7 の発現レベルは、*Apc* 変異マウスの腺腫の発現レベルよりより 27 倍高く、その発現は腫瘍上皮細胞に認められた。この MMP7 が腺癌の浸潤、間質増生に与える影響を調べるため、*Apc/Smad4* 複合変異マウスと MMP7 変異マウスとのトリプル複合変異マウスを作成した。その結果、MMP7 は *Apc/Smad4* 複合変異マウスにおける腺癌の形成 (ポリープの数・大きさ) に寄与しているが、形成された腫瘍における浸潤深達度、間質増生には必須ではないことが明らかとなった (図 1)。

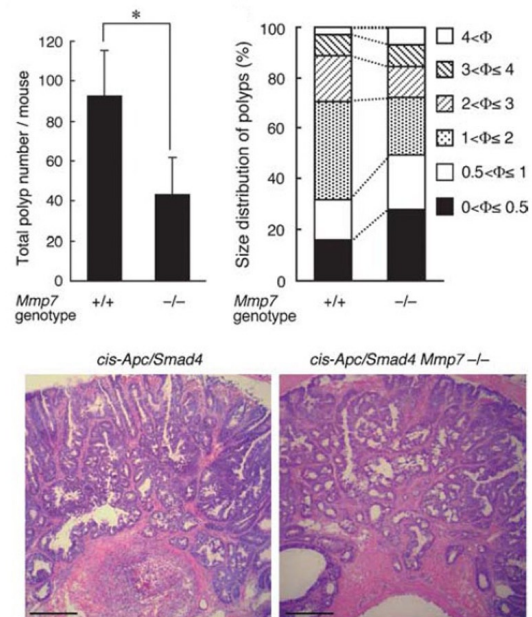


図 1. MMP7 ノックアウトは、*Apc/Smad4* 複合変異マウスの腸癌の数、大きさを減少させる

(2) ウェスタンブロット法、免疫組織化学法により、*Apc* 変異マウスの腸管腺腫では、正常腸管粘膜と比べて mTORC1 経路が顕著に活性化していることが分かった。腸管腫瘍形成における mTORC1 経路の役割を明らかにするために、mTORC1 阻害剤である RAD001 を *Apc* 変異マウスに経口投与したところ、腫瘍の数は全体で 40%減少し、特に大きな腫瘍の数が劇的に減少することが分かった (図 2)。また、RAD001 の長期投与により *Apc* 変異マウスの生存率は有意に改善した (図 3)。RAD001 投与により腫瘍細胞の増殖が 60%まで低下したがアポトーシスには変化がなかった。更に、

一部の新生血管でも mTORC1 経路が活性化していること、RAD001 投与により腫瘍血管新生が 30%程抑制されることが明らかとなった。また、*Apc* 変異マウスの腫瘍における mTORC1 活性化には、Wnt 経路活性化を介した mTOR の発現レベル上昇だけでなく、JNK 経路の活性化が重要な役割を果たすことを見出した。これらの結果は、mTORC1、JNK 両経路が腸管腫瘍の治療標的となりうることを示唆している。

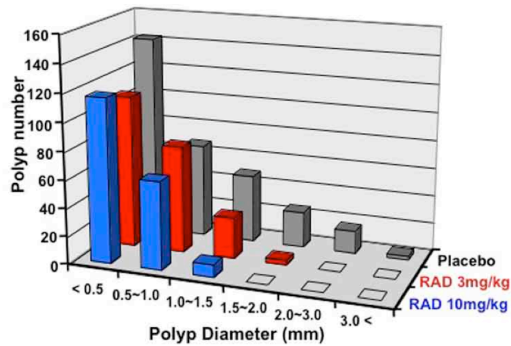


図 2. RAD001 投与により *Apc* 変異マウスの腫瘍形成が抑制される

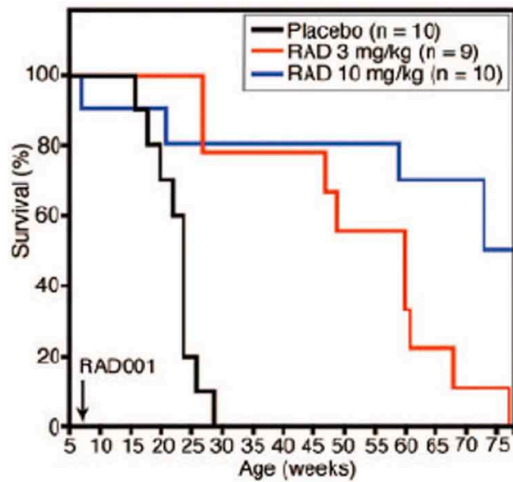


図 3. RAD001 長期投与により *Apc* 変異マウスの生存率が劇的に改善する

(3) COX-2/mPGES-1 トランスジェニック (*K19-C2mE*) マウスの正常組織と腫瘍組織から抽出した RNA を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、SPEM と呼ばれる胃癌の前癌病変のマーカーとして知られる TFF2 と MUC6 の発現が過形成性腫瘍において顕著に増加していることを見出した。更に *K19-C2mE* マウスの TNF- α 遺伝子を欠損させたところ、過形成性腫瘍の発生および TFF2 と MUC6 の発現がいずれも消失し、腫瘍形成に TNF- α を介した炎症反応が深く関わっていることが分かった。また、Wnt 経路を活性化するトランスジ

ェニックマウス (*K19-Wnt-1*) を作出し *K19-C2mE* マウスと交配したところ、全例で胃に浸潤を伴う腺癌の発症を認めた (図 4)。これらの結果は、炎症反応により過形成性腫瘍 (初期病変) が形成された後、上皮細胞での遺伝子変異が加わることで胃癌へと進展 (悪性化) することを明確に示唆している。

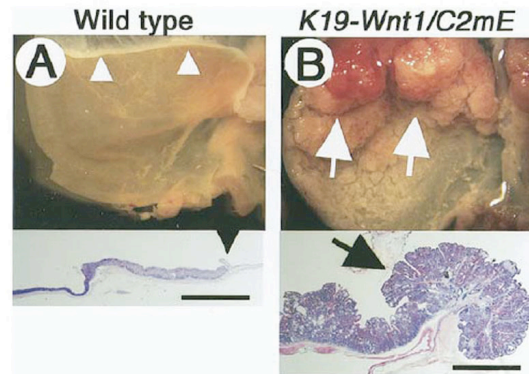


図 4. *K19-Wnt1/C2mE* マウスに発生した胃癌

(4) 正常部と比較して *Lkb1^{+/-}* マウスの前癌病変および肝細胞癌では、Cd14、Ly6d、interleukin-6 (IL-6) など炎症によって誘導される因子の発現が上昇していたことから、*Lkb1^{+/-}* マウスの HCC 形成過程における間質反応の役割が示唆された。また、活性型 β -catenin を誘導的に発現するノックインマウスと *Lkb1^{+/-}* マウスとの複合変異マウスを作出したところ、活性型 β -catenin により *Lkb1^{+/-}* マウスの肝細胞癌形成が加速された。これらの結果は、前述の胃癌と同様に、炎症反応により前癌病変が形成された後、Wnt 経路活性化など更に遺伝子変化が加わることで肝細胞癌に進展す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 23 件)

1. Kakizaki, F., Aoki, K., Miyoshi, H., Carrasco, N., Aoki, M. and Taketo, M. M. CDX transcription factors positively regulate expression of solute carrier family 5, member 8 in the colonic epithelium. *Gastroenterology* 査読有り 138:627-35. 2010

2. Fujishita T, Aoki M. and Taketo MM. The role of mTORC1 pathway in intestinal tumorigenesis. *Cell Cycle*. 査読有り 15:3684-7. 2009

3. Oshima H, Itadani H, Kotani H, Taketo MM, and Oshima M. Induction of prostaglandin E2 pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res.* 査読有り 69: 2729-33, 2009
4. Miyoshi, H., Deguchi, A., Nakau, M., Kojima, Y., Mori, A., Oshima, M., Aoki, M. and Taketo, M. M. Hepatocellular carcinoma development induced by conditional beta-catenin activation in Lkb1 mice. *Cancer Sci.* 査読有り, 100:2046-53, 2009
5. Arimura, S., Matsunaga, A., Kitamura, T., Aoki, K., Aoki, M. and Taketo, M. M. Reduced level of Smoothed suppresses intestinal tumorigenesis by down-regulation of Wnt signaling. *Gastroenterology* 査読有り, 137:629-638, 2009.
6. Taketo, M. M. and Edelman, W. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology* 査読有り, 136:780-798, 2009.
7. Taketo, M. M. Role of bone marrow-derived cells in colon cancer: lessons from mouse model studies. *J. Gastroenterol.* 査読有り, 44:93-102, 2009.
8. Kitamura, T., Biyajima, K., Aoki, M., Oshima, M., and Taketo, M. M. Matrix metalloproteinase 7 is required for tumor formation, but indispensable for invasion and fibrosis in SMAD4-deficient intestinal adenocarcinomas. *Lab. Invest.* 査読有り, 89:98-105, 2009.
9. Aoki K. and Taketo M. M. Tissue-specific transgenic, conditional knockout and knock-in mice of genes in the canonical Wnt signaling pathway. *Methods Mol. Biol.* 査読有り, 468:307-331, 2008.
10. Fujishita, T., Aoki, K., Lane, H.A., Aoki, M., and Taketo, M. M. Inhibition of mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in *Apc* Δ 716 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 査読有り, 105:13544-13549, 2008.
11. Kitamura, T. and Taketo, M. M. Keeping out the bad guys: gateway to cellular target therapy. *Cancer Res.* 査読有り, 67:10099-10102, 2007.
12. Aoki K. and Taketo M. M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J. Cell Sci.* 査読有り, 120:3327-3335, 2007.
13. Kojima, Y., Miyoshi, H., Clevers, H. C., Oshima, M., Aoki, M. and Taketo, M. M. Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity regulating kinases signaling. *J. Biol. Chem.* 査読有り, 282: 23532-23540, 2007.
14. Kitamura, T., Kometani, K., Hashida, H., Matsunaga, A., Miyoshi, H., Hosogi, H., Aoki, M., Oshima, M., Hattori, M., Takabayashi, A., Minato, M. and Taketo, M. M. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+-myeloid cells that help invasion. *Nat. Genet.* 査読有り, 39: 467-475, 2007.
15. Kawada, K., Hosogi, H., Sonoshita, M., Sakashita, H., Manabe, T., Shimahara, Y., Sakai, Y., Takabayashi, A., Oshima, M. and Taketo, M. M. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 査読有り, 26: 4679-4688, 2007.
16. Aoki, K., Aoki, M., Sugai, M., Harada, N., Miyoshi, H., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M., Seno, H., Chiba, T., Oshima, M., Hsieh, C. L. and Taketo, M. M. Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* 査読有り, 26: 3511-3520, 2007.
17. Taketo, M. M. Wnt signaling and gastrointestinal tumorigenesis in mouse models. *Oncogene* 査読有り, 25: 7522-7530, 2006.
18. Taketo, M. M. Mouse models of gastrointestinal tumors. *Cancer Sci.* 査読有り, 97: 355-361, 2006.
19. Takeda, H., Miyoshi, H., Kojima, Y., Oshima, M. and Taketo, M. M. Accelerated onsets of gastric hamartomas and hepatic adenomas/carcinomas in *Lkb1*^{+/-}-*p53*^{-/-} compound mutant mice. *Oncogene* 査読有り, 25: 1816-1820, 2006.
20. Oshima, M., Oshima, H., Matsunaga, A. and Taketo, M. M. Hyperplastic gastric tumors with spasmodic polypeptide-expressing metaplasia caused by tumor necrosis factor-alpha-dependent inflammation in cyclooxygenase-2/microsomal prostaglandin E synthase-1 transgenic mice. *Cancer Res.* 査読有り, 65: 9147-9151, 2005.

21. Li, Q., Ishikawa, T., Oshima, M. and Taketo, M. M. The threshold level of adenomatous polyposis coli protein for mouse intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 査読有り, 65: 8622-8627, 2005.

22. Oshima, M., Oshima, H. and Taketo, M. M. Hypergravity induces expression of cyclooxygenase-2 in the heart vessels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有り, 330: 928-933, 2005.

23. Li, Q., Ishikawa, T., Miyoshi, H., Oshima, M. and Taketo, M. M. A targeted mutation of Nkd1 impairs mouse spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 査読有り, 280: 2831-2839, 2005.

[学会発表] (計 17 件)

1. Taketo, M.M. "Cellular Target Therapy" for colon cancer metastasis: a new strategy based on tumor microenvironment. The 14th Japan-Korea Cancer Research Workshop Dec. 18-19, 2009 Kanazawa, Japan

2. Taketo, M.M. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. Notch Meeting 2009 Sep.27-Oct.1, 2009 Athens, Greece

3. Taketo, M.M. A novel mechanism of colon cancer invasion and metastasis: role of bone marrow-derived cells. FASEB TGF-beta Meeting Jun.14-18, 2009 Phoenix, AZ, USA

4. Taketo, M.M. Mouse Models for Colon Cancer Invasion and Metastasis: AACR Meeting (Mouse Models of Cancer): Jan. 12-15,2009 San Francisco, CA, USA

5. Sonoshita, M. and Taketo, M.M. (Poster) Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling: Notch and Cancer Meeting Oct. 5-8, 2008 Athens, Greece

6. Taketo, M.M. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling: Notch and Cancer Meeting: Oct. 5-8, 2008 Athens, Greece

7. Taketo, M.M. What animal models tell us about gastrointestinal carcinogenesis: Fifth International Society of Gastroenterological Carcinogenesis Conference: Aug. 31-Sep. 3, 2008 Oxford, UK

8. Taketo, M.M. Novel Mechanism of Colon Cancer Invasion: Role of Bone-Marrow Derived

Cells in cis-Apc+/-Smad4+/- mice. Joint Metastasis Society-AACR Conference on Metastasis: Aug. 3-7, 2008 Vancouver, Canada

9. Sumimasa Arimura, Masahiro Aoki, and Makoto Mark Taketo: Roles of Smoothed (Smo), the major signal transducer of the hedgehog pathway, in the development of intestinal tumors: 2008 AACR Annual Meeting: Apr. 15, 2008 San Diego, CA, USA

10. Taketo, M.M. A Novel Mechanism of Colon Cancer Invasion: The role of CCR1 and myeloid cells: NIH-NIDDK Workshop "Local Influences on Health and Repair of Intestinal Epithelium" Mar. 25-26, 2008 Bethesda, MD, USA

11. Taketo, M.M. A Novel Mechanism of Colon Cancer Invasion: Role of Bone Marrow-derived Cells: NIH-NCI-Japan Cooperative Cancer Research Program Workshop 2008: Mar. 19-21, 2008 Kyoto, Japan

12. Taketo, M.M. Mouse Model of Gastric Cancer: Role of H. pylori infection and Wnt signal activation: AACR Conference "Frontiers in Cancer Prevention Research" Dec. 5-8, 2007 Philadelphia, PA, USA

13. Taketo, M.M. Smad4-deficient Intestinal Tumors Recruit CCR1+-Myeloid Cells That Help Invasion: The 11th Germany-Japan Cancer Workshop Nov. 29-30, 2007 Kyoto, Japan

14. Taketo, M.M. A Novel Mechanism of Colon Cancer Invasion: Role of Bone Marrow-derived Cells: The 38th International Symposium of Princess Takamatsu Cancer Research Fund: Nov. 27-29, 2007 Tokyo, Japan

15. Taketo, M.M. A Novel Mechanism of Colon Cancer Invasion: Role of CCR1+ Myeloid Cells in Smad4-deficient Colon Cancer: AACR Meeting: Advances in Colorectal Cancer Research: Nov. 14-17, 2007 Boston, MA, USA

16. Sonoshita, M. Possible involvement of Notch pathway genes in colon cancer metastasis: The Notch Meeting Sep. 23-27, 2007 Athens, Greece

17. Taketo, M.M. A Novel Mechanism of Colon Cancer Invasion: Role of Immature Myeloid Cells in a SMAD4-deficient Adenocarcinoma: Mouse Model 98th Annual Meeting of AACR: Apr. 13-18, 2007 Los Angeles, CA, USA

[その他]

ホームページ等

URL:

<http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 誠 (TAKETO MAKOTO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70281714

(2) 研究分担者

大島 正伸 (OSHIMA MASANOBU)

京都大学医学研究科・准教授

研究者番号：40324610

大島 浩子 (OSHIMA HIROKO)

金沢大学・がん研究所・助教

研究者番号：80362515

青木 正博 (AOKI MASAHIRO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60362464

三好 弘之 (MIYOSHI HIROYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30362479

北村 剛規 (KITAMURA TAKANORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10378622

園下 将大 (SONOSHITA MASAHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80511857