

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：86301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21592150

研究課題名(和文) TGF- α トランスジェニックマウスを用いた子宮頸癌発生メカニズムの解明研究課題名(英文) Uterine cervical carcinogenesis in TGF- α transgenic mice

研究代表者

白山 裕子 (Shiroyama, Yuko)

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター(臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：60397982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌の病因としてHPV(human papilloma virus)の関与は既に明らかとなり、子宮頸癌の約90%にHPV感染が認められる。しかし、HPV感染者のほとんどは子宮頸癌を発生することはなく、HPV感染と同時に存在する発癌関連遺伝子の異常が近年重要と考えられている。本研究においてわれわれは、子宮頸癌の10-50%に過剰発現している増殖因子TGF- α に注目し、子宮頸部にTGF- α が過剰発現している遺伝子改変マウスを作製した。同マウスにおいて38%の頻度で子宮頸部上皮内腫瘍が発生していることを明らかにし、子宮頸癌発生におけるTGF- α の関与を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：HPV(human papilloma viruses)-infection appears to be insufficient for carcinogenesis, because most lesions in human cervical squamous epithelium containing high-risk HPVs do not progress to invasive carcinoma. The other genetic alterations in addition to HPV-infection may be also important for cervical carcinogenesis. TGF- α overexpression is observed in 10-50% of cervical cancers. In this study, we examined the impact of elevated TGF- α in cervical epithelium of TGF- α transgenic mice. The incidence of cervical intraepithelial neoplasias (CINs) was 38% (6/16) in TGF- α transgenic mice. Invasive carcinoma was not observed. These findings suggest that constitutive expression of TGF- α and activation of the epidermal growth factor receptor in epithelium of uterine cervix may play an important role in tumorigenesis in this tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮頸癌 動物モデル トランスジェニックマウス 腫瘍発生 TGF-

1. 研究開始当初の背景

(1)子宮がん検診の普及および治療法の確立により進行子宮頸癌の頻度は減少し、死亡率はこの40年間で約1/3になった。しかし、依然として子宮頸癌は婦人科悪性腫瘍の中でも最も頻度が高い疾患である。子宮頸癌の病因としてHPV (human papilloma virus) の関与は既に明らかとなり、子宮頸癌の約90%にHPV感染が認められる。しかし、HPV感染者のほとんどは子宮頸癌を発生することはなく、またHPV16あるいはその転写産物であるE6/E7トランスジェニックマウス (Tgマウス) においても子宮頸部病変は異形成にとどまり、浸潤癌は発生しない。そこで、HPV感染と同時に存在する発癌関連遺伝子の異常が近年重要と考えられている。現在のところ子宮頸癌との関係が議論されている遺伝子としてはEGF-R (epidermal growth factor receptor) , c-erbB2/HER2, c-myc, ras等があり、癌抑制遺伝子としてはp53が報告されているが、子宮頸癌発生メカニズムについてはいまだ解明されていない。

(2)また、悪性腫瘍に限らず各疾患の動物モデルは病態解明のために非常に有用であり、近年、遺伝子操作技術の発達とともにTgマウスやノックアウトマウス (Koマウス) などの遺伝子改変マウスが動物モデルとして汎用されている。しかし、現在のところ子宮頸癌において有用な動物モデルは存在せず、その開発が望まれている。

(3)われわれはこれまでに種々の発癌関連遺伝子 (c-src, c-erbB2, IGF-1, E2F1) のTgマウスを作成し、これらのマウスにおいて皮膚癌、胆嚢癌、前立腺癌などが発生することを明らかにしてきた (Mol Carcinog 40;189-200, 2004, Oncogene 22;5415-5426, 2003, Proc AACR 43;1549, 2002, Mol Carcinog 33;146-155, 2002, Cancer Res 61;6971-6976, 2001, Oncogene 19;4243-4254, 2000, Cancer Res 60;1561-1570, 2000, Proc Natl Acad Sci

USA 97;3455-3460, 2000)。婦人科領域の腫瘍では、転写因子であるE2F1を過剰発現させたマウス (E2F1 Tgマウス) において子宮頸癌が発生していることを明らかにし (Oncogene 22;5415-5426, 2003, 平成15・16年度科学研究費/基盤C), 癌遺伝子であるc-src を過剰発現させたマウス (src Tgマウス) において子宮頸癌が発生していることを見出した (Proc AACR, 45;5106, 2004, 平成17・18年度科学研究費/基盤C)。また、増殖因子であるIGF-1を過剰発現させたマウス (IGF-1 Tgマウス) における子宮頸部病変は上皮内腫瘍にとどまるが、各種癌抑制遺伝子 (p53, PTEN, Bax) の機能を抑制することで、病変の発生頻度が増加し、浸潤癌も発生することを明らかにした (平成20~23年度科学研究費/基盤C)。(4) TGF- β は構造的にも機能的にもEGFに類似し、EGF-Rのligandとして正常の成長・発達を調節している。また、TGF- β は腫瘍発生にも関与し、いくつかのTGF- β Tgマウスの乳腺・膵臓・肝臓に腫瘍が発生する。さらに、子宮頸癌の10-50%にTGF- β の過剰発現が認められる。

本研究はこれらの研究成果および背景を踏まえて計画したものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TGF- β Tgマウスにおける正確な子宮頸癌発生頻度をまず解析し、子宮頸癌組織におけるTGF- β 関連分子の発現を正常マウス子宮頸部組織と比較することで、この動物モデルにおける子宮頸癌発生のメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) TGF- β Tgマウスにおける子宮頸癌発生頻度の解析

TGF- β Tgマウスを交配・繁殖させることで150匹のマウスを飼育し、6ヶ月、12ヶ月および18ヶ月と経時的に50匹ずつ安楽死させ、

雌性生殖器官を採取する。繁殖の際には tail DNA を抽出し、PCR により genotype を確認する。同時に 150 匹の野生型姉妹マウスを飼育し、同様に解析する。採取した組織より病理組織標本 (H&E 染色) を作製し、子宮頸癌の発生頻度を解析する。病理診断は複数の病理医によるブラインドの診断を行う。

(2) TGF- Tg マウスにおける子宮頸癌の病理組織学的解析

(1) で作製した組織標本を使用し TGF- 関連分子を免疫組織化学染色により解析する。

(3) TGF- Tg: マウスにおける子宮頸癌の分子生物学・生化学的解析

TGF- Tg マウスを交配・繁殖させることで 60 匹のマウス (NxF1) を飼育し 6 ヶ月、12 ヶ月および 18 ヶ月と経時的に 20 匹ずつ安楽死させ、雌性生殖器官を採取する。採取した組織より genomic DNA, mRNA, protein を精製し TGF- 関連分子を分子生物学的手法 (RT-PCR, real time PCR, Northern blot analysis, Western blot analysis, cDNA microarray 等) により解析する。同時に 60 匹の野生型姉妹マウスを飼育し同様に解析する。

* 上記 (1) ~ (3) の実験は従来われわれが行ってきた方法で遂行する (Mol Carcinog 40;189-200, 2004, Cancer Res 63;4819-4828, 2003, Oncogene 22;5415-5426, 2003, Mol Carcinog 33;146-155, 2002)。

4. 研究成果

TGF- Tg マウスを作製する際に使用した DNA construct を図 1 に示す。

図1 TGF-αトランスジェニックマウス作成のためのDNA construct



プロモーターとして用いたケラチン 14 (K14) の雌性生殖器官での発現を図 2・3 に示す。K14 の発現は子宮頸部扁平上皮には認められるが、子宮頸部円柱上皮には認めない。また、扁平上皮円柱上皮接合部の予備細胞にも発現を認める。子宮内膜、卵巢表層上皮には発現をみない。

図2 ケラチン14の雌性生殖器官における発現①

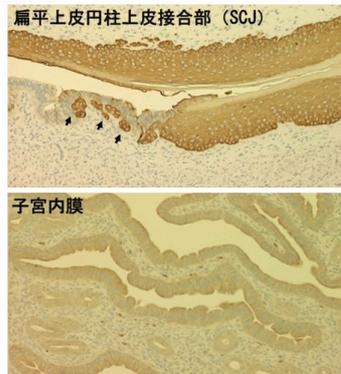


図3 ケラチン14の雌性生殖器官における発現②

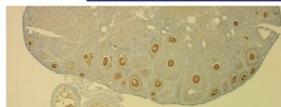


図4 各種扁平上皮マーカーの雌性生殖器官における発現

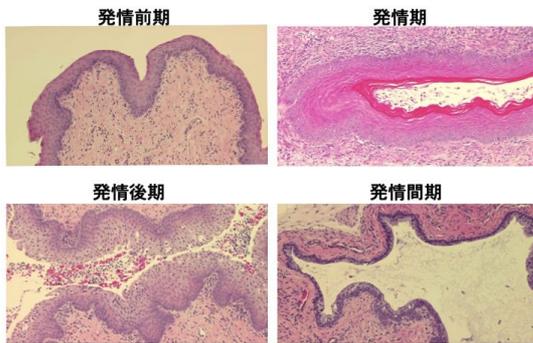
	K1	K5	K6	K8	K14	Loricrin
子宮頸部/腔・扁平上皮	+	+	+	-	+	+
扁平上皮-円柱上皮接合部・予備細胞	-	+	-	-	+	-
子宮頸部・円柱上皮	-	-	-	+	-	-
子宮内膜上皮	-	-	-	+	+	-
卵巢表層上皮	-	-	-	+	-	-

図4 各種扁平上皮マーカーの雌性生殖器における発現

	K1	K5	K6	K8	K14	Loricrin
子宮頸部/腫・扁平上皮	+	+	+	-	+	+
扁平上皮-円柱上皮接合部・予備細胞	-	+	-	-	+	-
子宮頸部・円柱上皮	-	-	-	+	-	-
子宮内膜上皮	-	-	-	+	+	-
卵巣表面層上皮	-	-	-	+	-	-

正常子宮頸部上皮を図5に示す。子宮頸部上皮は発情周期により形態学的に劇的に変化する。

図5 子宮頸部上皮における発情周期による変化



TGF- α Tg マウスにおいて自然発生する子宮頸部上皮内腫瘍3度 (CIN3) とその頻度を図6-8に示す。TGF- α Tg マウス(12ヶ月齢)における子宮頸部病変は上皮内にとどまり、その頻度は38% (6/16)であった。

図6 TGF- α トランスジェニックマウスにおける子宮頸部病変①

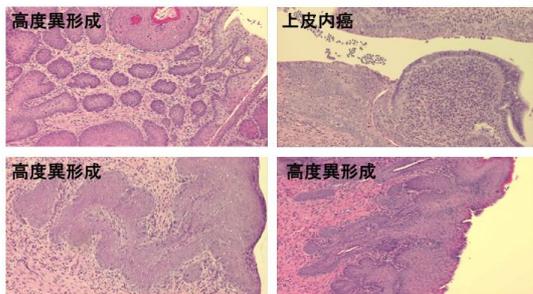


図7 TGF- α トランスジェニックマウスにおける子宮頸部病変②

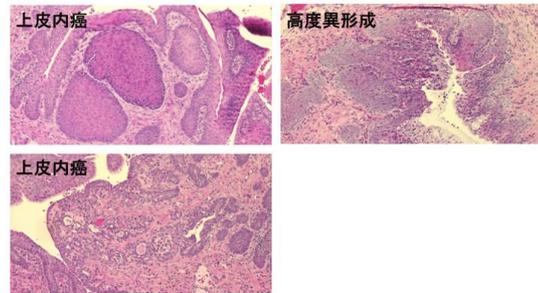


図8 TGF- α トランスジェニックマウスにおける子宮頸部病変の発生頻度

	上皮肥厚	CIN 3
Nontransgenic mice	0/10 (0%)	0/10 (0%)
Transgenic mice	13/16 (81%)	6/16 (38%)

CIN 3, severe dysplasia + carcinoma in situ (CIS).

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)

[学会発表](計 6 件)

Takashi Matsumoto, Takayoshi Nogawa, Takashi Yokoyama, Yuko Shiroyama, Atsumi Kojima, Shin-Ichi Okame, Katsuyuki Tomono. Uterine cervical carcinogenesis in E2F1 transgenic mice. 65th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. May 10, 2013, Sapporo.

Takashi Matsumoto, Masamichi Hiura, Takayoshi Nogawa, Atsumi Kojima, Shin-Ichi Okame, Yuko Shiroyama, Takashi Yokoyama, Kazuo Miyoshi. Overexpression of E2F transcription factor 1 in epithelium of uterine cervix results in development of squamous cell carcinoma in transgenic mice. 64th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. August 13, 2012, Kobe.

Takashi Matsumoto, Yuko Shiroyama, Takashi Yokoyama, Takayoshi Nogawa, Masamichi Hiura, Kazuo Miyoshi, Overexpression of growth factors/oncogenes in epithelium of uterine cervix results in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in transgenic mice. 63th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. August 29, 2011, Osaka.

Takashi Matsumoto, Masamichi Hiura, Yuko Shiroyama, Junko Wroblewski, Hiroko Mise, Takashi Yokoyama, Takayoshi Nogawa, Kazuo Miyoshi. Impact of deficiency of tumor suppressor genes on tumor development in uterine cervix of IGF-1 transgenic mice. 62th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. April 23, 2010, Tokyo.

Takashi Matsumoto, Kaoru Kiguchi, Linda Beltran, Kazuo Miyoshi, Katsumi Kito, Takayoshi Nogawa, Masamichi Hiura, Norifumi Ueda, John Digiovanni. Impact of p53 deficiency on development of tumors in uterine cervix of IGF-1 transgenic mice. 100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research. April 22, 2009, Denver.

Takashi Matsumoto, Masamichi Hiura, Yuko Shiroyama, Junko Wroblewski, Takashi Yokoyama, Takayoshi Nogawa. Impact of bax deficiency on tumor development of uterine cervix in IGF-1 transgenic mice. 61th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. April 3, 2009, Kyoto.

6. 研究組織

(1)研究代表者

白山 裕子 (SHIROYAMA YUKO)
独立行政法人 国立病院機構 四国がんセンター 臨床研究センター がん診断治療開発部 がん治療開発室・室長
研究者番号：60397982

(2)研究分担者

松元 隆 (MATSUMOTO TAKASHI)
愛媛大学 医学系研究科・講師
研究者番号：20346670

井口 東郎 (IGUCHI HARUO)
独立行政法人 国立病院機構 四国がんセンター 臨床研究センター・センター長
研究者番号：90393438

植田 規史 (UEDA NORIFUMI)

愛媛大学医学研究科・教授

研究者番号：30030886

(H 2 1)

杉田 敦郎 (SUGITA ATSURO)

愛媛大学 医学部附属病院・准教授

研究者番号：60179140

(H 2 2～H 2 3)