

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790379

研究課題名(和文)腸管腫瘍形成における Id2 の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Id2 in intestinal tumorigenesis

研究代表者

美谷島 杏子 (Biyajima, Kyoko)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：30552020

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)：本研究では Apc; Id2 遺伝子変異マウス (Apc; Id2 マウス) を用いて、Id2 の腸管腫瘍形成における機能を遺伝学的に解析した。Id2 欠損による腫瘍上皮細胞の増殖能とアポトーシスへの影響は認められず、腫瘍の大きさへの影響も僅かであったが、回腸の腫瘍の数が 80% 減少するという著しい変化が観察された。このことから Id2 は回腸腫瘍形成の initiation に重要であることが示唆された。DNA マイクロアレイの解析から、Apc; Id2 マウスの腸陰窩では Apc 欠損型腸腫瘍形成に必須な c-Myc タンパク質の阻害因子や腫瘍形成抑制因子の発現が変動しておりこれらが腫瘍形成抑制に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To genetically examine the physiological role of increased expression of Id2 in the intestinal tumorigenesis, we crossed the Apc delta 716 mice with the Id2^{-/-} mice, and evaluated the polyp number, size, and apoptosis in the Apc delta 716; Id2^{-/-} (Apc; Id2) mice. Notably, lack of Id2 reduced the number of ileal polyps by ~80%, as compared with that of the control mice. On the other hand, Id2 deficiency had a little effect on the proliferation and apoptosis of the adenoma epithelium of Apc delta 716 mice. These results raise the possibilities that the elevated expression of Id2 is implicated in the process of intestinal adenoma-initiation. To further analyze the mechanisms, we next conducted DNA microarray analysis. This comprehensive analysis revealed that Id2 knockout increases expression of c-Myc antagonist gene and tumor-initiation suppressor genes. These results strongly suggest that Id2 promotes ileal adenoma initiation through suppression of those genes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Id2 Apc 腸管腫瘍

1. 研究開始当初の背景

Id2 (Inhibitor of DNA binding/differentiation 2) は basic helix-loop-helix (bHLH)型転写因子の機能抑制因子の1つであり、細胞の増殖や分化の変換点において機能し、形態形成過程や成体の恒常性の維持に寄与している。また Id2 は様々な癌において発現が増加していることが知られており、特にヒト大腸癌検体などでその発現上昇が予後の悪さと相関することが報告されている。また、大腸癌細胞株で Id2 をノックダウンすると細胞増殖の抑制とアポトーシスの促進がみられること、逆に、Id2 を強制発現させると足場非依存的な増殖が促進されることも報告されている。これらの結果は、Id2 が大腸癌においてアポトーシスを抑制し腫瘍細胞の増殖を促進している可能性を示唆する。さらに興味深いことに、Id2 はそのプロモーター上に TCF/LEF の結合配列を持ち、大腸癌由来細胞株において Wnt シグナルの直接の標的遺伝子である可能性も報告されている。以上の知見を遺伝学的に検証するために、申請者は *Apc* 変異マウス (*Apc*⁷¹⁶ マウス) の腸管腫瘍形成過程に Id2 が寄与している可能性を検証した。その結果、Id2 mRNA の発現は、正常の小腸上皮細胞と比較して *Apc*⁷¹⁶ マウスの腫瘍上皮細胞では約6倍に上昇していることをリアルタイムPCR法により見出した。また、Id2 はタンパク質レベルでも *Apc*⁷¹⁶ マウスの腺腫で正常組織に比べ増加していた。さらに腸管腫瘍形成過程への Id2 の関与の有無を調べるために、*Apc*⁷¹⁶ マウスに Id2 の遺伝子変異を導入した *Apc:Id2* 複合変異マウスを作出し *Apc*⁷¹⁶ マウスと比較した。非常に興味深いことに、*Apc*⁷¹⁶ マウスと比較して *Apc:Id2* 複合変異マウスの腫瘍の数は約1/5に減少していた。この結果は Id2 が *Apc*⁷¹⁶ マウスの腸管腫瘍の形成を促進する役

割を担っていることを示唆する。

2. 研究の目的

*Apc*⁷¹⁶ マウスは正常腸上皮細胞が増殖帯において *Apc* 遺伝子座のヘテロ接合性を消失することにより *Apc* が欠損し、その結果 Wnt シグナルが恒常的に活性化することによって腸管に多数の良性腫瘍を発症する。上記のように *Apc*⁷¹⁶ マウスで転写調節因子 Id2 を欠損させると、腸管に形成される腫瘍の数が 1/5 に減少する。本研究の目的は、Id2 の下流で腸管腫瘍形成を促進する因子を同定し、さらにその因子と Wnt シグナルとの相互関係を明らかにすることで、腸管腫瘍形成の機序を個体レベルで解明することにある。

3. 研究の方法

Id2 が Wnt シグナルとどのような相互関係にあり、腫瘍形成に寄与するのかを個体レベルで解明するために以下の実験を行った。

(1) Id2 欠損による *Apc*⁷¹⁶ マウスの腸管腫瘍の大きさへの影響の検討。

*Apc*⁷¹⁶ マウスと *Apc:Id2* 複合変異マウスの腸管腫瘍を実体顕微鏡下で数え、腫瘍のサイズごとの割合を評価する。

(2) Id2 欠損による *Apc*⁷¹⁶ マウスの腸管腫瘍上皮細胞の増殖、アポトーシスへの影響の検討。

*Apc*⁷¹⁶ マウスと *Apc:Id2* 複合変異マウスの腫瘍上皮細胞の増殖能については Ki67 陽性細胞率を免疫組織化学的に定量し評価する。アポトーシスへの影響に関しては、腫瘍組織切片を用いて TUNEL アッセイを行いアポトーシス細胞を定量化する

(3) Id2 欠損により *Apc*⁷¹⁶ マウスの腸陰窩細胞で発現が上昇する腫瘍形成関連因子の同定。

Apc:Id2 複合変異マウスと *Apc*⁷¹⁶ マウス

の正常の腸陰窩を分離し、抽出した mRNA を用いて DNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現プロファイルを比較する。4 倍以上の発現上昇の認められた因子の中で、腫瘍形成の initiation に直結する Wnt シグナルと関与する因子や、腸管腫瘍形成抑制に関連する遺伝子に注目し、RT-PCR とウェスタンブロットにて mRNA・タンパクレベルでの発現上昇を確認する。

4. 研究成果

腫瘍形成には initiation の段階と expansion の段階があることが知られている。Id2 の欠損は *Apc*⁷¹⁶ マウスの回腸腫瘍形成のどちらに寄与するかを調べる目的で、腫瘍のサイズごとの割合を比較した。その結果、*Apc:Id2* 複合変異マウスは *Apc*⁷¹⁶ マウスと比較して 0.5mm 以下の microadenoma の割合が 45%から 58%に増加し、逆に 0.5mm 以上 1mm 以下の腫瘍の割合が 46%から 34%に減少した。その一方で、腫瘍の数は 80%減少するという大きな変化が現れた。しかし、その腫瘍上皮組織での増殖能とアポトーシスに変化は認められなかった。以上のことから、Id2 は *Apc*⁷¹⁶ マウスの回腸の腫瘍の expansion の過程よりもむしろ initiation の段階に重要であることが示唆された。さらに Id2 の下流で回腸の腫瘍形成に寄与する因子を網羅的に探索する目的で、*Apc:Id2* 複合変異マウスと *Apc*⁷¹⁶ マウスの正常の腸陰窩を分離し、それを用いて DNA マイクロアレイを行った。その結果、175 個の遺伝子が複合変異マウスの正常腸陰窩で *Apc*⁷¹⁶ マウスと比較して 8 倍以上に発現上昇していた。また、57 個の遺伝子が 12% 以下に発現減少していた。我々はその遺伝子群の中で、c-Myc の機能阻害する因子 X に注目した。c-Myc は、APC 欠損型腫瘍の initiation に最も寄与する Wnt シグナルの標的因子として知られる。この因子 X の正常腸上皮における発現は c-Myc と逆

相関しており、正常腸陰窩には発現していないが、絨毛側の上皮細胞に分化した時点で発現が上昇する。しかし *Apc:Id2* 複合変異マウスではこの因子 X が正常腸陰窩において、絨毛と同レベルに発現するという現象を見出した。今後、Id2 欠損による因子 X の発現上昇機構や、因子 X による腫瘍形成抑制機序等、更なる解析を進めていく予定である。

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0件)

[学会発表](計1件)

(1) *Id2*-deficiency attenuates *Apc*-deficient intestinal tumorigenesis
Kyoko Biyajima, Xiaoding Shen, Kentaro Mori, Makoto M. Taketo, Yoshifumi Yokota
第 35 回日本分子生物学会年回ポスター発表
H24 年 12 月 13 日 マリンメッセ福岡

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

美谷島杏子 (Biyajima Kyoko)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：30552020

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：