

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390205

研究課題名 (和文) 消化管における炎症から発癌への分子機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanism of inflammation-associated gastro-intestinal carcinogenesis

研究代表者

前田 慎 (MAEDA SHIN)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40415956

研究成果の概要 (和文) : NF- $\kappa$ B/IKK および JNK 活性化経路は炎症、アポトーシス、細胞増殖などに関与する遺伝子群を制御する重要なシグナル伝達経路であり、その働きから癌発生、進展に重要な役割をしている可能性が示唆されていた。そこで、胃癌、大腸癌に関して、マウスモデルを用いて検討した。胃癌モデルでは NF- $\kappa$ B/IKK および JNK のノックアウトマウスにおいて腫瘍形成が抑制された。さらに IKK 阻害剤による炎症性大腸癌発生の抑制、IKK ノックダウンによる癌増殖の抑制などが明らかとなった。以上から、NF- $\kappa$ B/IKK および JNK は消化管癌発生、進展に関与し、さらに治療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) : NF- $\kappa$ B/IKK and JNK pathways are important cell signaling pathways that regulate the gene cluster associated with the inflammation, apoptosis, and cell proliferation. Therefore it is suggested that these pathways play important roles of the development or progression of carcinomas. We used the mouse models and examined those functions in the gastrointestinal cancers. Cancer development was inhibited in the knockout mouse of NF- $\kappa$ B/IKK and JNK in the stomach cancer model. In addition, the inflammation-associated cancer of colon was inhibited by the IKK inhibitor. In summary, NF- $\kappa$ B/IKK and JNK were should be important for the generation or progression of gastrointestinal cancers and will become the treatment targets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌・動物

## 1. 研究開始当初の背景

人の癌の 20-25%は炎症が関与すると考えられている。これまでにさまざまな動物実験モデル、および臨床的な事象から炎症と発癌には密接な関係があると考えられてきたが、その分子メカニズムの詳細はいまだ明らかになっていない。特に消化器疾患において慢性炎症と発癌との関連は食道炎、胃炎、小腸、大腸炎、膵炎、肝炎と多くの臓器にわたる。その中でも特に興味深いのは、胃炎、肝炎における感染症を基にした慢性炎症である。胃炎は *Helicobacter pylori* (ヘリコバクター) であり、肝炎は Hepatitis virus (肝炎ウイルス) であるが、近年その疫学的検討からこれらの感染源を排除することにより、胃癌、肝癌の発癌率が低下することがあきらかとなっている。また、抗炎症剤である COX-2 阻害剤の使用による発癌リスクの減少は明らかな炎症を伴わない発癌において、腫瘍内微小環境の炎症反応の重要性を示唆している (Ulrich CM et al. Nat Rev Cancer. 2006)。よって、炎症から発癌へのメカニズムの解析と癌に対する治療法の開発は消化器癌による死亡患者減少において極めて重要であると考えられる。

疫学的な検討によってエビデンスが示されつつある炎症と発癌との関連性はそのメカニズムについても広く研究が行われ、しだいに明らかになりつつある。炎症と発癌を考える上で、浸潤した炎症細胞から放出される因子であるサイトカインとそのサイトカインによって誘導される因子と発癌との関連性の解析がメカニズム検索には有効で

あると考えられ、近年の多くの研究のこの方向性に向かっている。例えば炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  のレセプターノックアウトマウスでは炎症発癌モデルにおいて腫瘍性病変が減少する (Knight B et al. J Exp Med. 2000)。また、抗 IL-6 レセプター抗体により炎症大腸発癌が抑制される (Becker C et al. Immunity. 2004)。

## 2. 研究の目的

NF- $\kappa$ B/IKK および JNK 活性化経路は炎症、アポトーシス、細胞増殖、分化などに関与する遺伝子群を制御する重要なシグナル伝達経路であり、その働きからこれらの経路の障害による発癌抑制や癌治療の可能性が示唆されている。特に炎症性サイトカインの発現においては、これらの抑制によって同時にいくつかのサイトカインの発現制御が可能となる。しかし一方、臨床応用に至るに足る証拠は揃っていない。そこで本研究において動物発癌モデルを用いて、NF- $\kappa$ B/IKK および JNK の抑制による発癌抑止と癌治療への可能性を検討することとした。応募者はこれまでに主に化学発癌モデルにおける発癌と IKK, JNK との関連を検討してきた (Maeda S et al. Cell. 2005, Sakurai T et al. Proc Natl Acad Sci. 2006)。今回の目的は炎症発癌モデルを用いてこれらの因子と発癌との関連を明らかとし、その治療への可能性を検討することである。

## 3. 研究の方法

(1) 胃特異的 IKK $\beta$  ノックアウトマウス作成

NF- $\kappa$ B 活性化経路の最も重要なキナーゼである IKK $\beta$  ノックアウトマウスは胎生致死である。そこで胃上皮における特異的ノックアウトマウスを作成するため、胃に発現する Foxa3 プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Univ Pennsylvania, Dr. Kaestner より 分 与 ) より IKK $\beta$ F:Foxa3-Cre を作成する。

#### (2) 胃、大腸発癌モデルの作成と NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$ の働きについて検討

胃癌として 4 種類の発癌モデルを用いる。①スナネズミにおけるヘリコバクターピロリ単独感染モデル。②マウスの炎症発癌モデルとして、ヘリコバクター属で、マウスにおいて慢性胃炎から胃癌を惹起するヘリコバクターフェリス感染モデルを確立する。さらに胃癌の中には慢性胃炎を母地としないと考えられているタイプの癌が存在するため、そのモデルとして③マウスにおける発癌剤(MNU)モデル(図 1)。このマウスに上記で作成した IKK $\beta$  マウスを用いて、その腫瘍形成の程度の観察を行う。また、大腸癌として Azoxymethane (AOM) + 大腸炎のモデルを用いる。細菌因子であるリポポリサッカライド (LPS) を介したマクロファージ系の関与の強い dextran sulfate sodium (DSS) モデル (飲用水内に含有させ投与) (図 2) を用いて、IKK 阻害剤を使用する。また、大腸がんには恒常的に NF- $\kappa$ B/IKK の活性化が認められるが、この機能解析を行う。

#### (3) 発癌モデルにおける JNK の働きについて検討

JNK はおもに JNK1 および JNK2 の二つのアイソタイプがあるが、JNK1,2 のダブ

ルノックアウトは胎生致死のため、この 2 種類のノックアウトマウスをそれぞれ用いて実験を行う。モデルは上記の胃、大腸発癌モデルを用いる。

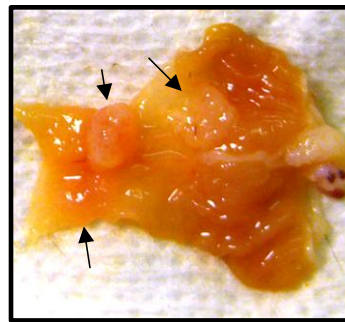


図 1 MNU による胃癌モデル



図 2 AOM+DSS による大腸癌モデル

#### 4. 研究成果

##### (1) 胃特異的 IKK $\beta$ ノックアウトマウス作成と胃癌の検討

NF- $\kappa$ B 活性化経路の重要なキナーゼ IKK $\beta$  KO マウスは胎生致死である。そこで胃特異的 KO マウスを作成するため、胃特異的 IKK $\beta$  KO マウスを作成した。まず、ヘリコバクターフェリス感染にて検討を行ったが、炎症に差が見られなかった。そこでこれらのマウスにおいて発癌剤である N-nitrosourea を投与し、発がんに対する影響を検討した。その結果、腫瘍が抑制されることが明らかとなった。メカニズムとして IKK $\beta$  による DNA ダメージシグナルの低下とアポトーシスの抑制によることが明らかとなった。さらに下流の分子として IL-1 $\alpha$  を同定し、IL-1RKO マウスについても同様の検討をしたところ、胃癌の発生が抑制された(論文 1)。

##### (2) 大腸癌における恒常的 NF- $\kappa$ B 活性化とその阻害による分子標的の可能性の検討

日常診療として行っている大腸検査、治療において摘出された標本を用いて、NF- $\kappa$ B 活性化を検討し、約30%の症例で恒常的な活性化が観察された。さらに、大腸がん細胞株を用い、上記と同様の検討を行ったところ約50%の細胞において活性化が観察された。恒常的NF- $\kappa$ B活性化の存在する細胞株を用いて IKK 複合体の重要な調節蛋白である IKK $\gamma$  をターゲットとしたノックダウン細胞を作成し、つぎに作成した細胞株を In vitro において細胞増殖能、浸潤能、細胞死の程度などについて検討を行った。その結果、恒常的NF- $\kappa$ B活性化はケモカインを介した血管新生に重要な働きをしていることが明らかとなった(論文5)。

### (3) NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた胃炎、腸炎の抑制

NF- $\kappa$ B 阻害剤である NEMO binding domain peptide (NBD)を用いてマウス腸炎モデルである Dextran sulfate (DSS)による腸炎の抑制を検討したところ、その炎症所見は抑制された。また、炎症発癌モデルである azoxymethane+DSS モデルにおいても NBD の使用により腫瘍の発生が抑制された(論文4)。他のNF- $\kappa$ B 阻害剤である IMD-354 を用いて、NF- $\kappa$ B を活性化することで知られるヘリコバクターピロリによる胃炎への影響を検討した。その結果、胃炎の発生にはNF- $\kappa$ B の活性化が重要であることが明らかとなった(論文7)。

### (4) JNK1 ノックアウトマウスにおける胃がんの検討

JNK1 ノックアウトマウスをもちいて N-nitrosourea を投与し、腫瘍を観察すると、腫瘍数、大きさともに抑制された。そのメカニズムとして、In vitro の検討を行ったとこ

ろ細胞の不死化および増殖の過程に活性酸素の活性化を介する JNK1 の活性化が重要であることが明らかとなった(論文6)。

### 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16件)

1. Sakamoto K, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Yanai A, Akanuma M, Ogura K, Yoshida H, Hirata Y, Kaestner KH, Omata M, Maeda S. IkappaB kinase beta regulates gastric carcinogenesis via IL-1 $\alpha$  expression. *Gastroenterology* 139:226-38, 2010.
2. Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hikiba Y, Otsuka M, Ijichi H, Ikenoue T, Tateishi K, Akanuma M, Ogura K, Yoshida H, Ichijo H, Omata M, Maeda S. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 regulates colitis and colitis-associated tumorigenesis via the innate immune responses. *Gastroenterology*138:1055-67, 2010.
3. Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, Yanai A, Ogura K, Karin M, Omata M. IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B Activation Controls the Development of Liver Metastasis via IL-6 Expression. *Hepatology* 50:1851-60, 2009.
4. Hayakawa Y, Maeda S, Nakagawa H, Hikiba Y, Shibata W, Sakamoto K, Yanai A, Hirata Y, Ogura K, Muto S, Itai A, Omata M. Effectiveness of IkappaB kinase inhibitors in murine colitis-associated tumorigenesis. *J Gastroenterol* 44:935-43, 2009.

5. Sakamoto K, Maeda S, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Shibata W, Yanai A, Ogura K, Omata M. Constitutive NF- $\kappa$ B activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. Clin Cancer Res 15:2248-58, 2009.
6. Shibata W, Maeda S, Hikiba Y, Yanai A, Sakamoto K, Nakagawa H, Ogura K, Karin M, Omata M. c-Jun NH2-terminal kinase 1 is a critical regulator for the development of gastric cancer in mice. Cancer Res 68:5031-9, 2008.
7. Yanai A, Maeda S, Shibata W, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Ohmae T, Hirata Y, Ogura K, Muto S, Itai A, Omata M. Activation of IkappaB kinase and NF-kappaB is essential for Helicobacter pylori-induced chronic gastritis in Mongolian gerbils. Infect Immun 76:781-7, 2008.
8. Shibata W, Maeda S, Hikiba Y, Yanai A, Ohmae T, Sakamoto K, Nakagawa H, Ogura K, Omata M. Cutting Edge: The I{kappa}B Kinase (IKK) Inhibitor, NEMO-Binding Domain Peptide, Blocks Inflammatory Injury in Murine Colitis. J Immunol 179:2681-5, 2007.

[学会発表] (計 12 件)

1. Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Okamoto M, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, Nakata W, Ijichi H, Omata M Requirement for IKKB in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Digestive Disease Week 2010/5/7 New Orleans
2. Shin Maeda, Yohko Hikiba, Kei Sakamoto, Hayato Nakagawa, Yoku Hayakawa, Yoshihiro Hirata, Keiji Ogura, Masao

Omata Colon cancer-derived factors activate NF- $\kappa$ B in myeloid cells via TLR2 to link inflammation and tumorigenesis Digestive Disease Week 2009/5/5 Chicago

3. Maeda S, Shibata W, Hikiba Y, Yanai A, Sakamoto K, Nakagawa H, Ogura K, Karin M, Omata M. c-Jun NH2-terminal kinase 1 is a critical regulator for the development of chemical-induced gastric cancer in mice. Digestive Disease Week 2008/5
4. 前田慎、芝田渉、小俣政男 消化管癌発生、増殖における C-Jun N-terminal kinase の役割 Japan Digestive Disease Week (JDDW) 2007年10月20日 神戸

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

前田 慎 (MAEDA SHIN)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：40415956

##### (2) 研究分担者

小椋 啓司 (OGURA KEIJI)  
東京大学医学部附属病院・消化器内科・特任講師  
研究者番号：50376456

芝田 渉 (SHIBATA WATARU)  
朝日生命成人病研究所・主任研究員  
研究者番号：00435819

柳内 綾子 (YANAI AYAKO)  
朝日生命成人病研究所・主任研究員  
研究者番号：10415961

##### (3) 連携研究者 なし