

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：83901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800093

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた発がんおよびがんの浸潤・転移における免疫系の役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of immune system in intestinal carcinogenesis and metastasis using a mouse model

研究代表者

梶野 リエ (Kajino, Rie)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・研究員

研究者番号：20633184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：(1) Apc 716変異マウスの腸に形成される腫瘍では、腸上皮細胞においてJNK-mTORC1経路が活性化している。初代培養細胞を用いた解析から、この活性化は細胞自律的なものではなく細胞外因子によることが示唆された。活性化因子の候補としては腫瘍で発現が増加している炎症性サイトカインが挙げられた。(2) 局所浸潤能を持った腺がんを発症するcis-Apc 716/Smad4変異マウスにおいて、腸内細菌の除去が大腸の腫瘍形成に影響を及ぼすことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：(1) JNK-mTORC1 pathway is activated in intestinal tumors developed in ApcD716 mutant mice. Experiments using intestinal organoid culture established from wild-type and ApcD716 mutant mice suggest that the JNK-mTORC1 pathway is activated by extracellular signals, rather than via cell autonomous mechanisms.

(2) cis-ApcD716/Smad4 compound mutant mice develop tumors that show local invasion. Changes in the composition of intestinal microbiota by antibiotics administration affected colorectal tumorigenesis in cis-ApcD716/Smad4 mutant mice.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌 免疫学 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

免疫系は生体防御システムであり、我々の体が病原菌などの異物に感染した場合、まず自然免疫応答により炎症を引き起こして感染から身を守ろうとする。しかし一方で、慢性的な炎症は重大な健康障害を引き起こす。実際、自己免疫疾患の一つである炎症性腸疾患（慢性炎症）は大腸における炎症発がんの要因として知られている。がんの発生・進展過程にはがん抑制遺伝子などのがん関連遺伝子の体細胞変異、あるいはエピジェネティックな変化が関与すると考えられている。これに加え、近年、がん組織の微小環境における間質（免疫細胞や線維芽細胞を含む）が、がんの発生・進展過程に影響することが明らかになってきた。これらのことは、発がんおよびがんの浸潤・転移における免疫系の関与を強く示唆するものである。しかしながら、慢性炎症ががんの発症につながるメカニズムはほとんど明らかにされていない。また、がんの浸潤・転移における免疫系の役割についても解明されていない。そこで、がんの発生・進展における免疫系の役割の解明を目指し、以下の二つの研究目的に取り組んだ。

2. 研究の目的

(1) 「JNK-mTORC1経路による腫瘍形成における自然免疫の関与」

APC(Adenomatous Polyposis Coli) 遺伝子は家族性大腸腺腫症の原因遺伝子であり、散发性大腸がんにおいてもその約85%で変異が見つかっている。*Apc*^{+Δ716}(以下*Apc*) 変異マウスの腸管上皮では、*Apc* 遺伝子の欠損 (LOH; loss of heterozygosity) による Wnt 経路の活性化だけでは微小腺腫しか形成されず、腫瘍の成長には腫瘍間質での COX-2 の発現誘導に加えて、腸上皮細胞での JNK の活性化により引き起こされる mTOR complex 1 (mTORC1) 経路の活性化が重要である (Fujishita T., et al., Gastroenterology, 2011)。しかしながら、この JNK の活性化メカニズムは明らかになって

いない。JNK は TLR 経路や炎症性サイトカイン等の自然免疫応答に関わる因子により活性化されることが知られている。そこで、腫瘍における JNK-mTORC1 経路の活性化に自然免疫が関与するか検討する。

(2) 「*cis-Apc/Smad4* マウスを用いたがんの浸潤・転移における免疫系の役割の解析」

cis-Apc^{+Δ716}/*Smad4*^{+/-} (以下 *cis-Apc/Smad4*) 変異マウスは *Smad4* の欠失アリルを *Apc* の変異アリルと同じ染色体上に持ち、*Apc* に LOH が生じる際に *Smad4* も同時に欠失する結果、Wnt 経路の活性化に TGF-beta 経路の不活性化を伴うことになり、強い局所浸潤能を持った腺がんを発症することが明らかになっている (Takaku K., et al., Cell, 1998)。 *cis-Apc/Smad4* 変異マウスを用いた解析により、腫瘍上皮細胞から分泌されるケモカイン CCL9 によって、その受容体 CCR1 を発現する未分化骨髄球が浸潤先端に誘引されることが報告されている (Kitamura T., et al., Nature Genetics, 2007)。しかしながら、免疫応答の異常が浸潤に関与するかどうか、マウスを用いた *in vivo* での検討はされていない。そこで、 *cis-Apc/Smad4* 変異マウスに化学的に腸炎を引き起こし、慢性炎症が浸潤能に影響するか検討する。また、腸には免疫細胞が多く存在しており、腸内細菌叢の状態が免疫機能に影響を及ぼすことが明らかになってきていることから、 *cis-Apc/Smad4* 変異マウスに抗生剤を投与して腸内細菌を除去し、浸潤過程に変化がみられるか調べる。

3. 研究の方法

(1) 「JNK-mTORC1経路による腫瘍形成における自然免疫の関与」

腫瘍における JNK-mTORC1 経路の活性化に TLR 経路が関与するか調べるため、TLR のアダプター分子 MyD88 の欠失が *Apc* 変異マウスの腫瘍形成に与える影響を検討する。腸上皮細胞における機能を調べるため、腸上皮特異

的、タモキシフェン依存的にCreを発現する *Villin-CreERT2* マウスと *MyD88flox* マウスを用いて、*MyD88flox/flox Apc Villin-Cre* 変異マウスを作出する。この変異マウスにおいて、*Apc* 変異マウスでみられる腫瘍の発生やサイズが減少しているか、生存率の回復がみられるか調べる。2011年にHans Cleversらのグループにより、腸上皮細胞の初代培養細胞を得る方法が確立された (Sato T., *Gastroenterology*, 2011)。この方法に倣い、野生型マウスの正常腸管上皮細胞と *Apc* 変異マウスの腫瘍から初代培養細胞を作成し、JNK-mTORC1経路活性化の分子メカニズム解明にも取り組む。また、野生型マウスの腸管正常部位と *Apc* 変異マウスの腫瘍を用いたマイクロアレイ解析を行い、腫瘍においてJNKを活性化する可能性のある因子を探索する。

(2) 「*cis-Apc/Smad4* マウスを用いたがんの浸潤・転移における免疫系の役割の解析」

局所浸潤能を持った腺がんを発症する *cis-APC/Smad4* 変異マウスを用いて、免疫系が浸潤過程に影響するか検討する。腸には免疫細胞が多く存在しており、腸内細菌叢の状態が免疫機能に影響を及ぼすことが明らかになってきている。そこで、*cis-Apc/Smad4* 変異マウスに抗生剤 (Ampicillin, Vancomycin, Neomycin, Metronidazole) を投与して腸内細菌を除去し、浸潤の程度に変化がみられるか調べる。浸潤の増加が認められた場合には、浸潤部位で細胞数などが大きく変化している細胞の種類 (マクロファージ、リンパ球、好中球、未分化骨髄球などの免疫細胞や線維芽細胞等)、組織を免疫組織染色により同定する。

4. 研究成果

(1) 「JNK-mTORC1 経路による腫瘍形成における自然免疫の関与」

野生型マウスの腸上皮細胞および *Apc* 変異マウスの腫瘍から初代培養細胞を得た。これらの初代培養細胞における JNK-mTORC1 経路

の活性化状態を調べたところ、いずれの細胞においても JNK および mTORC1 経路の活性化はみられなかった。初代培養細胞を JNK 活性化因子で処理したところ、JNK および mTORC1 経路の活性化がみられた。このことから、腫瘍における JNK-mTORC1 経路の活性化は細胞自律的なものではなく、細胞外因子によるものと考えられる。マイクロアレイ解析の結果、腸管正常部位と比べ *Apc* 変異マウスの腫瘍では炎症性サイトカインの発現が増加していた。リアルタイム PCR 法により炎症性サイトカインの発現変化を調べたところ、腫瘍部位における IL-1beta 等の増加が確認された (図1)。これら炎症性サイトカインが JNK 活性化因子の候補として挙げられる。

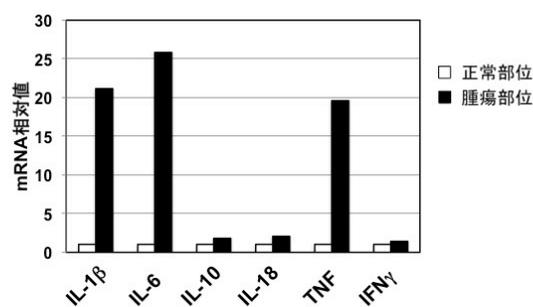


図1: 炎症性サイトカインの発現

また、この活性化に自然免疫が関与するか調べるため、*MyD88flox/flox Apc Villin-CreERT2* 変異マウスを作出した。タモキシフェンにより *MyD88* の欠失を誘導し、*MyD88* の欠失による腫瘍形成への影響等の解析を進めている。

(2) 「*cis-Apc/Smad4* マウスを用いたがんの浸潤・転移における免疫系の役割の解析」

cis-Apc/Smad4 変異マウスに5週齢から抗生剤を投与し、13-14週齢で安楽死させ腸管を採材した。小腸、大腸における腫瘍の数を調べたところ、腸内細菌の除去が大腸の腫瘍形成に影響を及ぼすことを示唆する結果を得た。*cis-Apc/Smad4* 変異マウスでみられる局所浸潤は、腫瘍がある程度の大きさになら

ないと見られない。したがって、腸内細菌叢の変化が浸潤に与える影響を調べるため、腫瘍がある程度成長している 10 週齢から抗生剤を投与することを計画している。

今後のさらなる解析により、腸における腫瘍形成や浸潤における自然免疫の関与の一端が明らかにされると期待される。

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 0 件)

〔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

梶野 リエ (KAJINO, Rie)

愛知県がんセンター (研究所)・分子病態

学部・研究員

研究者番号 : 2 0 6 3 3 1 8 4