

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300342

研究課題名(和文) 胃がんのマウスモデルとヒト血球DNAメチル化の解析

研究課題名(英文) Gastric cancer: a mouse model and epigenetic statuses of blood in mice and humans

研究代表者

湯浅 保仁 (YUASA, Yasuhito)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80111558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000円、(間接経費) 5,070,000円

研究成果の概要(和文)：発症数と死亡数が多い胃がんの中でも、未分化型胃がん(DGC)は特に予後が悪い。我々はヒトDGCに形態学的にも分子生物学的にもよく似た胃がんを発症する世界初のマウスモデル(DCKO)を作製し、その胃がんから初代培養細胞株(MDGC)を樹立することにも成功した。

我々はDCKOマウスにおいて早期診断を可能にする新規腫瘍マーカーとして4種類の血中miRNAを同定し、ヒト胃がん患者にも一部応用可能であることを示した。また、DCKOマウスとMDGC細胞株を利用した解析により、その発症にエピジェネティクス異常が強く関与しており、その治療にはエピジェネティクス治療薬が有効であることを示唆できた。

研究成果の概要(英文)：Diffuse-type gastric cancer (DGC) exhibits rapid disease progression and a poor prognosis. We have reported an E-cadherin/p53 double conditional knockout (DCKO) mouse line as the first genetically engineered one, which recapitulates human DGC morphologically and molecularly. Recently, we have also established mouse DGC (MDGC) cell lines from primary tumors and lymph node metastases of the DCKO mice.

We identified four circulating microRNAs that could accurately detect DGC at an early stage utilizing the DCKO mice, and indicated that one of them might have potential as a non-invasive biomarker in young human DGC patients. The results from in vivo and in vitro assays using the DCKO mice and the MDGC cell lines demonstrate that epigenetic alterations may play significant roles in diffuse-type gastric carcinogenesis, and support to develop a relevant therapeutic strategy in human DGC.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：胃がん マウスモデル DNA メチル化 エピジェネティクス 治療薬 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃がん

胃がんは世界的に発症数と死亡数が多く、日本においても同様である。胃がんは、組織学的に明瞭な腺管構造をもつ分化型とがん細胞が散在する未分化型 (DGC=diffuse-type gastric cancer) に大別される。その中でも、スキルス胃がんによって代表される DGC は、浸潤が強く進行が速い、リンパ節転移や腹膜播種が多い、しばしば手術不能である、抗がん剤が効きにくいなどの特徴があり、予後が極めて悪い。しかし、その発症機構の解明には至っておらず、有効な治療方法も確立されていない。

(2) 胃がんマウスモデル

我々はヒト DGC でその異常が報告されている細胞接着分子 E-cadherin (*Cdh1* 遺伝子がコードする) とがん抑制因子 p53 (*Trp53* 遺伝子がコードする) を胃特異的に欠損する (DCKO=double conditional knockout) マウスを作製した。DCKO マウスは、1年以内に100%の頻度で DGC を発症し、約半数が消化管出血や幽門部狭窄により死亡する。その DGC は強い浸潤能とリンパ節転移能をもち、免疫不全マウス皮下移植で腫瘍を形成する。上皮間葉転換 (EMT=epithelial-mesenchymal transition) 関連遺伝子の発現亢進が認められるという特徴を有していた。我々は、ヒト DGC に形態学的にも分子生物学的にも類似した胃がんを発症する世界初のマウスモデルとして DCKO マウスを報告した。

(3) マウス胃がん細胞株

我々は DCKO マウスの胃がん原発巣とリンパ節転移巣から細胞株を樹立することにも成功している。DCKO マウスの胃がん由来細胞株 (MDGC=*Cdh1*^{-/-}*Trp53*^{-/-} gastric cancer cell line) と、p53 ノックアウトマウス胎仔の胃粘膜上皮由来細胞株 (GIF=*Trp53*^{-/-} gastric epithelial cell line) を比較すると、MDGC 細胞株は GIF 細胞株よりも 30 倍以上強いスフェア形成能をもつ。ヌードマウスに皮下移植すると、MDGC 細胞株は 10² 個の細胞でも腫瘍を形成するのに対して、GIF 細胞株は 10⁵ 個の細胞でも腫瘍を形成しない。MDGC 細胞株は細胞傷害性の抗がん剤 (5-Fluorouracil・Paclitaxel) に対して強い耐性をもつことがわかった。

(4) 血中 micro RNA

欧米では早期発見される胃がんは全体の 25%のみであり、胃がん全体の 5 年生存率は 24%しかない。しかし、早期胃がんに限れば 5 年生存率は 60%以上にまで改善することが報告されており、胃がんの早期診断の重要性が示唆されている。欧米とは異なり、日本では早期診断方法として上部消化管内視鏡が普及しているが、内視鏡検査は侵襲的であるため、敬遠されがちである。現在、胃がんの非

侵襲的診断方法として、CEA や CA19-9 などの血清腫瘍マーカーが利用されているが、感度・特異度が低く、早期診断には向かないことがわかってきている。最近、がんの早期診断方法として血中 micro RNA (miRNA) が注目されている。血中 miRNA には、がんでは早期より miRNA の発現異常が生じている、その多くは臓器特異的である、miRNA は血中で安定している、マイクロアレイを利用して網羅的に発現解析を行うことができる、定量化も容易であるという特長がある。

(5) エピジェネティクス治療薬

固形がんを含めて多くの悪性腫瘍は根治が未だ困難である。細胞傷害作用を利用した第 1 世代の抗がん剤や、チロシンキナーゼなどの細胞増殖シグナルを標的とした第 2 世代の抗がん剤には、がん幹細胞や、細胞増殖シグナルに依存しないがん細胞の存在などの問題点がある。がん幹細胞の性質の維持には、EMT やエピジェネティクス変化が重要な役割を果たしていることが知られてきている。EMT を生じた KRAS 変異がん細胞株は KRAS シグナル経路に依存しないことや、EGFR 変異がん細胞株の中に存在するチロシンキナーゼ阻害薬に耐性をもつ細胞集団にはエピジェネティクス阻害薬が有効であることも報告されている。さらに、EMT を含む分化の可塑性もエピジェネティクス変化の結果であるという報告がある。以上の最新の知見より、新規抗がん剤としてエピジェネティクス治療薬の開発が有望であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) DCKO マウスを利用した早期診断方法の開発

ヒトの検体を利用してがんの早期診断方法を探索する場合、患者間で遺伝子異常や全身状態などが異なる、検体の入手方法や miRNA の定量方法が標準化されていないなどのため、結果にばらつきが出てしまう可能性がある。そのため、がんマウスモデルを利用して、このような問題を解決している報告が相次いでいる。そこで、DCKO マウスの血中 miRNA を解析し、DCKO マウスの胃がんの早期診断を可能にする新規血中 miRNA を同定する。そして、ヒト胃がん患者においても、その血中 miRNA が腫瘍マーカーとして有用であることを示す。

(2) DCKO マウスを利用した新規エピジェネティクス治療方法の開発

DCKO マウスの DGC では、ヒトの胃がんで DNA メチル化などのエピジェネティクス変化が報告されている遺伝子群の発現低下と、それらのエピジェネティクス変化を制御する遺伝子群の発現上昇が認められ、エピジェネティクスががん化に重要な役割を果たしていることが推測された。そこで、我々が作製した胃がんマウスモデルとその胃がん由来

細胞株を活用して、既存のどのエピジェネティクス治療薬が胃がんの治療に有効であるか解析し、ヒト胃がん患者への臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 早期診断方法の開発

検体

DCKO マウスと正常マウスの血清サンプルを使用した。また、DCKO マウスの胃がん原発巣・リンパ節転移巣と、正常マウスの胃粘膜上皮・リンパ節を比較した。ヒト検体については、平成 17 年から平成 23 年まで愛知県がんセンター病院を受診した患者からすでに採取した血漿サンプルを利用した。性別、年齢をマッチさせた未分化型胃がん患者と非がん対照者（愛知県がんセンター病院を受診し、がんが発見されなかった方）各 50 例の血漿サンプルを分与してもらった。

miRNA のマイクロアレイ解析

DCKO マウスと正常マウスの血清、DCKO マウスの胃がん原発巣と正常マウスの胃粘膜上皮、DCKO マウスのリンパ節転移巣と正常マウスのリンパ節を、各々 Mouse miRNA Oligo chip ver.16 (Toray) を利用して解析した。

RNA 抽出・cDNA 合成・定量的 RT-PCR

マウス血清検体については、TRIzol LS (Life Technologies) を利用して RNA 抽出を、TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を利用して cDNA 合成と定量的 RT-PCR を行った。ヒト血漿検体については、RNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) を利用して RNA 抽出を、miScript II RT Kit (QIAGEN) を利用して cDNA 合成を、miScript SYBR Green Kit (QIAGEN) を利用して定量的 RT-PCR を行った。マウス・ヒトいずれの血液検体も Spiked-in cel-mir-39 を内部コントロールとして解析した。

(2) 新規エピジェネティクス治療方法の開発

細胞培養

MDGC 細胞株と GIF 細胞株は、いずれもコラーゲンコートディッシュ上で Ham's F12 培地+5% bovine serum または horse serum 内で培養した。

細胞増殖アッセイ

12 ウェルのコラーゲンコートプレートに各々 10^4 細胞/ウェルで播種し、24 時間後に薬剤を投与し、さらに 48 時間後に MTT を利用して細胞増殖を解析した。

スフェア形成能アッセイ

24 ウェルの Ultra-low attachment プレートに各々 10^3 細胞/ウェルで播種し、Ham's F12 培地+EGF/FGF/insulin/hydrocortisone 内で 14 日間培養し、スフェア数を算定した。

皮下移植腫瘍形成能アッセイ

KSN ノードマウスに各々 10^5 細胞/箇所を Matrigel と共に皮下注射し、14 日後に腫瘍径が 1cm 前後となったことを確認し、薬剤投与を開始した。

RNA 抽出と cDNA 合成

RNA 抽出は TRIzol (Life Technologies) を、cDNA 合成は Super Script III (Life Technologies) を使用した。

マイクロアレイ解析

DCKO マウスの胃がん原発巣 3 症例をサンプルとして、正常マウスの胃粘膜上皮 5 症例をプールしたものをコントロールとして、Whole Mouse Genome Microarray Kit 4x44k (Agilent) を利用して解析した。

RT-PCR

RT-PCR は Taq polymerase (Greiner) を、定量的 RT-PCR は LightCycler 480 SYBR Green (Roche) を使用した。Gapdh 遺伝子を内部コントロールとして解析した。

メチル化特異的 PCR

Bisulfite 処理は Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek) を使用した。

4. 研究成果

[結果]

(1) 早期診断方法の開発

血液白血球 DNA のメチル化の程度とがんの有無、および生活習慣との関連の解析性と年齢をマッチさせたヒト胃がん患者 (Case) と非がんコントロール (Control) 各 299 名の血液白血球 DNA について、がん促進的な IGF2 遺伝子とがん抑制遺伝子 TUSC3 の定量的メチル化解析を行った。IGF2 のメチル化は Case の方が Control より有意に低く、高齢者と喫煙者ではメチル化が低かった。一方、TUSC3 のメチル化は Case の方が Control より高い傾向が認められ、高齢者と喫煙者ではメチル化が高かった。以上より、血液白血球 DNA のメチル化程度は、がんのバイオマーカーになる可能性があり、さらに生活習慣により変化することが示唆された。

マウス血中 miRNA 量

miRNA microarray の結果より、107 個の miRNA が担がん DCKO マウスの血清で発現量が上昇していることがわかった。そのうち、27 個が胃がん原発巣でも、さらに 18 個がリンパ節転移巣でも発現量が上昇していることがわかった (図 1a)。我々はその中でも miR-103・107・194・210 に注目した。

進行胃がんを発症している 12 か月齢の DCKO マウスでは、これらの 4 個の血清 miRNA の発現量が有意に上昇していることがわかった。早期胃がんを発症している 6~12 か月齢の DCKO マウスでも、同様の結果が得られ

た。逆に、胃がんを発症していない3か月齢のDCKOマウスでは、4個のmiRNAは発現量の変化は認められなかった。以上より、DCKOマウスにおいて4個のmiRNAには、早期がんを診断できる可能性があることが示唆された。

これら4個のmiRNAのROC (receiver operating characteristic) 曲線は図1bのようになり、特にmiR-107・194のAUC (area under the curve) 値は各々0.904・0.924と高かった。なお、文献的にCEAとCA19-9のAUC値は各々0.503と0.600であるので、従来の血清腫瘍マーカーよりも血中miRNAの方が優れていることがわかった。

図1a

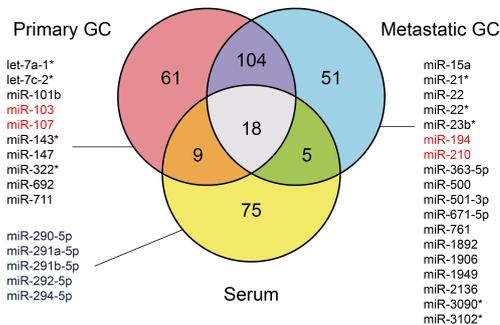
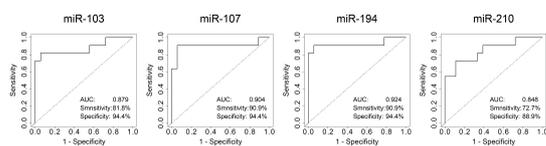


図1b



DCKOマウスの胃がん診断における血清microRNAのROC曲線。

ヒト血中miRNA

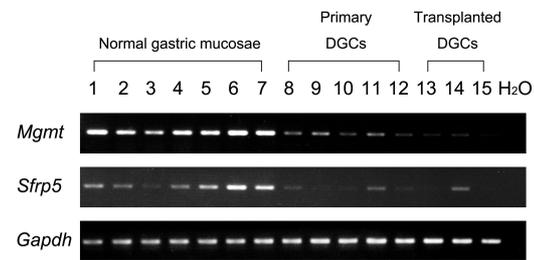
ヒト胃がん患者と非がん対照者の血漿中のmiR-103・107・194・210の量について比較したが、明らかな差は認められなかった。しかし、50歳以下の症例においては、ヒト胃がん患者においてmiR-103・107の量が上昇していた(各々 $p=0.052$, $p=0.029$)。さらに、これらの2個のmiRNAのROC曲線のAUC値は各々0.760・0.750と高いことがわかった。

(2)新規エピジェネティクス治療方法の開発 DCKOマウスのDGCのエピジェネティクス変化の解析

DCKOマウスのDGCのマイクロアレイ解析の結果より、DCKOマウスのDGCでは、胃がんを含めた多くの悪性腫瘍でDNAメチル化が生じている遺伝子群の発現低下が認められた。実際に、*Mgmt*遺伝子と*Sfrp5*遺伝子については、RT-PCR解析で発現低下(図2a)とメチル化特異的PCRでDNAメチル化(図2b)が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、エピジェネティクス変化を制御する遺伝子群の発現上昇が認められ、定量的RT-PCR解析で*Dnmt3b*遺伝子、*Suv39h1*遺伝子、*Ezh2*遺伝子の発現が有意に上昇していることが

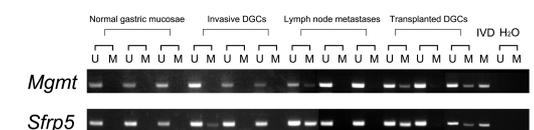
わかった(図2c)。

図2a



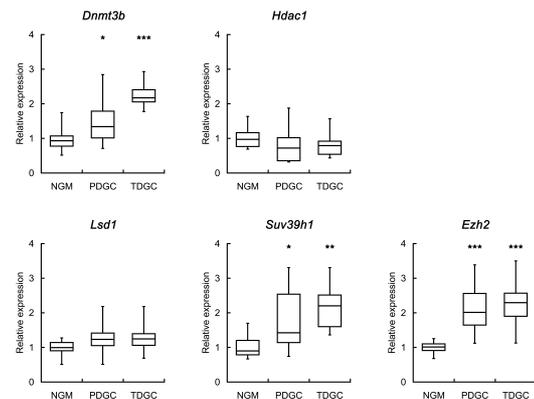
RT-PCR。マウスの正常胃粘膜(Normal gastric mucosae)では高頻度メチル化遺伝子*Mgmt*と*Sfrp5*が高発現しているのに対して、マウスの胃がん原発巣(Primary DGCs)と移植腫瘍(Transplanted DGCs)では発現が低下している。

図2b



メチル化特異的PCR。マウスの正常胃粘膜(Normal gastric mucosae)、胃がん浸潤部(Invasive DGCs)、リンパ節転移巣(Lymph node metastases)、移植腫瘍(Transplanted DGCs)と悪性度が高くなるに従い、メチル化が認められる。U:非メチル化、M:メチル化、IVD:メチル化コントロール。

図2c



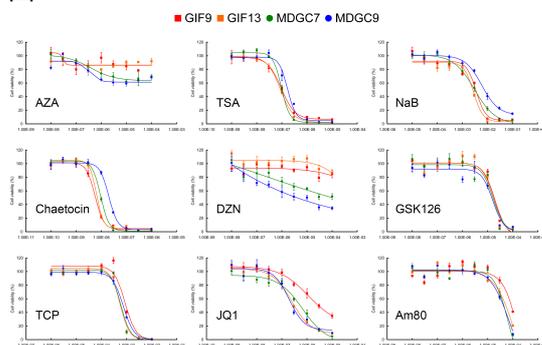
定量的RT-PCR。エピジェネティクス制御遺伝子*Dnmt3b*、*Suv39h1*、*Ezh2*は、マウスの正常胃粘膜(NGM=normal gastric mucosae)、胃がん原発巣(PDGC=primary DGCs)、移植腫瘍(TDGC=transplanted DGCs)と悪性度が高くなるに従い、発現が亢進している。NGM:13症例、PDGC:12症例、TDGC:7症例。*: $p<0.05$ 、**: $p<0.01$ 、***: $p<0.001$ 。

既存のエピジェネティクス治療薬のスクリーニング

MDGC細胞株とGIF細胞株に対して、DNAメチル化阻害剤5-aza-dC(AZA)、ヒストン脱ア

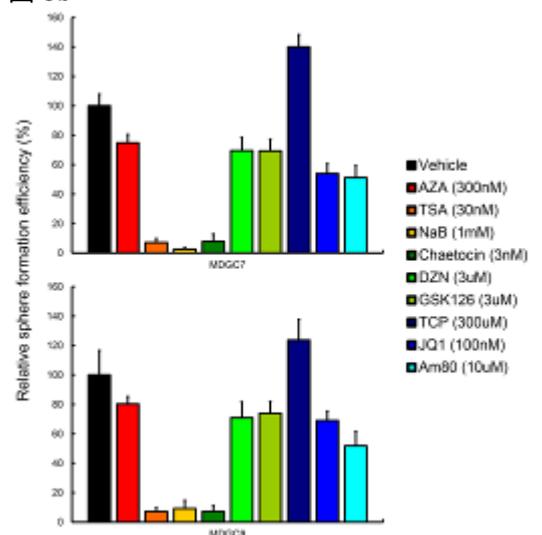
セチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 Trichostatin A (TSA) と Sodium butyrate (NaB)、Suv39h1 阻害剤 Chaetocin、Ezh2 阻害剤 3-deazaneplanocin A (DZN) と GSK126、Lsd1 阻害剤 Tranylcypramine (TCP)、Bromodomain 阻害剤 JQ1、ビタミン A 誘導体 Am80 などの既存のエピジェネティクス治療薬を処理した。その結果、AZA と DZN は MDGC 細胞株に対してのみ細胞増殖抑制を示し (図 3a)、TSA・NaB・DZN は MDGC 細胞株の形態変化を誘導した。さらに、各エピジェネティクス治療薬を低濃度 (IC_{50}) で処理してスフェア形成能アッセイを行ったところ、TSA・NaB・Chaetocin は顕著にスフェア形成を阻害し (図 3b)、TSA・NaB 処理群では分化傾向を示唆する空胞をもつ細胞も認められた。

図 3a



エピジェネティクス治療薬の用量反応曲線。AZA と DZN のみ IC_{50} が GIF 細胞株よりも MDGC 細胞株の方が低く、MDGC 細胞株特異的に作用している可能性が高い。

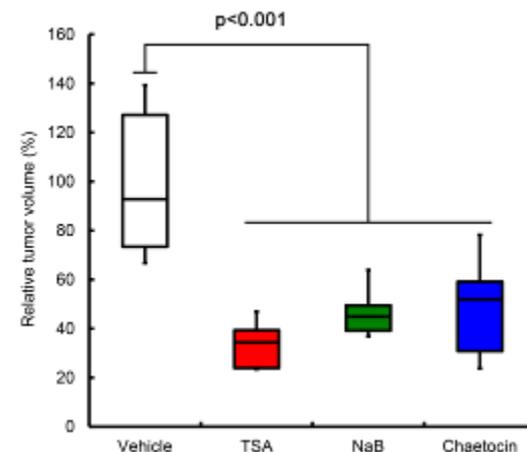
図 3b



エピジェネティクス治療薬の in vivo での効果検証

MDGC 細胞株を皮下移植したヌードマウスに対して TSA・NaB・Chaetocin を腹腔内投与したところ、腫瘍増大が有意に抑制された (図 4)。

図 4



ヌードマウス皮下移植腫瘍形成能アッセイを利用したエピジェネティクス治療薬の評価。Vehicle (5% Dimethyl sulfoxide)、TSA (10mg/kg/day)、NaB (1200mg/kg/day)、Chaetocin (0.5mg/kg/day)、各 8 検体。

〔考察〕

(1) 早期診断方法の開発

我々は miR-103・107・194・210 に注目し、これらの血中 miRNA 量が DCKO マウスにおいて、早期がんでも診断可能である、感度と特異度が高いという特長をもつことを明らかにした。その中でも、miR-107 は若年のヒト胃がん患者においても血漿中での量が有意に高く、ヒトへの応用も可能であることが示唆された。

(2) 新規エピジェネティクス治療方法の開発

我々は、DCKO マウスの DGC のマイクロアレイの結果に注目し、DGC の発症にエピジェネティクス異常が強く関与しており、DGC の治療にエピジェネティクス治療薬が有効であると推測した。実際、エピジェネティクス治療薬である TSA・NaB・Chaetocin は、in vitro でのスフェア形成を顕著に阻害し、in vivo でも腫瘍形成を有意に抑制した。以上より、DCKO マウスの DGC の治療にはエピジェネティクス制御が有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

- (1) Rotkrua P, Shimada S, Mogushi, K, Akiyama Y, Tanaka H, Yuasa Y. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model. Brit. J. Cancer (査読有) 2013; 108:932-940. doi: 10.1038/bjc.2013.30
- (2) Fukamachi H, Seol HS, Shimada S, Funasaka C, Baba K, Kim JH, Park YS, Kawachi H, Yook JH, Eishi Y, Kojima K, Kim WH, Jang SJ, Yuasa Y. CD49^{high} cells

- retain sphere-forming and tumor-initiating activities in human gastric tumors. PLoS One (査読有) 2013:8:e72438. doi:10.1371/journal.pone.0072438
- (3) Shimamura T, Wang F, Suehiro J, Kanki Y, Wada Y, Yuasa Y, Aburatani H, Miyano S, Minami T, Kodama T, Shibuya M. Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor associated macrophages. Cancer Res. (査読有) 2013:73:3019-3028. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3231
- (4) Fukamachi H, Kato S, Asashima M, Ichinose M, Yuasa Y. Activin A regulates growth of gastro-intestinal epithelial cells by mediating epithelial-mesenchymal interaction. Development Growth and Differentiation (査読有) 2013:55:786-791. doi: 10.1111/dgd.12102
- (5) Yuasa Y, Nagasaki H, Oze I, Akiyama Y, Yoshida S, Shitara K, Ito S, Hosono S, Watanabe M, Ito H, Tanaka H, Kang DH, Pan K-F, You W-C, Matsuo K. *Insulin-like growth factor 2* hypomethylation of blood leukocyte DNA is associated with gastric cancer risk. Int. J. Cancer (査読有) 2012:131:2596-2603.
- (6) Shimada S, Mimata A, Sekine M, Mogushi K, Akiyama Y, Fukamachi H, Jonkers J, Tanaka H, Eishi Y, Yuasa Y. Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer. Gut (査読有) 2012:61:344-353.
- (7) Song M-Y, Pan K-F, Su H-J, Zhang L, Ma J-L, Li J-Y, Yuasa Y, KangDH, Kim YS, You W-C. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. PLoS One (査読有) 2012:7:e33608.
- (8) Mimata A, Fukamachi H, Eishi Y, Yuasa Y: Loss of E-cadherin in mouse gastric epithelial cells induces signet ring-like cells, a possible precursor lesion of diffuse gastric cancer. Cancer Sci. (査読有) 2011:102:942-950.
- (9) Otsubo T, Akiyama Y, Hashimoto Y, Shimada S, Goto K, Yuasa Y: MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. PLoS One (査読有) 2011: 6: e16617.

〔学会発表〕(計42件)

- (1) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Yuasa Y. Targeting epigenetic alterations in a mouse model of E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer. NRF A3 Foresight Program 2013 Seminar - Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, 2013年7月6日~9日, 扶余, 韓国.
- (2) Nishikawaji T, Akiyama Y, Shimada S, Yuasa Y. Alterations of histone lysine methyltransferases, SETDB1 and SETDB2, in gastric cancers. NRF A3 Foresight Program 2013 Seminar - Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, 2013年7月6日~9日, 扶余, 韓国.
- (3) Akiyama Y, Koda Y, Nishikawaji T, Shimada S, Yuasa Y. Frequent loss of SET7/9 protein and its clinicopathological significance in gastric carcinoma. 第72回日本癌学会総会, 2013年10月3日~5日, 横浜.
- (4) Sakamoto A, Shimada S, Akiyama Y, Yuasa Y. Function and expression of Twist1 in diffuse-type gastric cancer cell lines of an E-cadherin/p53-deficient mouse model. 第72回日本癌学会総会, 2013年10月3日~5日, 横浜.
- (5) Fukamachi H, Shimada S, Yuasa Y. Patient-dependent differences in the features of human gastric tumor-initiating cells in primary culture. 第72回日本癌学会総会, 2013年10月3日~5日, 横浜.

〔図書〕(計1件)

- (1) 湯浅保仁、秋山好光. 胃がん. がん生物学イラストレイテッド. 渋谷正史、湯浅保仁 編集、羊土社、p368-375、2011.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/monc/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

湯浅 保仁 (YUASA Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 80111558

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし