

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590397
 研究課題名(和文) 大腸発癌過程における Notch シグナル経路による分化制御機構の分子病理学的検討
 研究課題名(英文) Investigation of the molecular pathology of the differentiation mechanism by the Notch signaling pathway in colon carcinogenesis process.
 研究代表者
 森岡 孝満 (MORIOKA TAKAMITSU)
 琉球大学・医学部・助教
 研究者番号：70253961

研究成果の概要(和文)：ラット大腸発癌モデルで作製した腫瘍を用いて Notch1 と Klf4 の発現を RT-PCR にて調べた結果、Notch1 の発現亢進と杯細胞の分化に関与している Klf4 の発現低下がラット大腸発癌過程に関与していることが示唆された。57 症例のヒト大腸粘膜を用いて粘液枯渴巣(MDF)の検出を試みた結果、ヒト大腸粘膜においてもラット大腸発癌モデル同様に MDF の存在が明らかとなった。ヒト MDF は、組織学的に杯細胞の減少、核の腫大、核の重層化及び間質へのリンパ球浸潤を認めた。また、幾つかの Overlapped lesion(OLL)は、鋸歯状変化が認められた。以上より MDF がヒトにおいても大腸癌の前癌病変として有用なバイオマーカーに成り得る可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the relation of Notch signaling pathway on colon carcinogenesis by using the rats colon carcinogenic model. We found that the expression of Notch1 in colon tumor was significantly increased compared to the normal mucosa. In contrast, the expression of Klf4 in colon tumor was significantly decreased compared the normal mucosa. These results suggested that increased expression of Notch1 and decreased expression of Klf4 could be associated with the rat colon carcinogenesis. We also examined the identification of mucin-depleted foci (MDF) by using alcian blue pH2.5 stain in human colon mucosa of 57 subjects. We found that MDF existed in human colon mucosa. Histologically, MDF and OLL (Overlapped lesion with ACF) recognized the loss of goblet cells, nucleus swelling, nuclear stratification, and infiltrate of lymphocyte to stroma. The some of OLL represented the crypt with serrated change. These results suggested that MDF existed even in humans and it may be preneoplastic lesions and could be useful biomarker of human colon carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：粘液枯渴巣、Notch、大腸癌、ラット大腸発癌モデル、ヒト大腸粘膜

1. 研究開始当初の背景

「Notch」の名称は、20 世紀初期のショウジョウバエで行われた遺伝学的スクリーニングで発見されたメスの羽に切痕(ノッチ)のある変異ショウジョウバエの記載に由来する(Genetics, 4, 275-282, 1919)。Notch 遺伝子は 1985 年に同定され、300kDa の細胞表面受容体をコードすることが明らかとなった(Cell, 43, 567-581)。その後、Notch シグナルの研究は従来の臓器・組織発生のみならず、神経系をはじめとして多くの臓器成長後の個体の組織維持・再生に係わっていることが示唆されてきた。さらに、このシグナルの不適切な活性化は造血系の腫瘍化に係わることも明らかになってきている(Cell, 66, 649-661, 1991; J Exp Med, 183, 2283-2291, 1996)。消化管系においては、腸上皮細胞分化についての報告はなされているが(J Biol Chem, 274, 6476-6482, 1999)、消化器系腫瘍についての報告は、van Es ら(Nature, 435, 959-963, 2005)が Notch/ γ -secretase 抑制が Apc 遺伝子変異を有する Min マウスにおいて増殖性陰窩細胞および腺腫細胞の杯細胞分化を促進することを示したものであつただけで、大腸発癌についての Notch シグナルは未知の分野である。しかし、白血病では Notch1 遺伝子の変異による Notch シグナルの亢進が原因であることが報告されていることより(Science, 306, 269-271, 2004)、消化管腫瘍についても研究の必要性は高いと思われる。一方、Wnt シグナルについても、その腸の陰窩発生・形成に重要な経路であることが報告されているが(Nature Genet, 19, 379-383, 1998)、消化管腫瘍に対する Wnt シグナルの重要性は Vogelstein らの報告以来(Science, 275, 1787-1790, 1997)、ヒト、動物を問わず、多くの研究成果の中で明らかにされてきた。これまで共同研究者はラット大腸化学発癌モデルにおける発癌機序の解明を分子病理学的に検討し、平成 11, 12 年度及び平成 13~15 年度の両基盤研究(C)(後述の従来の研究経過等を参照)において、新たにラット大腸発癌モデルの前癌性病変(β -catenin accumulated crypt; BCAC)を見つけ、 β -カテニン遺伝子の異常が引き続く Wnt シグナルの活性化をもたらすことで前癌性病変の細胞増殖を来す可能性を示した(Cancer Res, 60, 3323-3327, 2000; Cancer Res, 61, 1874-1878, 2001; Carcinogenesis, 24, 91-97, 2003)。加えて、最近新たに、大腸癌モデルでの前癌病変としてムチン枯渇病巣(mucin-depleted foci; MDF)が提唱されてきたが(Cancer Res, 63, 2388-2392, 2003)、

我々はこの病変と上記 BCAC が同一であることを見出した(Cancer Sci, 95, 792-797, 2004)。実際、MDF が β -カテニン遺伝子変異を有していることも報告されている(Int. J Cancer, 116, 9-15, 2005)。さらに、山口らはゼブラフィッシュを用いた研究で網膜幹細胞が Wnt シグナル経路による細胞増殖から Notch シグナル経路による細胞分化へ移行するスイッチを制御する遺伝子としてヒストン脱アセチル化酵素 1(Histone deacetylase 1; HDAC1)を発見し、HDAC1 の突然変異により網膜幹細胞が神経細胞に分化できずに未熟な状態で増殖を続けることを報告し網膜における発癌メカニズムに関与している可能性を示唆している(Development, 132, 3029-3043, 2005)。HDAC1 が、Notch 及び Wnt の両シグナル伝達を介した遺伝子発現の制御に深く関与していることが伺える。以上のことを踏まえて、我々は Wnt シグナルの活性化がみられる BCAC と同一病変である MDF における Notch シグナル経路と Wnt シグナル経路の関与に加え HDAC1 の発現についても検討する経緯に至った。加えて、ヒト大腸における MDF の検討がされていないことよりヒト大腸における MDF の検出と上記両シグナル経路の関与についての検討を行う着想に至った。

2. 研究の目的

Notch シグナルに関する研究で、Notch/ γ -secretase inhibitor が腸陰窩細胞特に増殖細胞や腺腫細胞を杯細胞へ分化させるという報告がなされた(Nature, 435, 959-963, 2005)。これを踏まえて、本研究は、前癌病変特に杯細胞が消失している MDF における Notch 遺伝子及び関連遺伝子群(Math1, Hes1 など)の発現状態を解析し分化抑制への関与を明らかにする。加えて、我々が腸腫瘍の真の本体と考えている MDF の腫瘍顕在化へと導く主要な遺伝子群の解明のため、ラット大腸発癌モデルで作製した肉眼的に検出可能な大腸腺腫及び腺癌病変における Notch シグナル経路関連遺伝子(関連転写因子を含む)と β -カテニン遺伝子を含む Wnt シグナル経路関連遺伝子の mRNA を解析しその分子病理学的差異を検討した。さらに、ヒト大腸を用いて MDF の検出とその分布様式に関して検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ラット大腸発癌モデルでの前癌病変および腫瘍の解析

① 前癌病変および大腸腫瘍の作製

雄 F344 ラットに 1,2-dimethylhydrazine の皮下

注射により、大腸に特異的に従来型前癌病変である大腸陰窩変異巣(aberrant crypt foci; ACF)、新規のムチン枯渇病巣(mucin-depleted foci; MDF)及び大腸腫瘍を誘発した(Jpn J Cancer Res, 90, 406-412, 1999; Cancer Res, 37, 4156-4159, 1977)。

②大腸粘膜の処理

経時的に屠殺し、ホルマリン固定し、アルシアンブルーpH2.5染色を施行した後、実体顕微鏡下で観察されるMDFを同定、計測した(Cancer Sci, 95, 792-797, 2004)。その後、メチレンブルー染色しBirdの基準に従いACFのカウントを行った(Cancer Lett, 37, 147-151, 1987)。実験開始40週後に屠殺したラットに関しては、腫瘍の発生部位、サイズ及び個数を計測したのち一部を分子病理学的検討用に凍結保存した。

③免疫組織化学及び分子病理学的検討

ホルマリン固定された大腸及び大腸腫瘍はパラフィン包埋し連続切片を作製して組織学的検索と免疫組織化学的な検索を行った。抗体として細胞の発生・分化・増殖など細胞の運命決定に重要な役割を担っているNotch1蛋白に関して行った。また、凍結保存した腫瘍組織33個と非腫瘍部10ヶ所よりmRNAを抽出しNotch1及びOct4, Sox2, c-Mycと共にiPS細胞(induced pluripotent stem cell)作製に利用されている遺伝子として知られ、細胞分裂と胚発生に深く関与するとともに、消化管系腫瘍においては癌抑制因子として報告されているKruppel様転写因子4(Klf4)の発現についてRT-PCR法を用いて検討した。mRNA定量解析は、Multi Gauge Ver3.0 (Fuji Film)を用いて行い、各mRNAの発現の違いをhousekeeping geneであるGapdhに対する比率で評価した。

(2)ヒト大腸粘膜におけるMDFの検出と分布様式に関する検討

材料は、当大学病院にて大腸癌等で摘出された57症例の大腸で既に病理の確定診断がなされたものである。ホルマリン固定された非腫瘍部粘膜より筋層及び漿膜を慎重に剥離し粘膜面が水平になるようにプレートに貼り付けた後、粘膜面の面積を求めた。その後、アルシアンブルーpH2.5(AB)染色によるMDFの検出、引き続きメチレンブルーpH2.5染色によるACFとOLL(overlapped lesions)の観察を行い、各病変の100cm²当たりの出現率を求めた。加えて、上行結腸、横行結腸、左側大腸(下行結腸及、S状結腸)及び直腸における各病変の分布様式に関する検討を行った。本研究は、当大学臨床研究倫理審査委員会の承認後、患者情報の外部への漏洩が無いシステムの下で行った。加えて、組織標本作製し組織学的検討も行った。

4. 研究成果

(1)ラット大腸腫瘍におけるNotch1及びklf4遺伝子のmRNA発現

腫瘍部及び非腫瘍部におけるNotch1の発現は、それぞれ 2.77 ± 0.26 、 0.90 ± 0.16 であり、腫瘍部におけるNotch1発現が非腫瘍部に比較して有意な上昇を認めた(図1, 2)。一方Klf4の腫瘍部及び非腫瘍部における発現は、それぞれ 0.79 ± 0.08 、 2.15 ± 0.20 であり、腫瘍部におけるKlf4発現が非腫瘍部に比して有意な減少を認めた(図1, 2)。

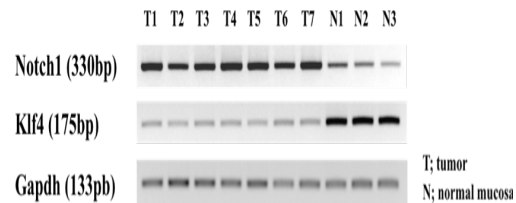


図1. Notch1及びKlf4のmRNA発現
T1~T7; 大腸腫瘍
N1~N3; 正常大腸粘膜

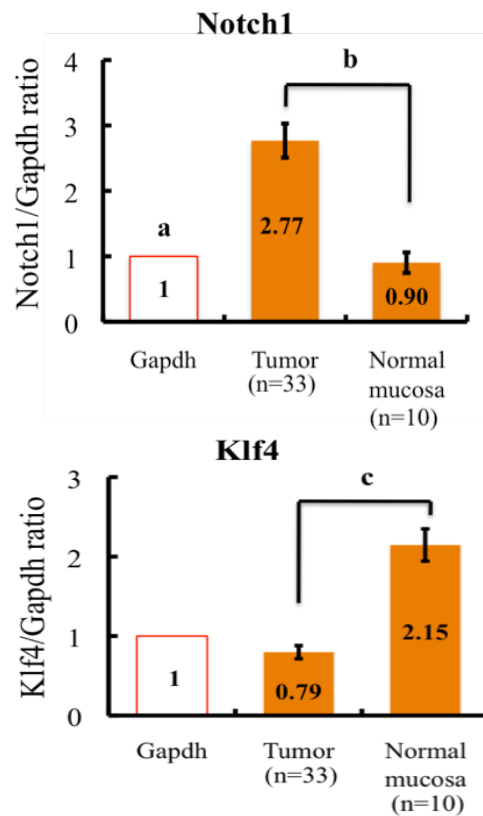


図2. Notch1及びKlf4のGapdhに対する発現比率

- a) Mean \pm SE
- b) Significantly different from normal mucosa by Welch's *t*-test, $P < 0.0001$
- c) Significantly different from normal mucosa by Student's *t*-test, $P < 0.0001$

腫瘍部と正常粘膜における Notch1 の免疫組織化学染色より腫瘍細胞の細胞質に陽性所見を認めたが、正常細胞では認められなかった(図3)。

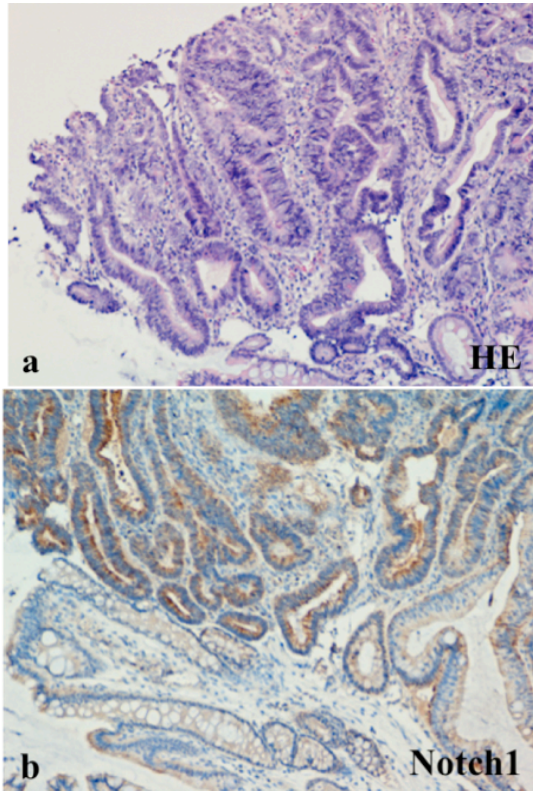


図3. 腫瘍部における Notch1 免疫組織化学染色
 a. ヘマトキシリン染色
 b. Notch1 免疫組織化学染色

ラット大腸腫瘍部において Notch1 の発現上昇、Klf4 の発現減少を明らかにした。Notch1 の発現亢進は杯細胞の減少に関わる Klf4 減少とともに、大腸発癌に関与する可能性が示唆された。今後、我々が提唱している大腸癌の前癌病変である杯細胞の減少を伴ったムチン枯渇巣 (mucin depleted foci, MDF) における両遺伝子の発現を検討し MDF と腫瘍形成との関連性を詳細に検討することにより大腸発癌機序解明に貢献出来るものと思われる。

(2)ヒト大腸粘膜における MDF の検出とその分布様式

ヒト正常粘膜における MDF の検索にてラット大腸発癌モデル同様に MDF と OLL の存在が明らかとなった(図4)。組織学的検討により、ラット大腸発癌モデルにおける MDF の組織像と比べ核異型、構造異型等が軽度であったが、ヒト大腸粘膜の OLL に鋸歯状変化を示す陰窩を認めた(図4)。57 症例における ACF、MDF 及び OLL の出現率は、それぞれ 86%(49 症例)、35.1%(20 症例)、24.6%(14 症例)であった。総 ACF、MDF 及び OLL 数は、それぞれ 380 個、41 個、20 個で

あり(図5)、各病変の100cm² 当たりの平均出現数は、ACFが 6.36 個、MDFが 1.94 個、OLL が 1.36 個であった。

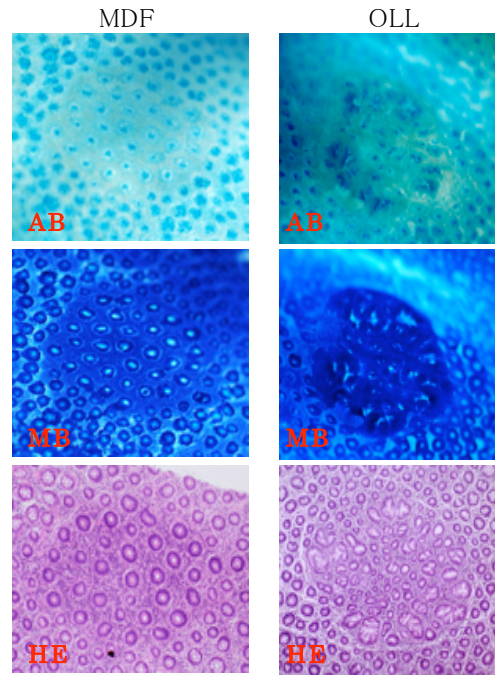
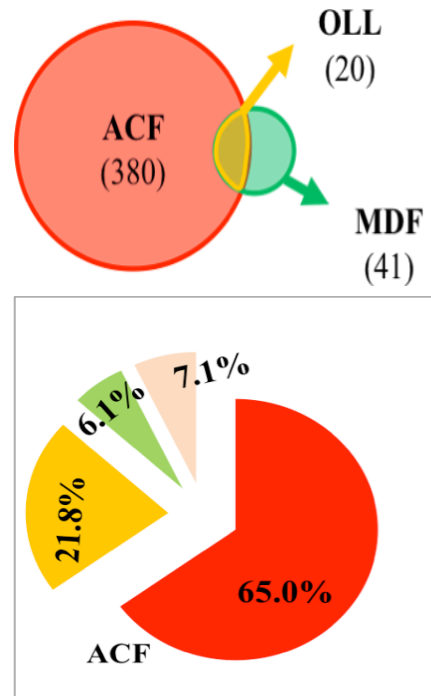


図4. MDF と OLL の形態及び組織像

各病変を構成する crypt 数は、ACFが 42.4 個、MDFが 38.9 個、OLLが 65.7 個であった。各病変の分布様式は、ACF、MDF及びOLLは、共に直腸部に高い割合で認められる傾向を示した(図5)。



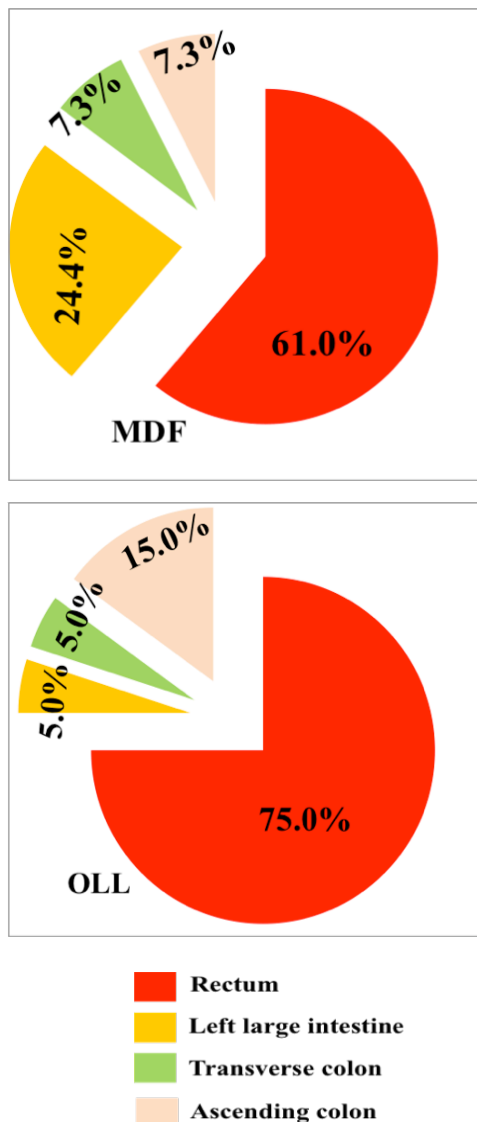


図5. ヒト大腸粘膜における ACF, MDF 及び OLL の分布様式

正常粘膜におけるMDFとOLLの出現率は、ACFに比較して低いことが明らかとなった。また、MDFとOLLの総数は、ACFの総数に比較してそれぞれ約 10 分の 1、約 20 分 1 と著明に少ないものの分布様式に関しては、3 病変間での相違は認められなかった。1 病変を構成する crypt 数は、OLLがACFやMDFに比較して多い傾向を示し、組織学的にOLLに鋸歯状変化を示す陰窩を認め、ヒト大腸発癌過程において鋸歯状変化を伴う腺腫が重要であることよりヒト大腸発癌過程においては OLL の関与が重要である可能性が考えられた。

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 3 件)

- ① Naoi K, Sunagawa N, Yoshida I, Morioka T, Nakashima M, Ishihara M, Fukamachi K, Itoh Y, Tsuda H, Yoshimi N, Suzui M. Enhancement of tongue carcinogenesis in Hras 128 transgenic rats treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oncol Rep*, 査読有, 23(2), 2010, 337-344.
- ② Sunagawa N, Inamine M, Morioka T, Chiba I, Morita N, Aoki Y, Suzui M, Yoshimi N. Inhibitory effect of rice bran-derived crude glycosphingolipid on colon preneoplastic biomarker lesions induced by azoxymethane in male F344 rats. *Mol Med Reports*, 査読有, 2, 2009, 45-49.
- ③ Morita N, Walaszek Z, Kinjo T, Nishimaki T, Hanausek M, Slaga TJ, Mori H, Yoshimi N. Effects of synthetic and natural *in vivo* inhibitors of β -glucuronidase on azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Mole Med Reports*, 査読有, 2008, 741-746.

[学会発表](計 3 件)

- ① 森岡孝満、森田奈苗、崔長旭、吉見直己、ヒト大腸粘膜における粘液枯渴巣の組織学的検討とその分布様式に関する検討、第 68 回日本癌学会学術総会、2009.10.2、横浜。
- ② 森岡孝満、崔長旭、森田奈苗、吉見直己、ラット大腸腫瘍における Notch1 及び Klf4 遺伝子の mRNA 発現に関する検討、第 24 回 発癌病理研究会、2009.8.26、石川。
- ③ 森岡孝満、吉見直己、ヒト大腸粘膜におけるムチン枯渴巣の検索、第 23 回 発癌病理研究会、2008.8.26、三重。

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 1 件)

名称:レーザーマイクロダイセクション用試料載置板
発明者:森岡孝満、吉見直己
権利者:国立大学法人 琉球大学
種類:実用新案
番号:登録第 3148974 号
取得年月日:平成 21 年 2 月 12 日
国内外の別:国内

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森岡 孝満 (MORIOKA TAKAMITSU)

琉球大学・医学部・助教

研究者番号:70253961

(2)研究分担者

吉見 直己 (YOSHIMI NAOKI)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号:30166996

(3)連携研究者

()

研究者番号: