

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22811

研究課題名(和文)大腸癌自然肝転移マウスモデルを利用した大腸癌肝転移巣微小環境特性の解明

研究課題名(英文)The analysis of tumor microenvironment of colon cancer using the spontaneous liver metastasis model

研究代表者

山本 高正(YAMAMOTO, TAKAMASA)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60884088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腸癌自然肝転移をきたす遺伝子改変マウスの作成を試みた。すなわち、Kras+/LSL-G12Dマウス、Pten(flox/flox)マウス、腸上皮細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するVillin-Creマウスを交配し、Kras+/LSL-G12D Pten(flox/flox) Villin-Creマウス(KPVマウス)を作成した。KPVマウスは29週で腸由来の肝転移をきたすことが確認された。KPVマウスの腸正常粘膜、腸癌、正常肝、肝転移巣の遺伝子発現を比較したところ、肝転移巣ではCsf2, Csf3/Gcsf, Pdgfb, Bv8/Prok2の発現が高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は癌死亡原因の上位を占め、肝臓に転移しやすい。今回我々が作成した腸癌自然肝転移マウス(KPVマウス)は従来多くの研究で使用されてきた移植モデルと比較して大腸癌の臨床像をより正確に模倣すると考えられる。また、本マウスモデルの肝転移巣ではCsf2, Csf3/Gcsf, Pdgfb, Bv8/Prok2等のサイトカインや血管新生因子の発現が亢進していた。今後、転移の成立、転移巣の増殖過程においてこれらの因子が果たす役割を明らかにする事ができれば、これらの因子が大腸癌肝転移治療のターゲットとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to generate genetically engineered mouse models, which develop spontaneous liver metastases derived from intestinal tumor. We established mice with Kras+/LSL-G12D and Ptenflox/flox transgene driven by villin-Cre (KPV mice). We confirmed that KPV mice developed liver metastases derived from intestinal epithelial cells. Metastatic liver tumors showed the up-regulation of Csf2, Csf2/Gcsf3, Pdgfb, Bv8/Prok2, compared with normal intestinal epithelium, intestinal tumors, and normal liver.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌肝転移 自然肝転移マウスモデル 腫瘍微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は癌死亡原因の上位を占める。大腸癌は肝臓に転移しやすく、患者の予後を向上させる上で、大腸癌肝転移のメカニズムの解明とそのコントロールは極めて重要である。大腸癌の進展メカニズムの1つとして、腫瘍とその周囲に存在する間質細胞がネットワークを構築し、腫瘍の生存、進展に有利な環境を形成していることがわかってきた。大腸癌肝転移においても腫瘍周囲の微小環境の変化が転移の進展に関与する可能性があると推察される。

ヒトの疾患を模倣するマウスモデルは疾患メカニズムの解明、新規薬剤の開発に寄与してきた。大腸癌自然肝転移を形成する遺伝子改変マウスモデルは免疫正常マウスを使用するため腫瘍微小環境の詳細な解析が可能である。また原発巣の増殖・浸潤から転移に至る一連の自然な進展過程を観察できる。しかし、腸癌自然肝転移モデルの報告は散見されるものの、その転移成立頻度が低いことから、大腸癌自然肝転移モデルを用いた腫瘍微小環境に関する研究が少ないのが現状である。自然肝転移をきたすと報告されているこれまでのモデルの肝転移率は10-40%である。Davies Eらは、 $Kras^{+/LSL-G12V}$ 、 $Pten^{(flox/flox)}$ 、 $Villin-Cre^{ERT2}$ (6-12週でCreを誘導)の遺伝子変異を有するマウスの25.9%(7/27)が肝転移をきたすと報告している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、移植モデルと比較して臨床像をより正確に模倣する大腸癌自然肝転移モデルを確立し、同モデルを用いて大腸癌肝転移の分子機序を明らかにすることである。将来的には肝転移治療のターゲットを同定し新薬創出の可能性を探る。大腸癌肝転移のメカニズムを明らかにする事で、大腸癌肝転移を制御できれば患者の予後を大きく向上させることが可能である。

### 3. 研究の方法

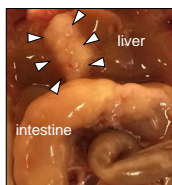
大腸癌ではKras、Pten、p53などの遺伝子変異による下流シグナルの異常が発癌、腫瘍の増殖と密接に関連することが知られている。これらの遺伝子変異を組み合わせることで遺伝子改変マウスを作成する。すなわち、 $Kras^{+/LSL-G12D}$ マウスと $p53^{(flox/flox)}$ マウス、 $Kras^{+/LSL-G12D}$ マウスと $Pten^{(flox/flox)}$ マウスを交配し、さらに腸上皮細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するVillin-Creマウスを交配する。交配によって得られる $Kras^{+/LSL-G12D}p53^{(flox/flox)}Villin-Cre$ マウス(Kp53Vマウス)、 $Kras^{+/LSL-G12D}Pten^{(flox/flox)}Villin-Cre$ マウス(KPVマウス)の腸癌、肝転移巣からRNA等のサンプルを抽出してその発現を比較する。本研究では特にサイトカイン、ケモカイン、血管新生因子に注目して解析を進め肝転移巣周囲の微小環境の特性を明らかにする。

### 4. 研究成果

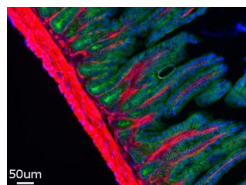
#### (1) 遺伝子改変マウスの作成

申請者はDavies Eらのモデルに若干の改良を加えたマウスモデルを作成した。すなわち、Kras変異を $Kras^{+/LSL-G12V}$ から $Kras^{+/LSL-G12D}$ に、Creリコンビナーゼの発現6~12週の限定的な発現から永続的発現に、さらにレポーター遺伝子のGt(ROSA26)ACTB-tdTomato-EGFPを加え、 $Kras^{+/LSL-G12D}Pten^{(flox/flox)}Gt(ROSA26)ACTB-tdTomato-EGFP$  Villin-Cre (KPVマウス)を作成した。同遺伝子変異を有するマウスは29週の時点で肝腫瘍を有することを確認した(図1)。肝腫瘍が腸由来の転移性腫瘍であることを腸管・肝腫瘍サンプルを用いた蛍光免疫染色により確認した(図2,3,4)。

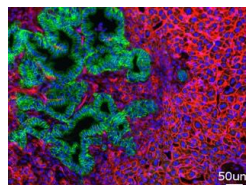
Kp53Vマウスに関しては、現在作成中で、生後半年の時点では特に死亡例なく経過しており、腫瘍形成などの評価はできていない。



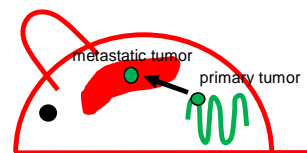
(図1)



(図2)



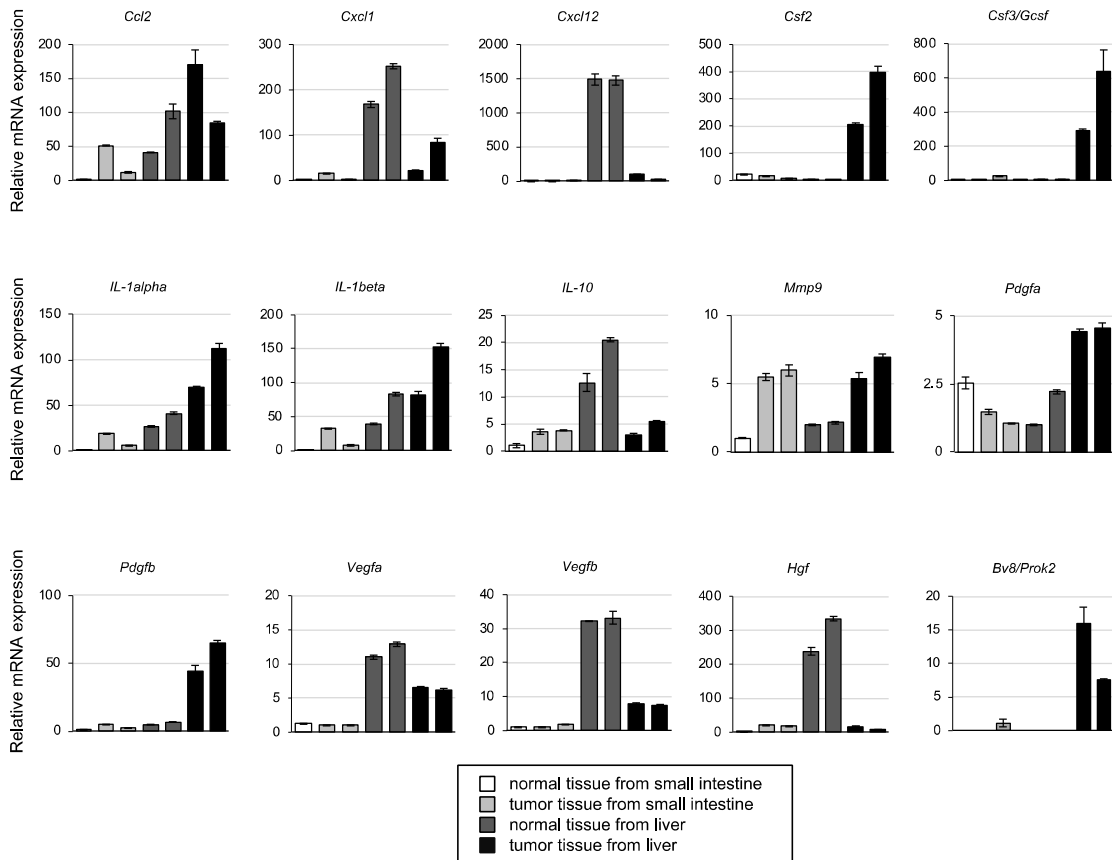
(図3)



(図4)

#### (2) 肝転移巣における遺伝子発現

前述(1)で作成したKPVマウスの腸癌、肝転移サンプルからRNAを抽出し、qPCRによって腸癌、肝転移巣の遺伝子発現を比較した。肝転移巣では腸正常粘膜、腸癌、正常肝と比較して*Csf2*、*Csf3/Gcsf*、*Pdgfb*、*Bv8/Prok2*の発現が高値であった(図5)。



(図5)

以上をまとめると、KPV マウスでは腸由来の自然肝転移が成立した。また肝転移巣においては *Csf2*, *Csf3/Gcsf*, *Pdgfb*, *Bv8/Prok2* の発現が亢進しており肝転移治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------