

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700959

研究課題名(和文)新規大腸発がん再構成モデルを用いた炎症による発がん促進機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of inflammation-accelerate colorectal carcinogenesis by reconstitutive model

研究代表者

小沼 邦重 (ONUMA, Kunishige)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90597890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、腸管上皮細胞の発癌過程を再現できるモデルを確立した。腸管上皮細胞にpLK0.1ベクター、shp53、shAPCを導入し、炎症細胞と共培養させた。その後、2週間培養維持しマウス皮下に移植した。その結果、pLK0.1およびshp53を導入した腸管細胞は炎症の有無に関わらず皮下で増殖しなかった。しかし、shAPC導入腸管細胞は皮下で増殖した。炎症による発癌機構を解析するため、網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、CHI3L1が発現していた。以上の結果から、短期間の炎症細胞との共培養はAPCの遺伝子変異と協調的に働き、皮下増殖能を獲得させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：I developed murine in vitro reconstitution system of intestinal carcinogenesis. To clarify the potential roles of inflammation in intestinal carcinogenesis, I investigated the effects of transient co-culture with inflammatory cells. The intestinal cells infected shRNA against APC were only converted tumorigenic one after injected subcutaneously into nude mouse while those infected shRNA against vector control or p53 were not. However, these shAPC transfected cells were converted more malignant one when co-cultured with inflammatory cells. Microarray analysis has been shown expression level of Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1). These results suggested that inflammation, co-cultured with inflammatory cells, allows tumor to subcutaneous proliferation ability.

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：炎症 オルガノイド 腸管発癌

1. 研究開始当初の背景□

(1) 炎症と大腸発がんの関連性

大腸がんの発生率は年々増加傾向を示しているが、その原因として炎症の発がんへの関与が強く疑われている。例えば、慢性炎症状態である肥満や炎症性腸疾患は大腸発がんのリスクを上げ、NSAIDs は大腸発がんを抑制することが報告されている。実験モデルにおいても、大腸特異的炎症誘発剤である DSS の投与が、遺伝的背景 (*Apc<sup>Min/+</sup>* マウスや *p53<sup>-/-</sup>* マウス) や発がん剤 (Azoxymethane) による大腸の発がんを促進することが知られている。このように、ヒトおよびマウスで大腸がんの発生における炎症の重要性が示されているが、炎症と大腸発がんをつなぐメカニズムはいまだ不明な点が多い。

(2) 発がん機構を解析・検証する *in vitro* 実験モデルの必要性

原因として、従来の発がんモデルは個体レベルでの解析のため、発がん過程の詳細な解析 (遺伝子の変異と発がんステップの関連性など) が困難であること、また、細胞レベルの解析においては、腸管由来の正常細胞の長期培養が困難であるため、代替の細胞 (不死化した細胞や上皮以外の細胞) を用いなければならず、炎症に対する直接の影響を観察できないことなどが考えられる。したがって、生体内における炎症反応を忠実に再現し、発がんに至る過程を簡便かつ詳細に解析できる実験モデルの作製が必要である

(3) *In vitro* 発がん再構成モデルの確立

そこで申請者は、正常な腸管上皮細胞を用いて、生体内における発がん過程を再現する実験モデルを確立した (*In vitro* 発がん再構成モデルの確立)。具体的には、3D 培養で維持した腸管上皮細胞 (培養方法は Hans Clevers のグループが 2009 年に Nature にて報告) にレンチウィルスを用いて shRNA

を導入し、複数の大腸がん抑制遺伝子の発現を抑制させ、ヌードマウスの皮下に腫瘍を作製する方法である。このモデルの特徴は、どの遺伝子変異の組み合わせが発がん重要であるかを短期間 (約 2 ヶ月) で解析することができ、発がんに至るまでのタンパクあるいは遺伝子発現の変化を、培養条件下で追跡出来るところにある。これまでに、*in vivo* マウスモデルで造腫瘍性が確認されている shRNA の組み合わせ (shAPC/shp53, shAPC/shPTEN) を検証し、本法の発がんモデルとしての有用性を確認している。

(4) 炎症発がん解析への応用

shAPC と他の shRNA の組み合わせで腫瘍が形成されたことから、次に shAPC が環境因子である炎症とも協調するかを調べた。腸管上皮細胞に shAPC を導入し、活性化した炎症細胞 (腹腔内浸出細胞) と 3 時間共培養させたところ、造腫瘍性を獲得した。また、ここで得られた腫瘍から細胞株を樹立しマイクロアレイ解析を行ったところ、Wnt 経路や Stat3 経路の恒常的な活性化など、ヒト大腸がんでも高頻度に見られる遺伝子発現変化が観察され、本実験モデルがヒト大腸がん過程を再現していることが示唆された。本申請では、APC 以外の大腸がん抑制遺伝子に対する shRNA でも炎症と協調して発がんするか検討を行う。

(5) がん研究の最終目標の一つに、治療法の開発があげられる。一般的に、がんの薬剤感受性は遺伝学的背景の相違により異なることが知られている。しかし、ヒト大腸がん細胞株にどのような遺伝子変異があるか全体像が分からないことから、大腸がんにおける遺伝子型と薬剤感受性の関係は良く分かっていない。この問題に対して本申請は、*in vitro* 炎症発がんモデルを用いて、どの大腸発がん関連遺伝子 (p53、K-ras、FBXW7、MSH2 等) が炎症と協調して発がん

ん過程を促進するかを、大規模かつ短期間に検討する。さらに、ここで得られた多数の腫瘍の遺伝子発現解析を行うことで、個々の遺伝子異常に固有の特徴や、大腸がん全体に共通する変化を明らかにする。また、これらの解析をする一方で、同定した新規遺伝子が炎症を介さずに、実際に発がん過程を促進するかを検証する必要がある。そこで、前述の *in vitro* 発がん再構成モデルを用いて、候補遺伝子単独の発がんにおける機能あるいは他の遺伝子との協調的作用を検討する。

これらのアプローチにより、新規の大腸発がん関連経路の発見、さらにはその先にある遺伝子異常に基づく薬剤候補の特定が可能であると考えられる。

## 2.研究の目的

□(1) 肥満や炎症性腸疾患 (IBD) に伴う炎症反応が大腸発がんを促進することはよく知られているが、炎症は生体内の複雑な現象であるために一般的に解析が難しく、炎症と大腸発がんをつなぐ詳細な分子メカニズムには、いまだ不明な点が多い。申請者はこれまでに、正常の腸管細胞の発がん過程を簡便かつ短期間で再現できる培養モデルを確立した。本申請では、このモデルを元に改変した「*in vitro* 炎症発がんモデル」を用いて、炎症を背景とした発がん機構の解明と個別化医療の開発を目指す

## 3.研究の方法□

ヒトやマウスの発がんに関する過去の研究から、炎症は単独では発がんに不十分で、特定の遺伝子異常と協調的に作用することで初めて発がんに至ると考えられる。炎症と協調作用のある遺伝子異常の候補を探索するために、多数の大腸がん関連遺伝子の発現を腸管上皮細胞で抑制する。これらの細胞を炎症細胞と共培養し、ヌードマウス

の皮下で造腫瘍性を検討することで、炎症で促進される発がん過程を *in vitro* にて再構成する。さらに、得られた遺伝的背景の異なる腫瘍細胞に対してマイクロアレイ解析を行い、炎症発がん機構について新たな洞察を得る。特定の遺伝子の関与が想定される場合には、再び「*in vitro* 発がん再構成モデル」を用いて実際に発がん過程を促進するか検証する。また、個別治療戦略の構築を念頭におき、遺伝学的異常と薬剤感受性の関連を調べていく。

## 4.研究成果□

(1) 24 年度の研究では、単独では発がんに至らないが、炎症と組み合わせることで相乗効果を示し発がんに至る遺伝子の検出を目指した。大腸がん抑制遺伝子 p53、APC 遺伝子に対して shRNA を用いて発現を抑制し、炎症細胞と共培養した結果、shAPC を導入した腸管細胞でのみ皮下増殖能が亢進されることを示した。研究計画書では、がん遺伝子 K-ras、ヒト大腸がん高頻度に変異が見つかっている大腸がん抑制遺伝子 (SMAD4、Fbxw7、LKB1、p16<sup>Ink4a</sup>、MSH2、MSH6、MLH1)、すでに皮下増殖能を示さなかった遺伝子変異の組み合わせ (shp53+shPTEN、shp53+shcaspase3、shPTEN+shcaspase3) を遺伝子の候補としていたが、p53、APC 遺伝子の 2 つに絞り研究を施行した。その結果、shAPC を導入し皮下で増殖した腫瘍と、この細胞を親株とし炎症細胞と共培養し皮下で腫瘍径を増大させた腫瘍を、複数培養条件下で維持することに成功した。

(2) 25 年度では、炎症細胞が腫瘍径を増大させた機構を解析し、炎症を背景とする発癌の予防や治療の標的となる遺伝子あるいはタンパク候補を探索し、治療のための薬剤のスクリーニング系の構築を目指した。shAPC と炎症の協調作用によって得られた腫瘍細胞に対して網羅的遺伝子発現解析

を行った結果、ヒト大腸がんでも高頻度に見られる Wnt 経路や Stat3 経路の恒常的な活性化が観察された。また、本来炎症細胞から分泌され、炎症を惹起する作用を持つタンパクである Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1)が、炎症の協調作用によって得られた腫瘍細胞においても発現していた。CHI3L1 は正常上皮細胞と比較して腫瘍細胞で発現量が上がることが知られている。これらのことから、活性化した炎症細胞から分泌される CHI3L1 を含むタンパクが刺激となり、腫瘍細胞からも自律的に CHI3L1 が分泌されるようにある可能性が考えられた。現在、CHI3L1 を標的とした shRNA を炎症の協調作用によって得られた腫瘍細胞に導入することで、皮下増殖能を抑制するか。また、shAPC を導入細胞に CHI3L1 を添加することで皮下増殖能を促進するか否かを「*in vitro* 発がん再構成モデル」を用いて検討中である。

同定した遺伝子を標的とした薬剤のスクリーニング系を作製するために、「*in vitro* 炎症発癌モデル」で得られた腫瘍細胞（炎症の付加によって形成された腫瘍）と、「*in vitro* 発がん再構成モデル」で得られた腫瘍細胞（同定した候補遺伝子の変異によって形成された腫瘍）を用い、スクリーニングに適した培養条件を検討した。低接着プレートを用いた足場非依存条件下では腫瘍細胞はいずれもスフェロイドを形成した。マトリジェル上の培養条件と比較して増殖能は低下するものの、4週間培養した後マトリジェル上に播種すると、いずれの腫瘍も接着し、生存していた。このことから、薬剤処理を足場非依存条件下で行い、細胞生存率あるいは増殖能をマトリジェル上で判別できることを示すことができた。今後、High-throughput な薬剤スクリーニングを行い、遺伝的背景による薬剤感受性の違いを見だし、予防や治療の標的となる遺伝

子候補の同定を目指す。

## 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 10 件)□

1. Kanda Y, Kawaguchi T, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Kobayashi T, Takahashi N, Tazawa H, Habelhah H, Hamada J-I, Kobayashi M, Hirahata M, Onuma K, Osaki M, Nakamura K, Kitagawa T, Hosokawa M and Okada F. Fascin regulates chronic inflammation-related human colon carcinogenesis by inhibiting cell anoikis. *Proteomics* 14(9): 1031-41, 2014, 査読あり
2. Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, Hippo Y: Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 11127-11132, 2013, 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 神田裕介、坂木隆太、小沼邦重、浜田淳一、小林正伸、尾崎充彦、井藤久雄、岡田 太: 発癌要因としての低酸素再酸素化由来の活性酸素・活性窒素 (Hypoxia-reoxygenation and its-derived reactive nitrogen oxides as a carcinogenic factor) 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 5 日, パシフィコ横浜 (横浜)
2. 平畑美緒、伊藤真保、神田裕介、小沼邦重、岡田 太、尾崎充彦: ヒト骨肉腫の肺転移には miR-143 標的遺伝子である PAI-1 および MMP13 が関与する 第 5 回日本 RNAi 研究会、2013

年 8 月 30 日 ( 広島市 )

3. 神田裕介、坂木隆太、小沼邦重、浜田淳一、小林正伸、尾崎充彦、岡田 太 : 発癌要因としての低酸素再酸素化と活性酸化窒素の役割 第 13 回日本 NO 学会学術総会 2013 年 6 月 28 日 , 沖縄県医師会館 ( 南風原町 )
4. 小沼邦重、池田多津世、末永裕佳、神田裕介、藤井順逸、小林正伸、尾崎充彦、岡田 太 : 炎症発癌の遮断に向けた化合物の実効性の検証 第 66 回日本酸化ストレス学会学術総会 2013 年 6 月 13 日 ( 名古屋 )
5. 小沼邦重、落合雅子、今井俊夫、岡本康司、中釜 斉、筆宝義隆 : *in vitro* 腸発がん再構成系における炎症の発がん促進作用 文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「がん研究等の特性を踏まえた支援活動」平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ」2013 年 1 月 18 日 ( 大津 )

〔 図書 〕 ( 計 0 件 )

なし

〔 産業財産権 〕

出願状況 ( 計 0 件 )

なし

国内外の別:国内

取得状況 ( 計 0 件 )

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沼邦重 ( KUNISHIGE ONUMA )

鳥取大学 ・ 医学部 ・ 助教

研究者番号 : 90597890