

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08373

研究課題名(和文) エピジェネティックな変化を基盤とする新規胃発癌モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of a new gastric carcinogenesis model based on epigenetic changes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃発癌を考える上で、エピゲノム修飾による遺伝子発現変化が重要である。本研究では、エピゲノム変化に基づく胃癌マウスモデルの構築についてリプログラミングマウスを用いたマウスの作成を行った。初期化因子(OSKM:Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を胃特異的プロモータマウスである Sox2-cre, Foxa3-creを用いて発現させた。その結果として、初期化因子の発現では腫瘍の発生はなかった。慢性炎症では多くの初期化因子の発現が観察されるが、直接的な発癌に及ぼす可能性は否定的であった。また、がん抑制遺伝子であるTP53の欠損を追加しても腫瘍発生は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症で起こるエピゲノム変化と発癌との関連性を解析するためにマウスモデルの作成を試みたが、作成に至らなかった。発癌遺伝子変異の追加により、胃癌モデル作成を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：It is becoming clear that changes in gene expression due to epigenome modification may be important in considering gastric carcinogenesis. In this study, we created a mouse considering the development of gastric cancer using a reprogramming mouse for the construction of a gastric cancer mouse model based on epigenome changes. Reprogramming factors (OSKM: Oct3 / 4, Sox2, Klf4, c-Myc) are activated in the stomach using Sox2-cre and Foxa3-cre, which are gastric-specific promoter mice. As a result, no tumor developed due to the expression of reprogramming factors. Although the expression of many reprogramming factors is observed in chronic inflammation, the possibility of direct carcinogenesis was negative from this study. In addition, no tumor development was observed even when a deficiency of the tumor suppressor gene TP53 was added.

研究分野：消化器内科学

キーワード：エピゲノム 初期化因子 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染が慢性萎縮性胃炎を惹起し、胃癌発生に関与することが明らかとなつて以来、胃癌の診断・治療は格段の進化を遂げている。さらに2013年に慢性胃炎と診断された患者に対する *H. pylori* 除菌治療が保険の適応となり胃癌予防の試みも本格的に開始された (Asaka M, J Gastroenterol 2014)。 *H. pylori* がその種々の病原因子により宿主胃上皮細胞において様々な遺伝子変異・修飾を惹起し、さらにはマクロファージや好中球に代表される炎症細胞浸潤を誘導し発癌や癌増殖に関与することは、これまでの国内外の無数の研究が示唆している。しかしながら、進行胃癌は奏効率の高い抗癌剤や分子標的が開発、臨床応用される一方、その治癒率は低く、依然難治疾患であり標的分子の解明を含めた治療法向上は急務である。その原因の1つには、胃粘膜上皮の発癌機構が十分明らかとされていない点があげられる。

近年、胃発癌におけるゲノム変異解析が広く行われ、その遺伝子変異パターンから4グループ (EB ウィルス関連型、マイクロサテライト不安定性型、ゲノム安定型、染色体不安定性型) への大別が提唱されているが (The Cancer Genome Atlas Research Network, Nature 2014)、その変異パターンは複雑かつ多様であるため、単一の分子を治療ターゲットとすることは困難が予想され、より詳細な症例毎の遺伝子変異解析に基づいた Precision Medicine の実践を要する癌種であると言える。さらに、 *H. pylori* による発癌を考える上で、エピゲノム修飾による遺伝子発現変化が重要である可能性が明らかにされつつある。臨床検体における解析では非癌胃粘膜細胞における遺伝子メチル化の程度は胃癌発症のリスクと相関していることが報告されている (Asada K, Gut 2015)。また、 *H. pylori* の胃粘膜長期感染は異常な DNA メチル化を上皮細胞に誘導することが知られている (Padmanahhan N, Nature Rev Gastroenterol Hepatol 2017)。従つて、 *H. pylori* 感染またはそれに伴う慢性炎症によるエピゲノム変化が、発癌において重要であることが示唆される。胃発癌モデルとして、その遺伝子異常を基盤とした動物モデルの開発は近年行われてきた。例えば、E-cadherin 欠損と TP53 欠損を組み合わせたマウスでは浸潤性の強い胃癌が観察されている (Shimada S, Gut 2012)。一方でエピゲノム変化を基盤とした胃癌発癌モデルは作成されていない。

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立は再生医療に急速な進展をもたらしたが、iPS 細胞の樹立時には、エピゲノムのダイナミックなリプログラミングが起こると考えられている。この技術を応用した発癌モデル作成において、癌遺伝子の発現とリプログラミングによって、iPS 細胞が作成され、エピゲノムのリプログラミングによる幹細胞化と癌化の共通性が示唆されている。最近では膵臓において、癌遺伝子である Kras 変異に加え、初期化因子 (OSKM: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を一時的に働かせることにより、膵臓の細胞を一時的に初期化 (脱分化) したところ、膵臓癌が発生することが報告された。すなわち、Kras の変異だけではなく、部分的な初期化を行うことで、それに伴うエピゲノム変化により癌化が進行した (Shibata H, Nature Commun 2018)。 *H. pylori* 感染による慢性炎症はエピゲノム修飾を起こすと考えられていることにより、発癌に寄与すると考えられ、エピゲノム変化を基盤としたモデル動物作成は、胃発癌メカニズム

の解析、治療モデルの構築には重要であると考える。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1) エピゲノム変化に基づく胃癌マウスモデルの構築 (2) 胃オルガノイドを用いたリプログラミングを介した発癌機構の解析 (3) 慢性炎症におけるリプログラミング因子の発現とその制御を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスモデルの創出

これまでいくつかの胃粘膜特異的な癌遺伝子の発現による胃腫瘍発生モデルを創出してきた。例えば、これまでに胃粘膜特異的 PIK3CA 活性型変異マウスを創出し、長期観察によって、胃及び十二指腸に浸潤性の腫瘍形成を認めることを見出している。また、CDH1 欠損に関しては、単独の欠損では明らかな腫瘍は発生しなかった。今回の検討では臨床的に胃癌の GS タイプにおいて、driver 変異として認められる CDH1 欠損と PIK3CA 変異マウス (PIK3CA^{H1047R}) を用いた。エピゲノムの変化は *Helicobacter* の長期感染およびリプログラミングマウスを用いて行う。胃特異的プロモータは Sox2, Lgr5 を使用した (図 1)。もう一つのモデルは上記で述べたように、初期化因子 (OSKM: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を一時的に働かせることにより、膵臓癌が発生することが報告されているリプログラミングマウス (OSKM マウス) を用いた癌モデルを作成した (図 2)。このマウスは、テトラサイクリン誘導性にリプログラミング因子を一過性に発現させ、タモキシフェン誘導性に胃特異的に E-cadherin 欠損または PIK3CA を発現させる。

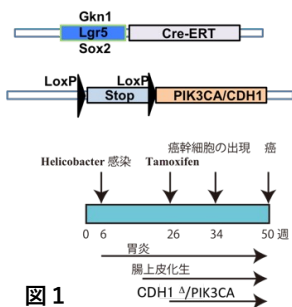


図 1

これらによって腫瘍が発生した場合、病理学的に検討し、ヒト胃癌 (GS タイプ) と比較検討を行う。

これらによって腫瘍が発生した場合、病理学的に検討し、ヒト胃癌 (GS タイプ) と比較検討を行う。

(2) オルガノイドを用いたリプログラミングを介した発癌機構解析

胃オルガノイドの培養はこれまでに確立している。まず、Cre リコンビナーゼ発現のない CDH1 floxed/PIK3CA^{H1047R} floxed マウス胃の粘膜よりオルガノイドを培養した。オルガノイドに Lenti-virus Cre を感染させることにより、腫瘍化を観察する。腫瘍化については免疫不全マウスへの移植により評価する。次に長期の *Helicobacter* 感染によって粘膜変化を惹起させた粘膜より、オルガノイドを培養し、同様に Cre recombinase を発現させて腫瘍可能を観察した。これらのオルガノイドにおいて次世代シーケンサーを用いて、ゲノム、エピゲノム、遺伝子発現変化を網羅的に検討する。想定では *Helicobacter* 感染モデルではエピゲノム変化がすでに幹細胞レベルで起きていることが予測され、CDH1 欠損や PIK3CA 変異による腫瘍化能が亢進していると考えている。次に、リプログラミング因子と CDH1 欠損/PIK3CA 変異による腫瘍化を検討した。

4. 研究成果

(1) 動物モデル作成

SOX2-creERT/CDH1floxed/PIK3CAH1047R, Lgr5-creERT/CDH1floxed/PIK3CAH1047R, Foxa3-cre/CDH1floxed/PIK3CAH1047R マウスについては交配を行い、解析を行ったが、前2者については腫瘍の発生が観察されなかった。Foxa3系についてはマウスが生まれなかった。これはFoxa3が膵臓にも発現し、膵臓でのCDH1欠損が膵炎を惹起するためと考えられた。

(2) 動物モデル作成

次にエピゲノム変化に基づく胃癌マウスモデルの構築についてはリプログラミングマウスを用いて胃癌発生を考慮したマウスの作成を行った。初期化因子(OSKM:Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を胃特異的プロモータマウスであるSox2-cre, Foxa3-creを用いて、一時的に働かせることにより、胃内に初期化因子を発現させた。初期化因子の発現により、胃上皮は細胞死に陥り、胃粘膜の萎縮及び再生の亢進が観察されたが、腫瘍の

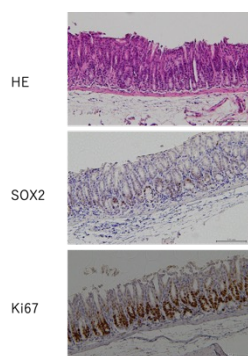


図3

発生は観察されなかった。Sox2の発現は免疫染色にて確認した(図3)。多くのマウスは30日以内に死滅した。発現量を投与するタモキシフェンの量を変更することで減らし、長期に観察したが、腫瘍の発生は観察されなかった。そこでTP53 floxedマウスとの交配を行った。このマウスにおいても多くのマウスで死滅したが、残存したマウスにおいて腫瘍発生の検討を行うも腫瘍の形成は観察されなかった。現在さらにPIK3CAH1047Rマウスを交配することによる腫瘍形成を試みている。また、胃に発現の観察CK-19creERTを用いた同様の解析でも胃内に腫瘍は観察されなかった。

(3) 胃オルガノイドの解析

マウス胃粘膜よりオルガノイドを培養し、初期化因子を発現させたところ、多くの細胞が細胞死に陥った。残存した細胞は重層化の傾向を示し、腫瘍細胞様の変化を呈した。生体内における腫瘍化については免疫不全マウスへ移植したが、腫瘍化は観察されなかった。また、IPS様の変化も観察されていない。

今回の検討では初期化因子の発現では腫瘍の発生はなかった。慢性炎症では多くの初期化因子の発現が観察されるが、直接的な発癌に及ぼす可能性は今回の検討からは否定的であった。また、がん抑制遺伝子であるTP53の欠損を追加しても同様に腫瘍の発生は観察されなかった。さらなる検討の継続が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Hiroaki, Kaneko Hiroaki, Kuwashima Hirofumi, Sugimori Makoto, Tsuyuki Sho, Sanga Katsuyuki, Irie Kuniyasu, Sasaki Tomohiko, Kondo Masaaki, Miyake Akio, Maeda Shin	4. 巻 103
2. 論文標題 The Origin of Epithelium with Low-Grade Atypia in Early Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 217-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000521875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuyuki Sho, Takeshima Hideyuki, Sekine Shigeki, Yamagata Yukinori, Ando Takayuki, Yamashita Satoshi, Maeda Shin, Yoshikawa Takaki, Ushijima Toshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparable genetic alteration profiles between gastric cancers with current and past Helicobacter pylori infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02761-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	須江 聡一郎 (Sue Soichiro) (00738619)	横浜市立大学・附属病院・助教 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------