

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08760

研究課題名（和文）実用化可能な新たな革新的バレット食道腺癌モデルの開発

研究課題名（英文）Novel Animal Model of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma

研究代表者

矢野 文章 (Yano, Fumiaki)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80318005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：バレット食道腺癌の発達にはp63遺伝子欠損が関与することが報告されている。p63は上皮細胞の分化・増殖・維持の制御に重要な役割を担っている。p63K0マウスは消化管粘膜に障害を来すため長期生存不能である。今回、申請者らはp63 conditional knockoutマウスを作成し、飼育、繁殖させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バレット食道腺癌は本邦において増加傾向にあることが報告されており、実験モデルの確立が喫緊の課題となっている。p63遺伝子欠損はバレット食道腺癌の発達に重要な因子であることが報告されているものの、これまで長期生存可能な動物モデルは存在しなかった。したがって、本研究でp63ck0マウスの作成に成功したことは、病態解明や治療薬の開発の基盤となり得るため学術的にも社会的にも意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：Deficiency of p63 gene is reported to be associated with development of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. p63 gene has an important role in differentiation, proliferation, and maintenance of epithelial cells. p63K0 mouse cannot survive due to mucosal damage in the alimentary tract. In this study, we created p63 conditional knockout mice, and confirmed successful captive breeding.

研究分野：食道疾患

キーワード：バレット食道 食道腺癌 遺伝子改変

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は集学的治療の発展にもかかわらず未だ予後が悪い癌であり、本邦における5年生存率は36%程度である。食道癌による年間死者数は1万人以上と推計されている。組織学的に主として扁平上皮癌と腺癌の2つに分類されるが、扁平上皮癌が国際的にも90%以上を占める。しかしながら、近年、欧米を中心に食道腺癌の発生率は急激に上昇しており、本邦においては食道腺癌の発生率が1995年時の4倍以上にまで増加している。食道腺癌は食道粘膜が円柱上皮に置き換えられる病態であるバレット食道から生じることが知られている。バレット食道は胃食道逆流症(GERD)が原因となるが、本邦ではヘリコバクターピロリ除菌によってGERDが劇的に増加しており、これが食道腺癌発生率の上昇の背景因子の1つと考えられている。したがって食道腺癌は日本の医療が抱える大きな課題の1つとなりつつある。

食道腺癌は化生-異形成-発癌の過程を通じて生じ、临床上はGERD-バレット食道-食道腺癌の順で発達していくが、その分子生物学的機序は未だ不明点が多い。したがって、食道腺癌領域の病態解明や治療法の発展には動物モデルの開発が必要である。これまでに遺伝子改変マウスを用いたバレット食道-食道腺癌モデルがいくつか報告されているが(Wang X, et al.

Cell. 2011; Quante M, et al. Cancer Cell. 2012)、①発癌物質の投与を要することや②GERDを来さないこと、③食道ではなく前胃に病変が生じることより、十分にヒトの病態を模しているとは言い難い。また発癌までに2年程度を要するため、実験モデルとしては理想的ではない。

GERD-バレット食道-食道腺癌の発達過程には胆汁酸の食道内への逆流が強く関与していると考えられている。胆汁酸逆流の実験モデルは食道と腸管の吻合により作製されるが、④食道粘膜を直接傷害し腸上皮を細胞レベルで食道粘膜に移植しているため、ヒトにおいて想定されている正常食道粘膜への胆汁酸逆流を再現できていない。また⑤マウスを用いた腸管吻合は技術

的に難易度が高いことも欠点である。

## 2. 研究の目的

食道粘膜を傷害することなく、より簡便な手術手技により遺伝子改変マウスに胆汁酸逆流を誘発させ、短期間でバレット食道-食道腺癌を発生させる理想的な実験モデルを作製すること。

### 3. 研究の方法

p63 conditional knockout マウスを作製し、飼育・繁殖させる。

目的遺伝子	Trp63
実施事項	精子ライブラリー Trp63 Conditional Knockout ホモマウス Customized breeding with K5-CreERT2
マウス系統	C57BL/6J
健康標準	SPF 級
供与核酸	Trp63 Conditional Knockout Vector; gRNA IRES-CreERT2 Knockin Vector
核酸供与体	無し
病原性等への関与	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 不明
組み換え生物の内容	マウス Trp63 遺伝子のコンディショナル欠損 (CRISPR/Cas9技術で作製)
拡散防止措置のレベル	P1A (遺伝子組換え生物等の第二種使用)

- ①24 時間の絶食後、イソフルラン麻酔下 (導入 : 4% , 維持 : 2% ) a)にマウスの上腹部を約 1.5 cm 開腹し、前胃・腺胃境界部 (limiting ridge) を 2-0 絹糸で結紮する (His 角の破壊)。
- ②胃食道接合部に約 4mm の筋層切開を粘膜損傷を避けつつ置き、噴門が拡張するように 7-0 ポリプロピレンで切断面を縫合する。
- ③さらに Finney 幽門形成を行い十二指腸液 - 胃逆流を誘導する。
- ④コントロール群として p63<sup>-/-</sup>マウスの sham operation と野生型の sham operation を作製する。
- ⑤実験開始 1 カ月後、3 カ月後、6 カ月後、9 カ月後、12 カ月後に頸椎脱臼により安楽死させる。
- ⑥手術創を上下に延長し、頸部から下腹部に至るまで切開を加え、幽門から頸部食道までを摘出し評価を行う。検体は局所排気装置のある作業場で 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて 24 時間固定し、各標本の写真撮影を行う。なお、ホルマリン溶液は実験廃液の分別収集区分にしたがって廃棄する。

#### 【評価項目】

生存率、食道炎発生率と発生までの期間、バレット食道発生率と発生までの期間、食道腺癌発生率と発生までの期間、病理組織学的評価、免疫組織学的評価 (Cldn3、Krt7、Krt8、Car4、IL-1、IL-6)。

### 4. 研究成果

今回、Trp63 conditional knockoutホモマウス (Trp63(flox/flox),K5-CreERT2) を作製し、繁殖させることに成功した。

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
研究分担者	増田 隆洋  (Masuda Takahiro)  (40649092)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教   (32651)	
研究分担者	藤崎 宗春  (Fujisaki Muneharu)  (50597979)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教   (32651)	
研究分担者	西川 勝則  (Nishikawa Katsunori)  (70246429)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授   (32651)	
研究分担者	高橋 慶太  (Takahashi Keita)  (70795096)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教   (32651)	
研究分担者	谷島 雄一郎  (Tanishima Yuichiro)  (80385335)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教   (32651)	
研究分担者	池上 徹  (Ikegami Toru)  (80432938)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授   (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宇野 耕平 (Uno Kohei) (80899386)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教  (32651)	
研究分担者	坂下 裕紀 (Sakashita Yuki) (80911586)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教  (32651)	
研究分担者	小林 毅大 (Kobayashi Takehiro) (10899868)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教  (32651)	

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