

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 24年 5月 23日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790642

研究課題名（和文）Hes1 に対する RNA 干渉を用いた大腸癌増殖・分化制御の試み

研究課題名（英文）Effects of Hes1 knockdown by RNA interference aimed at blocking of the proliferation and induction of differentiation of colon cancer cells

研究代表者

上尾 太郎 (UEO TARO)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：30569611

研究成果の概要（和文）：

大腸癌のモデル動物 *Apc^{Min}* マウスの腫瘍において、*Hes1* が腫瘍細胞の増殖ならび未分化性維持に関与していることがあきらかになった。さらに重要なことに、正常腸管上皮においては、*Hes1* に加えて *Hes3* や *Hes5* が幹細胞維持に協調的に関与していることがわかった。この結果より、*Hes1* の阻害は、正常腸管に影響を与えることなく、腫瘍の増殖を抑制し、正常上皮へと分化させる治療の開発に寄与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We found that inactivation of the Notch effectors *Hes1*, *Hes3* and *Hes5*, but not *Hes1* alone, led to reduced cell proliferation, increased secretory cell formation and altered intestinal structures in adult mice. However, in *Apc* mutation-induced intestinal tumors, inactivation of *Hes1* alone was sufficient for reducing tumor cell proliferation and inducing differentiation of tumor cells into all types of intestinal epithelial cells, but without affecting the homeostasis of normal crypts owing to genetic redundancy. These results indicated that *Hes* genes cooperatively regulate intestinal development and homeostasis and raised the possibility that *Hes1* is a promising target to induce the differentiation of tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：大腸癌、Notch、Hes1

1. 研究開始当初の背景

ヒトの大腸癌やそのモデル動物である *Apc^{Min}* マウスの腫瘍において、その増殖や未分化性維持に Notch シグナルが関与していることが知られている。Notch シグナルを阻害すると、*Apc^{Min}* マウスの腫瘍は増殖をとめ、杯細胞へと分化し、一方 *Apc^{Min}* マウスに対して Notch シグナルが恒常的に活性化するよう遺伝子改変をおこなうと、腫瘍の数が20倍に増加することが報告されている。

2. 研究の目的

Notch シグナルの阻害が新規の大腸癌治療に結びつく可能性があるが、同時に Notch は正常腸管上皮の幹細胞制御にも関与しており、Notch の阻害は正常腸管に対して重篤な副作用を引き起こす可能性が示唆された。そのため Notch の下流にある遺伝子のうち、腫瘍特異的に機能しているものの同定が必要であった。そこで、我々は、Notch シグナルの下流にある遺伝子 *Hes1* に注目した。*Hes1* は、腸管上皮の増殖細胞のみならず、ヒト大腸癌細胞や *Apc^{Min}* マウスの腫瘍細胞に発現している。さらに、*Hes1* ノックアウトマウスにおいては、胎児の腸管上皮の分化に異常が出現することが報告されている。しかしながら、*Hes1* ノックアウトマウスは、呼吸器系の異常により生後すぐに死亡するため、成体の腸管幹細胞制御における *Hes1* の役割について検討することができなかった。さらに、*Hes1* ノックアウトマウスの腸管においては、その関連遺伝子である、*Hes3* や *Hes5* の発現上昇を認めており、腸管の分化に関して、*Hes1* が優勢的に制御しているのか、それとも *Hes3* や *Hes5* も同等に関与しているのか、不明であった。

3. 研究の方法

消化管上皮特異的に *Hes1* の欠失したマウス (*Hes1* cKO) を作成し、*Hes1* の腸管上皮幹細胞制御における役割を検討した。

さらにこのマウスと *Apc^{Min}* マウスを交配し (*Apc^{Min}; Hes1* cKO)、腫瘍における役割を検討した。加えて、*Hes1* のみならずその関連遺伝子 *Hes3* や *Hes5* をも欠失したマウス (*Hes1/3/5* cKO) を作成し *Hes* 遺伝子群の腸管上皮や腫瘍における役割まで検討した。

4. 研究成果

Apc^{Min} マウスに対して、*Hes1* を欠失させても (*Apc^{Min}; Hes1* cKO)、小腸に多数のポリープが形成された。しかし、コントロールでは、腫瘍組織は未分化な細胞集塊であるのに対し、*Hes1* を欠失させると、腫瘍細胞の大半が増殖を停止し、吸収上皮や杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞へと分化した。しかも、腫瘍組織と異なり *Hes1* を欠損させても正常粘膜上皮には異常を認めなかった。さらに、薬剤誘導性に消化管上皮特異的に *Hes1* が欠失する遺伝子改変マウスを作製し、これを用いて腫瘍形成後に薬剤誘導性に *Hes1* を欠失させても、腫瘍細胞が腸上皮細胞へと分化した。*Hes1*、に加えて *Hes3*、*Hes5* を欠失させると (*Hes1/3/5* cKO)、正常腸上皮も増殖細胞が著しく減少し、分泌系細胞への分化が亢進した。そこで、完全に腫瘍細胞が正常上皮へ分化することを期待し、腫瘍細胞の *Hes1*、*Hes3*、*Hes5* すべてを欠失させたが (*Apc^{Min}; Hes1/3/5* cKO)、*Hes1* を欠失した時以上に腫瘍細胞の分化が亢進しなかった。以上の結果より、*Hes1* が腫瘍の発生ならび維持において、その増殖や未分化性の維持に関与していることがあきらかになった。しかも、重要なことに、*Hes1* を欠失させても正常腸管上皮になんら影響をあたえないことから、*Hes1* が腫瘍細胞の増殖をとめ最終分化細胞へと誘導するような治療のターゲットになりうると考えられた。さらに、治療への応用の可能性を探るべく、現在ヒト大腸癌細胞に対し、ウイルスベクターを用いて RNA 干渉による

Hes1 の選択的阻害実験を行っている。また、*Apc*^{Min} マウスに対して、マウス用内視鏡を用いて、腫瘍へ直接ウイルスベクターを導入する実験も並行して行っている。

また興味深いことに、大腸についての検討から、*Hes* 遺伝子群が腸管上皮幹細胞の分化を制御するだけでなく、幹細胞の位置を規定していることもあきらかになった。小腸と同じく、*Hes1* cKO の成体大腸には異常を認めなかった。しかし、生後2ヶ月目の *Hes1/3/5* cKO の成体大腸では、形態異常はなく、細胞の大半が杯細胞であることに差はなかった。しかし *Hes1/3/5* cKO においては、内分泌細胞が増加し、通常大腸に観察されないパネート細胞も出現していた。コントロールの大腸は、陰窩底部に幹細胞があり、底部から中央にかけ増殖細胞を多数認め、管腔側へ向かって成熟分化細胞が供給されていた。それに対し、*Hes1/3/5* cKO では、陰窩中央に幹細胞ならび著しく減少した増殖細胞を認め、さらに管腔側と底部側の両方向に向かって成熟細胞が供給されていた。つまり、*Hes* が、大腸上皮幹細胞の分化や増殖のみならず、幹細胞の位置も規定していた。この幹細胞の位置の変化が更なる異常を誘導すると考え、生後1年後まで観察した。コントロールでは全く異常を認めないのに対し、生後1年がすぎた *Hes1/3/5* cKO の成体大腸においては、小腸類似の絨毛様構造を呈し、また成熟分化細胞の分布も劇的に変化していた。生後2ヶ月の時点での観察同様に、陰窩中央に増殖細胞が位置していたが、それより内腔側に吸収細胞と内分泌細胞のみが分布し、一方で陰窩底部寄りにパネート細胞と杯細胞のみが分布していた。幹細胞の分化に関与する Wnt シグナルやその下流の Sox9、また Wnt シグナルに拮抗する BMP シグナルの分布にはコントロールと *Hes1/3/5* cKO との間で差がなかった。以上より、この成熟細胞の分布の変化の理由として、①陰窩中央の幹細胞より底部へ供給される前駆細胞は Wnt シグナルの影

響をうけ、Sox9 を発現し、パネート細胞や杯細胞へと分化した。②陰窩中央の幹細胞より管腔側へと移動する前駆細胞は BMP シグナルの影響をうけ、また Sox9 が発現されないため、吸収上皮や内分泌細胞へと分化した。と推察された。以上の結果より、*Hes* 遺伝子群が、大腸上皮幹細胞の位置を規定しており、その結果幹細胞はニッチから受ける分泌型細胞シグナルを適切に受容していることも明らかになった (Development 2012 Mar;139(6):1071-82)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Ueo T, Imayoshi I, Kobayashi T, Ohtsuka T, Seno H, Nakase H, Chiba T, Kageyama R.
The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. Development. 査読有 2012 Mar;139(6):1071-82.
doi: 10.1242/dev.069070
- ② Nakanishi Y, Nakatsuji M, Seno H, Ishizu S, Akitake-Kawano R, Kanda K, Ueo T, Komekado H, Kawada M, Minami M, Chiba T.
COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. Carcinogenes 査読有 2011 Sep;32(9):1333-9. Epub 2011 Jul 5.
doi: 10.1093/carcin/bgr128
- ③ Fukuhara M, Watanabe T, Ueo T, Ida H, Kodama Y, Chiba T.
Enhanced cytokine responses to Toll-like and NOD-like receptor ligands in primary biliary cirrhosis-CREST overlap syndrome. Rheumatolog 査読有 2010 Aug;49(8):1602-4.
doi: 10.1093/rheumatology/keq080
- ④ 上尾太郎, 妹尾浩, 千葉勉: "胃ではLgr5陽性細胞が自己再生をにない、さらにこ

の細胞からin vitroで胃腺窩を長期間構築できた” 分子消化器病 査読なし 7. 185-187 (2010)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 上尾太郎、妹尾浩、仲瀬裕志: “Hes1 は大腸腫瘍の増殖や未分化性の維持に重要である” 第 52 回日本消化器病学会大会. (2010. 10. 14). 横浜
- ② Ueo T, Seno H, Nakase H: "Hes not only regulates the proliferation and differentiation of colon stem cell but also keep stem cells at correct position." 1st International Topic Conference.. (2010.09.25). Kamakura, Japan
- ③ 上尾太郎、妹尾浩、仲瀬裕志: “Hes1 は、大腸上皮幹細胞の分化や増殖を制御し、さらに幹細胞の位置や陰窩の形態保持に関与している” 第96回日本消化器病学会総会. (2010. 04. 23). 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上尾 太郎 (UEO TARO)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号：30569611

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし