

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390257
 研究課題名（和文）新規大腸癌転移マウスモデル実験系の構築と臓器特異的転移関連バイオマーカーの同定
 研究課題名（英文）Establishment of the novel mouse model of metastatic colorectal cancer and identification of the biomarker for tissue-specific metastasis
 研究代表者
 檜井 孝夫（HINOI TAKAO）
 広島大学・病院・講師
 研究者番号：10444689

研究成果の概要（和文）：

大腸癌関連遺伝子の複合的変異をもつマウスモデルを作製し以下の成果をえた。(1) 腫瘍の発生に関する条件設定ができた。(2) 細径内視鏡による腫瘍の観察が可能であった。(3) 特定の薬剤が腫瘍の増大スピードに与える影響を解析可能であった。(4) 変異型 KRAS を持つマウスの作製をおこない、KRAS による遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。以上の成果から、大腸癌の個別化医療に有用なマウスモデルの確立ができた。

研究成果の概要（英文）：

We generated novel mouse model with complex mutation of colorectal cancer-related gene. (1) The appropriate condition for tumor development was optimized. (2) Observation of the tumor by micro-endoscope was performed. (3) Effect of the specific medication on the tumor growth was analyzed. (4) After establishment of the mouse model with K-ras mutation, comprehensive gene profiling analysis of K-ras signaling was performed and its target gene was identified. In conclusion, useful mouse model for the individualized medication of colorectal cancer was established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景
進行大腸癌では外科的切除が基本であり、根治術が可能であれば比較的予後が良好である。一方、遠隔転移症例では、新規抗癌剤の開発により生存期間の延長を認めるが、5年生存率は未だに低い。分子標的薬の出現により、腫瘍の遺伝子プロファイルから有効な治療を選択するオーダーメイド治療が現実となりつつあるが、adenoma-carcinoma sequenceによる複合的な遺伝子変異により転移能を獲得した腫瘍の生物学的動態や予後を反映する有用なバイオマーカーは同定されていない。近年の遺伝子改変マウス技術の進歩により、臓器特異的なノックアウトマウスであるコンディショナル・ノックアウトマウスの作製が可能となったが、大腸上皮に特異的なプロモーターが同定されておらず、大腸癌マウスモデルは確立されなかった。このような状況下において、私は1998-2006年の間、adenoma-carcinoma sequenceの提唱者であるミシガン大学のDr. Fearonの研究室において、消化管癌における腸上皮特異的ホメオボックス転写因子CDX2についての研究に一貫して従事し、CDX2をバイオマーカーとした未分化大腸癌LCMDCの同定(文献1)、およびCDX2の異常発現による胃の腸上皮化生について報告した(文献2,3,5)。同時にCDX2プロモーター領域から大腸上皮に特異的な転写活性をもつ9.5 kbの遺伝子配列(CDX2P9.5)を同定し(文献4)、Cre/loxPシステムを利用して2種類の自然発生型の大腸浸潤癌マウスモデルを確立した(右上写真、四角内と矢印が大腸浸潤癌、三角は小腸腺腫)。一つはApcのヘテロ変異体により遠位大腸に高分化型腺癌(浸潤癌)を発生する左側結腸癌モデル(*Cancer Res* 2007,文献6)、もう一つはマイクロサテライト不安定性による発現誘導プロモーターを利用してApcをノックアウトし、近位大腸に浸潤癌が発生する右側結腸癌モデル(*Nature Method* 2008,文献7)である。しかしながら、これら2種類のマウスでは遠隔転移が認められなかった。これらの腫瘍ではマイクロサテライト安定性であり、spectral karyotype(SKY)解析では、

染色体転座はなく、染色体不安定性によるaneuploidyを認めた。またp53やKrasなどのadenoma-carcinoma sequenceに関連した遺伝子変異も認められなかった。これらの知見から、転移能をもつ悪性度の高い腫瘍が自然発生するマウスモデルの作製には、Apcと他の大腸癌関連遺伝子(p53, KRAS, TGFβ2型受容体、PTEN)あるいは未知の転移関連遺伝子との複合的遺伝子変異が必要であることが示唆された。

2. 研究の目的

マウス実験系の確立と解析：Apc+既知の大腸癌関連遺伝子(p53, KRAS, TGFβ2型受容体、PTENなど)の変異、またはApc+化学発癌物質の投与によるランダムな遺伝子変異、により大腸上皮特異的に複合的遺伝子変異を導入し、遠隔転移マウスモデルを確立する。変異の組み合わせによる浸潤、転移の発現型を病理形態学的に解析し、腫瘍の生物学的動態をサブクラス分類するとともに、これらの腫瘍を網羅的に遺伝子解析し、各サブクラスにおける遺伝子プロファイルの特徴を解析する。転移臓器別のバイオマーカーの候補遺伝子を30-60個まで絞り込む。

転移モデル実験系での検証：30-60個のバイオマーカー候補遺伝子について、大腸癌細胞株での遺伝子導入やsiRNA抑制により培養細胞株での発現型を検証し、ヌードマウスでの異種移植を使ったin vivo実験モデルにおいて検討を行う。転移臓器特異性については、理研やJackson labなどのバイオリソースから候補遺伝子のloxPマウスを入手し、大腸浸潤癌モデルと交配させて、転移能獲得と転移臓器の再現性について検証する。

ヒトの進行大腸癌での有用性の検討：マウスモデルで得られた転移関連のバイオマーカー候補遺伝子について、がん拠点病院での症例でパイロットスタディ後、膨大な臨床症例のデータベースをもつ中四国がん臨床研究支援機構における多施設による臨床研究(疫学研究)により、進行大腸癌手術症例での大規模な検証を行い、臨床で真に有用なバイオマーカーを同定する。

3. 研究の方法

(概略) 本研究では、私共が確立した自然発生による大腸癌浸潤 Apc ノックアウトマウスモデルに複合的大腸癌関連遺伝子異常またはランダムな遺伝子変異を導入し、大腸癌転移モデルを作製する。転移臓器別の遺伝子プロファイリングを作製し、腫瘍のサブクラス分類を行うとともに、それらのバイオマーカー候補遺伝子を同定する。網羅的遺伝子解析では、約 3 万個の遺伝子から約 30-60 個 (約 0.1-0.2%) の候補遺伝子を(一次)スクリーニングする。次に、培養細胞株を使った細胞実験系 (二次スクリーニング) および転移動物モデル実験系 (三次スクリーニング) を用いて、候補遺伝子を 5-10 まで絞り込む。2ヶ所のがん拠点施設 (広島大学、中国がんセンター) での症例で retrospective に検証し、候補遺伝子を 5 個以下に絞る。中四国がん臨床研究支援機構を通して多施設での臨床研究を行い、臨床応用可能な転移臓器別バイオマーカーを同定する。

(1)マウス大腸癌転移モデルの作製

D)マウスの腫瘍発育条件の検討と組織の回収 : CPC;Apc マウスと CDX2P-G22-Cre;Apc マウスと交配して新たに作製する複合遺伝子改変マウスは、実験マウス 30 匹、コントロールマウス 30 匹を交配により準備した。実験開始後、経時的にマウスの体重測定、血清を回収し、3、6、12ヶ月目に 10 匹ずつ屠殺し、転移形式を観察し腫瘍を摘出後、RNA 検体、DNA 検体、免疫組織染色用に検体を回収した。発癌形式に特異性のあるモデルを再度、30 匹程度作製し、転移の再現性を確認するとともに、今後、確立した大腸癌転移モデルとして使用可能とするために、十分なデータの収集、解析を行った。

2)マウス大腸癌転移モデルのサブクラス分類と遺伝子プロファイリング (一次スクリーニング)

転移臓器、悪性度に応じて腫瘍をサブクラス分類する。それぞれのサブクラスから 3-5 検体を選択し、転写産物の発現プロファイルを網羅的遺伝子解析用の DNA チップ (Affymetrix の Mouse Gene 1.0 ST Array、28,853 個の遺伝子をスクリーニング可能) を用いて解析を開始する。マイク

ロアレー (DNA チップ) を用いたデータシートから、大腸癌浸潤・転移モデルを実験群とし、発現の変動の大きいものから転移臓器別の転移関連候補遺伝子 30-60 個を抽出する。網羅的解析で得られた結果を、quantitative PCR 法により、RNA サンプルで検証する。抗体があるものについては、病理組織検体を使って免疫組織染色を行い、網羅的解析で得られたデータの追試を行う。3)浸潤・転移関連バイオマーカー候補遺伝子の検証 (二次スクリーニング)

網羅的遺伝子解析と quantitative PCR により、腫瘍から得られた転写産物が転移組織で有意に変化している候補遺伝子を培養細胞株で発現誘導または発現抑制し、in vitro の実験により、それぞれの候補遺伝子の転移能に与える影響を検証する。遺伝子制御法として、siRNA による一過性または安定的発現抑制細胞株を作製する。または、レトロウイルスベクターによる候補遺伝子発現導入株を作製する。

(2)ヒトの病理検体での検証

1)がん研究拠点施設におけるパイロットスタディ : 当施設と中国がんセンターでの手術症例を使ったパイロットスタディを行う。各転移臓器 (肝、肺、リンパ節、その他) について 50 症例ずつ、バイオマーカー候補遺伝子の解析 (遺伝子変異解析と免疫染色組織染色による蛋白質発現解析) を行う。データベースからの患者背景と、バイオマーカー候補遺伝子の遺伝子解析および免疫組織染色により、遺伝子プロファイリングを行い、候補遺伝子を 5 個以下まで絞る。

2) 多施設での臨床研究による検証

私共が事務局をもつ中四国癌臨床研究支援機構または広島臨床腫瘍外科研究グループにおいて、本研究で絞り込まれた各転移臓器のバイオマーカー候補遺伝子 (5 個) について、多施設による臨床研究により、転移関連バイオマーカーとしての有用性について検討する。

4. 研究成果

私共が作製した大腸上皮特異的 Apc コンディショナル・ノックアウトマウスを応用して、大腸癌関連遺伝子に複合的変異をもつマウスを作製し、発癌から浸潤・転移までの過程を生理的条件下で再現した

マウスモデル実験系を構築し以下の成果を得た。(1) Apc 欠損マウスにおいて、腫瘍の発生に関する条件設定、細径内視鏡による腫瘍のリアルタイムでの観察などをおこなった。この成果により、Apc 欠損マウスにおける薬剤投与が腫瘍の増大スピードに与える影響を解析することが可能となった。また腫瘍増大促進因子の投与により、腫瘍の増大促進小効果が確認できた。いずれの実験においても、統計学的に有意な差をもって再現性のあるデータを得る事に成功し、これらのマウスをつかった薬剤や有害物質のスクリーニングを可能とするモデルが確立された。(2) Apc 欠損+既知の大腸癌関連遺伝子(変異型 KRAS, 変異型 TGF β 2 型受容体、PTEN 欠損など)の変異を加えたマウスの確立に成功した。変異型 KRAS 以外は、現在も腫瘍組織の回収を行っている途中であり、今後のプロジェクトとして継続する。(3) Apc 欠損+KRAS 変異型マウスで発生した腫瘍と Apc 欠損マウスの腫瘍の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析して、変異型 KRAS による標的遺伝子の同定をおこなった。これらのうち、既に大腸癌細胞株をつかった実験で同定された遺伝子について、マウスモデルでも変異型 KRAS の標的遺伝子であることが確認された。またヒトの臨床検体でもその現象が確認された。(4) Apc 欠損+KRAS 変異型マウスにおいて、浸潤性の高い phenotype をもつ腫瘍発生モデルの作製に成功した。現在、腫瘍検体を回収しており、従来の浸潤性が低い phenotype をもつ腫瘍との網羅的遺伝子解析が現在継続中のプロジェクトである。

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 13 件)

1: Shimomura M, Hinoi T, Ikeda S, Adachi T, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Sasada T, Egi H, Tanabe K, Okajima M, Ohdan H. Preservation of peritoneal fibrinolysis owing to decreased transcription of plasminogen activator inhibitor-1 in peritoneal mesothelial

cells suppresses postoperative adhesion formation in laparoscopic surgery. *Surgery*. 2013

Mar;153(3):344-56. doi:10.1016/j.surg.2012.07.037. (査読有り)

2: Sakai H, Egi H, Hinoi T, Tokunaga M, Kawaguchi Y, Shinomura M, Adachi T, Arihiro K, Ohdan H. Primary lung cancer presenting with metastasis to the colon: a case report. *World J Surg Oncol*. 2012 Jun

28;10:127. doi:10.1186/1477-7819-10-127. (査読有り)

3: Naito Y, Que N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki, H, Yasui W. Reg IV is a direct target of intestinal transcriptional factor CDX2 in gastric cancer. *PLoS One*. 2012;7(11):e47545. doi:10.1371/journal.pone.0047545. (査読有り)

4: Mukai S, Takakura Y, Egi H, Hinoi T, Saito Y, Tanimine N, Miguchi M, Adachi T, Shimomura M, Ohdan H. Submucosal invasive micropapillary carcinoma of the colon with massive lymph node metastases: a case report. *Case Rep Oncol*. 2012 Sep;5(3):608-15. doi:10.1159/000345566. (査読有り)

5: Sakamoto N, Que N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Oo HZ, Hinoi T, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W. Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci*. 2012 Sep;103(9):1744-50. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02353.x. (査読有り)

6: Shimomura M, Okajima M, Hinoi T, Egi H, Takakura Y, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Adachi T, Tashiro H, Ohdan H. Identification of patients likely to benefit from metastasectomy in stage IV colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2012 Oct;27(10):1339-46. (査読有り)

7: Shimomura M, Ikeda S, Takakura Y, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Egi H, Hinoi T, Okajima M, Ohdan H. Adequate lymph

node examination is essential to ensure the prognostic value of the lymph node ratio in patients with stage III colorectal cancer. *Surg Today*. 2011 Oct;41(10):1370-9. doi: 10.1007/s00595-010-4446-2. (査読有り)

8: Takakura Y, Okajima M, Kanemitsu Y, Kuroda S, Egi H, Hinoi T, Tashiro H, Ohdan H. External validation of two nomograms for predicting patient survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *World J Surg*. 2011 Oct;35(10):2275-82. doi: 10.1007/s00268-011-1194-4. (査読有り)

9: Miguchi M, Takakura Y, Egi H, Hinoi T, Adachi T, Kawaguchi Y, Shinomura M, Tokunaga M, Okajima M, Ohdan H. Malignant peripheral nerve sheath tumor arising from the greater omentum: case report. *World J Surg Oncol*. 2011 Mar 21;9:33. doi:10.1186/1477-7819-9-33 (査読有り)

10: Matsuda M, Sentani K, Noguchi T, Hinoi T, Okajima M, Matsusaki K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oue N, Yasui W. Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. *Pathol Int*. 2010 Oct;60(10):673-80. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02587.x. (査読有り)

11: Takakura Y, Hinoi T, Oue N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W, Ohdan H. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6767-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4701. (査読有り)

12: Anami K, Oue N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Hinoi T, Okajima M, Graff JM, Yasui W. Search for transmembrane protein in gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with

intestinal phenotype. *J Pathol*. 2010 Jul;221(3):275-84. doi:10.1002/path.2717. (査読有り)

13: Shimomura M, Ikeda S, Takakura Y, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Takeda H, Sumitani D, Yoshimitsu M, Hinoi T, Okajima M, Ohdan H. Gastrointestinal stromal tumors of the small intestine in pediatric populations: a case report and literature review. *Pediatr Surg Int*. 2010 Jun;26(6):649-54. doi: 10.1007/s00383-010-2596-3. (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

1. Sasada T, Hinoi T, Oue H, Yasui W, et al, Chlorinated Drinking Water Alters Carcinogenesis in a Mouse Model of Colon Cancer, 6th International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC) Jan 6-8, 2011 Houston TX USA
2. Sasada T, Hinoi T, et al, Chlorinated Drinking Water Alters Carcinogenesis in a Mouse Model of Colon Cancer . AACR Annual Meeting 2012, March31-April 4, 2012 Chicago IL USA
3. Kawaguchi Y, Hinoi T, Sasada T, Adachi T, Saito Y, Miguchi S, Niitsu H, Ohdan H, Oncogenic *K-ras* mutation associates with GLUT1 expression in mice and human colorectal cancer, AACR Annual Meeting 2013, April 6-10, 2013, Washington DC USA

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
檜井 孝夫 (HINOI TAKAO)
広島大学・病院・講師
研究者番号 : 10444689
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
岡島 正純 (OKAJIMA MASAZUMI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号 : 90274068

外丸 祐介 (SOTOMARU YUSUKE)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
研究者番号：90309352

池上 恒雄 (IKENOUE TSUNEO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80396712

大上 直秀 (OUE NAOHIDE)
広島大学・医歯薬保健学研究院・講師
研究者番号：60346484

宮本 和明 (MIYAMOTO KAZUAKI)
呉医療センター・臨床研究部・室長
研究者番号：30332373