

## 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29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590679

研究課題名（和文） 胃癌発生メカニズムの解析を可能にする胃粘膜特異的な遺伝子変異導入マウスの作成

研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of gastric tumorigenesis using mice with stomach-specific gene recombination

## 研究代表者

渡部 宏嗣 (WATABE HIROTSUGU)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：50384764

研究成果の概要（和文）：胃癌発生機序を生体内で明らかにするために、胃において特定の遺伝子を変異させるマウスの系統を樹立した。このマウスを用いて癌遺伝子の導入、癌抑制遺伝子を不活化することでマウス胃腫瘍の発生に成功した。発癌機序を分子生物学的に検討したところ、種々のサイトカインの発現が上昇しており、それらに関与する細胞内リン酸化酵素の活性が増加していた。これらの分子の機能を阻害することにより発癌の抑制や発生した癌の縮小がみられた。本研究によって癌の発生解明や新規治療の確立に有用な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish stomach-specific gene recombination mice for the research of gastric tumorigenesis. Using this model, we established highly reproducible gastric tumor model and analyzed the mechanism of carcinogenesis. We found several cytokines and intracellular kinases were involved in the gastric carcinogenesis. Role of each molecule was clarified using knockout mice and gastric cancer cell lines treated with siRNA and inhibitors.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医学

科研費の分科・細目：消化器内科学・上部消化管

キーワード：癌・シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌は年間死亡者数が5万人を超える悪性腫瘍であり、萎縮性胃炎を経て発症するintestinal typeと、萎縮を伴わないdiffuse typeに分類される。それぞれのtypeで観察される遺伝子変異や増幅などの異常は異な

っているが、それらの発癌における役割は明らかになっていない。

胃癌の動物モデルとして、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseやFoxa3などのプロモーターを用いた胃粘膜への遺伝子異常の導入マウスが報告されている。これらの遺伝子組み換えモデルは発現範

困や発現時期に制限があり、そのため導入できる遺伝子異常も限られ、胃発癌メカニズムの解析も十分には行われていない。

## 2. 研究の目的

新規の胃粘膜遺伝子導入モデルを作成し、Kras、TGF $\beta$  II 型受容体、E-cadherin などの遺伝子異常が胃癌の発生に与える影響を検討する。またこれらの遺伝子変異モデルを用いて発癌に重要となる分子を同定し、その役割を検討する。

## 3. 研究の方法

胃粘膜特異的 cre リコンビナーゼ発現マウス (TFF1creTg, K19-creERT マウス) をレポーターマウス (LacZ および EYFP) と交配し、レポーター遺伝子の発現を検討した。さらに変異型 Kras 遺伝子と TGF $\beta$  II 型受容体の遺伝子変異を胃粘膜に導入し病理像の検討、免疫組織染色、定量的 PCR 法による遺伝子発現検討を行った。

胃癌に関連する ASK1、IL-6 遺伝子の役割は、それぞれの分子のノックアウトマウスを用いて MNU による化学発癌モデルで検討した。また腫瘍発生、進展やサイトカイン発現における細胞内シグナル阻害薬の効果は、AGS、MKN45 など胃癌細胞株を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) TFF1-cre トランスジェニックマウスの作成と遺伝子組み換えの検討

マウス TFF1 プロモーターの上流約 2kb を PCR で増幅し、cre リコンビナーゼ遺伝子の直上に挿入した TFF1-cre プラスミドを作成し、マウス受精卵にマイクロインジェクトした。得られたトランスジェニックマウスから二系統の遺伝子導入を確認した (TFF1creTg1, TFF1creTg2) これらの系統をレポーターマウスである Rosa26R-LacZ マウスと交配し得られた TFF1creTg1-LacZ, TFF1creTg2-LacZ マウスの胃組織で粘膜染色、免疫プロットを行い LacZ 遺伝子の発現を検討したが、いずれの系統でも胃粘膜における組み換えがみられず、目的の cre リコンビナーゼが働いていないと考えられた。

(2) K19-creERT;KrasG12D;TGF $\beta$ R2KO マウスの樹立と解析

前述の TFF1-cre-SV40Tg マウスによる胃粘膜の遺伝子改変が確認できなかったため、近年樹立され、胃粘膜を含む消化管で誘導性に遺伝子変異を起こさせる K19-creERT マウスを導入した。K19-creERT マウスとレポーターマウスである Rosa26R-EYFP マウスと交配し、タモキシフェン (TAM) を腹腔内投与した一週間後に胃組織を抗 GFP 抗体で免疫染色を行った。図 1 にみられるように、主に

胃粘膜頸部より表層の腺窩上皮に EYFP の発現が見られ、目的の遺伝子変異が誘導されていることが確認された。続いて KrasG12D; TGF $\beta$ R2KO マウスと交配し、K19-creERT; KrasG12D;TGF $\beta$ R2KO マウスを樹立した。タモキシフェンの腹腔内投与によって遺伝子変異を誘導すると、胃粘膜に著明な肥厚性変化が見られた。さらに大部分のマウスで浸潤性の腫瘍が認められた (図 2)。腫瘍部の免疫染色と免疫プロットで細胞内リン酸化酵素である Erk、JNK が活性化していることが認められた。また腫瘍部のサイトカイン発現を定量的 PCR で検討したところ、TNF $\alpha$ 、GM-CSF、IL-1 $\alpha$ 、IL-6 などのサイトカインの発現が増加していることが分かった。以上の結果から胃粘膜特異的な Kras 変異と TGF $\beta$  シグナルの遮断によりサイトカイン発現が過剰に誘導され発癌したと考えられた。よって本モデルは胃腫瘍発生機序解明に有用であると考えられた。

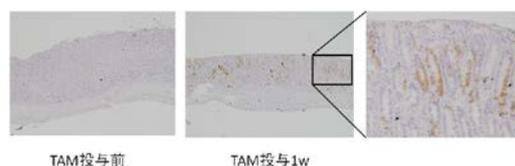


図1 K19creERTマウスによる胃粘膜の誘導性遺伝子変異

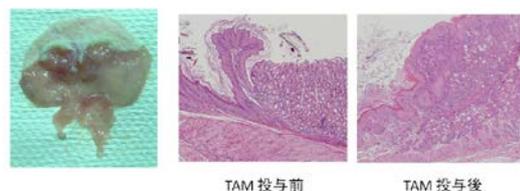


図2 胃特異的遺伝子変異により発生した胃腫瘍

(3) IL-6 ノックアウトマウスを用いた胃発癌モデルの解析

胃粘膜での変異型 Kras 遺伝子の発現によりサイトカインの IL-6 の発現量が増加することが明らかになったため、IL-6 が胃癌に果たす役割をノックアウトマウスの化学発癌モデルで検討した。

野生型 C57B6 マウスに 240ppm の MNU を経口投与したところ、既報の如く胃腫瘍が見られた (図 3)。この腫瘍モデルを IL-6 ノックアウトマウスと比較すると、図 4 のように担癌個体数、腫瘍数、腫瘍サイズのいずれも IL-6 ノックアウトマウスで減少していた。また野生型マウスの腫瘍では IL-6 は主に間質に発現しており、線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ SMA と同様の分布を示すことが分かった (図 5)。続いて IL-6 が発癌に与える影響を検討するために胃粘膜より抽出した蛋白を用いて免疫プロットを行った。図 6 に示すように IL-6 ノックアウトマウスでは、非腫瘍部、腫瘍部ともに STAT3 のリン酸化が

見られなかった。

IL-6 の発現が主に線維芽細胞で認められたため、線維芽細胞と腫瘍細胞のサイトカインの相互作用を検討した。種々の胃癌細胞株の培養上清は線維芽細胞培からの IL-6 分泌を促進した。この胃癌細胞株の培養上清に IL-1 の受容体拮抗薬を併用すると線維芽細胞からの IL-6 分泌が有意に減弱した (図 7)。これらの結果より化学発癌によるマウス胃癌モデルではサイトカインの IL-6 は線維芽細胞から分泌され、癌細胞の増殖などを正に制御していることが示唆された。

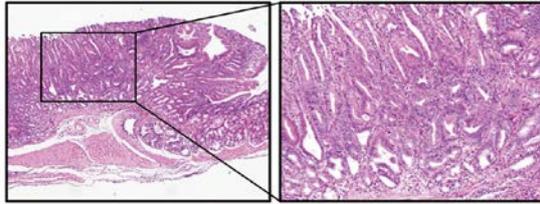


図3 野生型C57B6マウスに発生した胃腫瘍の病理組織像  
左40倍 右200倍

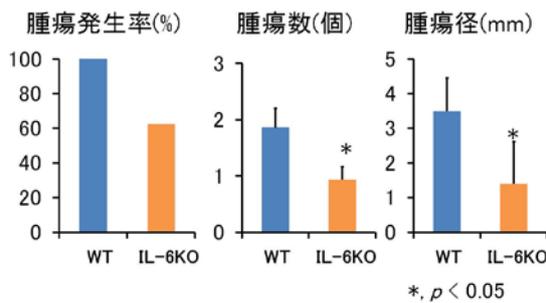


図4 野生型マウスとIL-6ノックアウトマウスにおける胃腫瘍発生

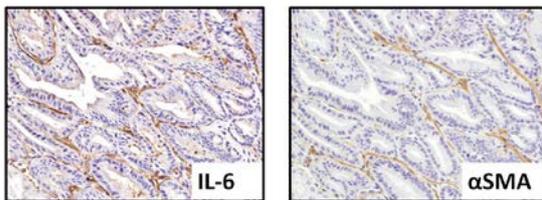


図5 マウス胃腫瘍におけるIL-6と線維芽細胞マーカーの発現

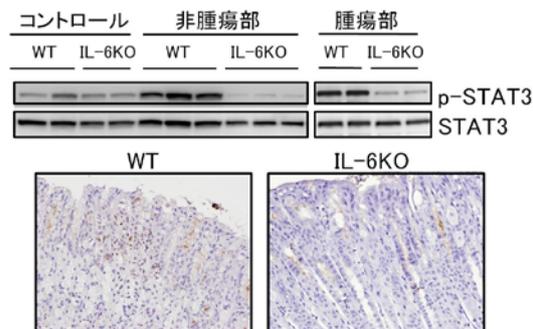


図6 マウス組織におけるリン酸化STAT3の検討

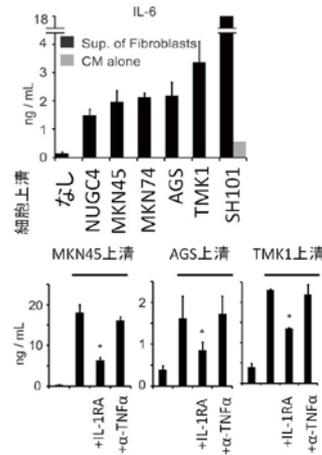


図7 胃癌細胞培養上清による線維芽細胞のIL-6分泌

#### (4) 新規サイトカイン IL-32 がヘリコバクター感染と胃癌に与える影響

IL-6 や IL-1 などのインターロイキンはヘリコバクター感染胃粘膜で増加していることが既に知られていたが、上記実験によりマウスモデルでは線維芽細胞との相互作用を介して発癌に関わることが示された。続いて近年リウマチなどの炎症性疾患で増加していることが報告された新規サイトカインである IL-32 が胃発癌に与える影響を検討した。まず臨床検体で IL-32 の発現を検討したところ、図 8 のようにヘリコバクター非感染粘膜ではほとんど発現がなく、胃癌では高発現が認められた。

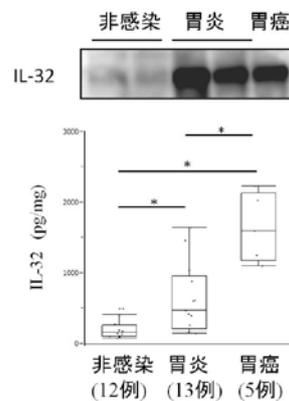


図8 胃組織検体中のIL-32蛋白発現

ヘリコバクターによる IL-32 発現機序の検討のために AGS 細胞を用いた。野生型ヘリコバクターのみが IL-32 を誘導した。野生型感染で活性化される細胞内シグナルの阻害剤を添加したところ、SC-514 の添加で有意に発現が減弱し、ヘリコバクターによる NF- $\kappa$ B の活性化により IL-32 発現が促進していることが分かった (図 9)。IL-32 にはマウスホモログが知られておらず、ノックアウトマウスがないため、AGS 細胞で IL-32 をノックダウンしてその機能を検討した。IL-32 ノックダ

ウン細胞ではヘリコバクター感染によるNF- $\kappa$ Bの活性化が低下していた(図10)。さらにNF- $\kappa$ Bで制御されるIL-8、CXCL1、CXCL2の発現が15%、17%、37%と有意に減弱した。これらの結果はヘリコバクター感染により胃粘膜に誘導されるIL-32は、NF- $\kappa$ B活性化を介して発現し、さらにNF- $\kappa$ Bの活性化を持続させることで他のサイトカイン発現を制御していると考えられた。すなわちIL-32は炎症から発癌の経路で正のフィードバックループを形成している重要な蛋白であることが明らかになった。

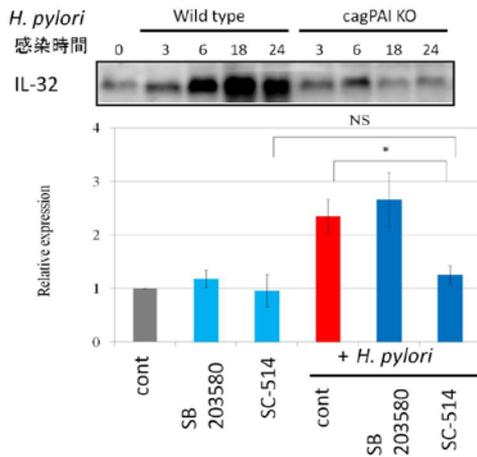


図9 ヘリコバクター感染によるAGS細胞のIL-32発現

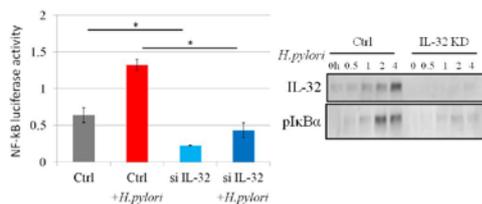


図10 IL-32ノックダウンAGS細胞の検討

#### (5) ヘリコバクター感染マウスモデルとASK1タンパクの機能の検討

近年化学物質によるマウス胃癌モデルの検討で発癌に関与することが報告されたASK1タンパクについて、ヘリコバクター感染モデルで検討した。

野生型C57B6マウスとASK1ノックアウトマウスにヘリコバクターSS1株を経口的に感染させた。12週後にヘリコバクターの感染数を検討したところ、野生型、ASK1ノックアウトマウスとも約 $6 \log_{10}$  CFUであり著変認めなかった。一方病理学的検討では、炎症スコアは野生型で $2.9 \pm 0.3$ 、ASK1ノックアウトマウスで $3.9 \pm 0.4$ であり有意にノックアウトマウスで炎症所見の悪化がみられた。萎縮性変化は野生型で $1.2 \pm 0.4$ 、ASK1ノックアウトマウスで $3.7 \pm 0.5$ 、化生性変化は野生型で0、ASK1ノックアウトマウスで $3.3 \pm 0.9$

といずれの項目もノックアウトマウスで悪化がみられた。これらの結果からASK1タンパクはヘリコバクター感染胃炎において制御的に働いている可能性が考えられた。また感染胃粘膜の免疫染色でノックアウトマウスではJNKのリン酸化とp38のリン酸化が有意に減弱しており、さらに細胞増殖の指標となるPCNAも減弱していた。これらの結果からはASK1タンパク質が細胞内リン酸化酵素のJNKやp38の活性化を介して細胞増殖を制御しており、ヘリコバクター感染胃粘膜ではこの反応が抑制されると、化生や萎縮性変化が促進されると考えられた。

ASK1タンパクと細胞増殖の関連がマウスモデルで示唆され、また、胃癌症例でASK1の発現増加が認められているため、このタンパクの機能的障害が治療的効果をもたらすか検討を加えた。ASK1阻害薬を胃癌細胞株であるMKN45およびAGS細胞に投与するとJNKやp38のリン酸化が減弱し、細胞周期の制御タンパクであるcyclinD1が有意に減少した。また図11に示すように濃度依存的にMKN45細胞の増殖が抑制された。阻害薬による癌細胞の増殖抑制はほかの胃癌細胞株でも同様に見られた(図12)。

ASK1阻害薬の効果をin vivoで検討するためMKN45細胞をヌードマウスに移植し、阻害薬を経口投与した。図13に示すように阻害薬は有意に癌細胞の増大を抑制した。移植腫瘍の免疫染色ではcyclinD1陽性癌細胞数は一視野あたり対照群で $75 \pm 25$ 個、阻害薬群で $38 \pm 8$ 個、PCNA陽性癌細胞数は対照群で $72 \pm 16$ 個、阻害薬群で $35 \pm 5$ 個であり、いずれの指標も阻害薬群で有意に減少していた。

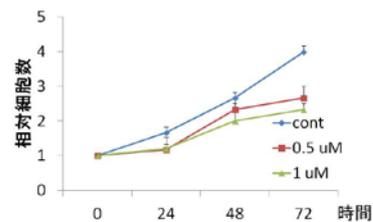


図11 ASK1阻害薬の抗腫瘍効果 (in vitro)

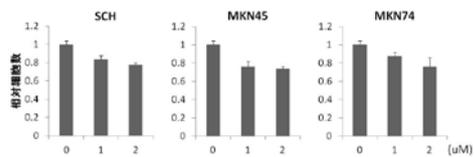


図12 種々の胃癌細胞株に対するASK1阻害薬の抗腫瘍効果

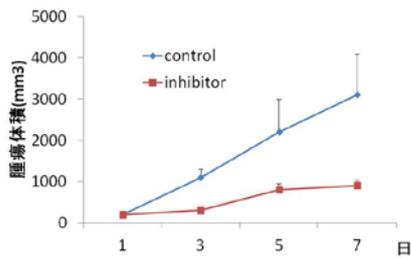


図13 ASK1阻害薬の抗腫瘍効果 (in vivo)

## 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3件)

- ① Kinoshita H, Hirata Y他 (14人中②番目) ,Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis, PLoS One、査読有、Vol8、No4、2013、e60914 DOI:10.1371/journal.pone.0060914.
- ② Hayakawa Y, Hirata Y他 (11人中②番目) ,Apoptosis signal-regulating kinase-1 inhibitor as a potent drug for the treatment of gastric cancer, Cancer science、査読有、Vol103、No12、2012、pp2181-5 DOI: 10.1111/cas.12024.
- ③ Sakitani K, Hirata Y他 (13人中②番目) ,Role of interleukin-32 in Helicobacter pylori-induced gastric inflammation, Infection and immunity、査読有、Vol80、No11、2012、pp3795-803 DOI:10.1128/IAI.00637-12.

[学会発表] (計7件)

- ① 平田喜裕、K19 positive cells are important progenitor of squamo-columnar junction tumor in mouse、米国消化器病学会週間、2013年5月19日、Orlando, USA
- ② 崎谷康佑、Increased interleukin-32 expression in gastric inflammation induced by Helicobacter pylori、第二回日本消化器病学会国際カンファレンス、2013年3月23日、鹿児島
- ③ 平田喜裕、H. pylori感染によるROSを介したアポトーシス制御機構の解析、日本消化器関連学会週間、2012年10月10日、神戸
- ④ 崎谷康佑、Role of IL-32 in H. pylori induced gastric inflammation、米国消化器病学会週間、2012年5月20日、San Diego USA
- ⑤ 早河翼、ASK1 plays a critical role in H.

pylori induced gastric inflammation and metaplasia、米国消化器病学会週間、2012年5月20日、San Diego USA

- ⑥ 早河翼、胃発癌におけるASK1の役割マウスモデルを用いた解析、日本消化器関連学会週間、2011年10月21日、福岡
- ⑦ 早河翼、胃癌におけるApoptosis Signal-regulating kinase1の重要性、日本癌学会、2010年9月22日、大阪

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

渡部 宏嗣 (WATABE HIROTSUGU)  
 東京大学・医学部附属病院・臨床登録医  
 研究者番号：50384764

### (2)研究分担者

平田 喜裕 (HIRATA YOSHIHIRO)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：10529192