

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861190

研究課題名(和文)大腸上皮特異的複合遺伝子改変マウスモデルを用いた大腸癌転移関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) Investigation of metastasis related genes based on conditional knock out mouse model

研究代表者

下村 学 (Shimomura, Manabu)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：60457249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Apc とTgfbr2 遺伝子が大腸上皮特異的にノックアウトされた大腸癌自然発生マウスモデルの作製に成功した。形成された腫瘍のtotal RNAを用いて遺伝子発現を網羅的に解析し、Tgfbr2 の変異移入に伴って高度に発現上昇する遺伝子Xを同定した。in vitroにて大腸癌細胞株でXをノックダウンすると細胞増殖能は有意に低下し、逆にXを強制発現すると細胞増殖能は有意に上昇することが確認され、遺伝子XがTGF-シグナルに制御され、大腸癌において細胞増殖を亢進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have generated an in vivo model system that Apc and Tgfbr2 were inactivated only in the colonic epithelium and tumors with well differentiated enocarcinoma arose mainly in proximal colon. Total RNAs of cancerous tissue areas were extracted, and we compared gene expression profiles of these mice's tumors. We identified Gene X expression was most highly upregulated compared with control mice. The array data was validated by quantitative PCR. The cell proliferation assay revealed that silencing of X led to a significant reduction in CRC cell proliferation. Conversely, forced expression of X enhanced CRC cell proliferation in vitro. The analysis of this model revealed that Gene X is regulated by a TGFbeta signal and likely promotes cell proliferation in CRC.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

進行大腸癌では外科的切除が唯一の根治的治療であり、切除不能な遠隔転移を有する症例に対しては、新規抗癌剤の開発により生存期間の延長を認めるものの、その予後は未だ不良である。このため更なる生存の向上を目指した新規抗癌剤の開発や、より効果的な治療予測が可能なバイオマーカー開発が急務である。

近年、遺伝子改変技術が進歩し、様々な疾患マウスモデルが開発され、生理的環境での腫瘍の動態を解析することが可能となった。私共は、CDX2のプロモーター領域の転写調節配列を用いて Cre/loxP システムを利用し、マウスの大腸上皮細胞でのみ目的遺伝子の発現を調節できるマウス (*CDX2-Promoter-NLS-Cre*, *CPC* マウス) を作製し、このマウスを用いて大腸上皮でのみ *Apc* 遺伝子をノックアウトさせる独自の大腸癌自然発癌マウスモデル (*CPC;APC* マウス) の作製に成功した。このマウスは大腸上皮特異的に癌抑制遺伝子である *Apc* の一つの対立遺伝子が欠損しており、大腸浸潤癌が自然発生する。しかしながら遠隔転移は形成されず、転移能を有するより悪性度の高い腫瘍が自然発生するマウスモデルの作製には、*Apc* と adenoma-carcinoma sequence における他の大腸癌関連遺伝子との複合的な変異が必要であると考えられた。このような背景から、私共は大腸上皮特異的 *Apc*、*Kras* 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、adenoma-carcinoma sequence における大腸癌の発生に重要な役割を持ち、進行再発大腸癌に対する抗 EGFR 抗体療法における治療効果予測因子である *Kras* 遺伝子変異を有する大腸癌自然発癌マウスモデルの作製に世界で初めて成功し、*Kras* 遺伝子変異大腸癌の遺伝子プロファイルを解析し、大腸腫瘍における RAS シグナルによる Glucose transporter 1 (GLUT1) の制御を証明した。しかしながら本

マウスに形成される腫瘍は、仮説の通り、悪性度の高い浸潤癌が形成されるものの、遠隔転移は認めなかった。本マウスは *Kras* 遺伝子変異特異的な腸粘膜の脱出のために、腫瘍の発生とは無関係に発育が不良で、遠隔転移が形成される前にマウスが死亡するためと考えられ、この克服には他の遺伝子変異との組み合わせが必要と考えられた。TGF- β II 型受容体遺伝子 (*TGFBR2*) の変異は大腸癌の約 30% に認められ、adenoma-carcinoma sequence において遠隔転移の形成に重要であり、大腸癌における新規治療標的として有望な候補である。APC 変異を利用した小腸新生物マウスモデルにおいて、APC 変異と *TGFBR2* の変異は相互作用的に小腸腫瘍の悪性を誘導することが既に報告されている。そこで私たちの持つ実験技術を応用し、大腸上皮特異的 *Apc* ノックアウトマウスに対して、*Tgfbr2* 遺伝子を大腸上皮特異的にノックアウトすることにより、より高悪性度の腫瘍発生が期待され、自然発生の大腸癌遠隔転移マウスモデルが作製可能と考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

私共は本研究室で作製した自然発生による大腸浸潤癌モデルである大腸上皮特異的 *Apc* ノックアウトマウスを応用し、複合的な大腸癌関連遺伝子の変異マウスを作成し、発癌から転移までの過程を生による生理学的条件で再自然発現した大腸癌転移マウスモデルの構築を試みている。本研究では大腸上皮特異的 *Apc* ノックアウトマウスに対して、大腸癌の発生に重要な役割を持つ TGF- β II 型受容体遺伝子 (*Tgfbr2*) を大腸上皮特異的にノックアウトすることにより、自然発生の大腸癌遠隔転移マウスモデルを作製し、これを応用した実験系により転移関連遺伝子の確立と共に、TGF シグナリングを標的とする新規分子標的治療の確立を目的とした。

3. 研究の方法

大腸癌自然発生マウスモデルである CPC ; APC マウスと *Tgfr2*^{loxP/loxP} マウスの交配により、*Apc*、*Tgfr2* 遺伝子を大腸上皮のみにノックアウトする大腸癌自然発生モデルを作製する。作製したモデルから経時的に、腫瘍の発生と遠隔転移の発生の有無を観察する。腫瘍組織からマイクロダイセクション法を用いて大腸上皮細胞を採取し、total RNA を抽出して網羅的遺伝子解析を行い腫瘍の遺伝子プロファイリングを CPC ; APC マウスと比較し、転移関連バイオマーカー遺伝子を選択する。得られた新規標的遺伝子候補群に関して、臨床で得られたヒト大腸癌検体を解析することによって臨床上有用であるかを検討する。

4. 研究成果

我々は大腸上皮特異的に *Apc* がノックアウトされる大腸癌マウスモデル '*CDX2P-G19Cre;Apcflox/flox mice*' (以下, *Apc* KO mice) を報告してきた。今回, *Tgfr2flox/flox mice* と *Apcflox/flox mice* と *CDX2P9.5-G19Cre mice* を交配し, 最終的に *Apc* と *Tgfr2* が大腸上皮特異的にノックアウトされる '*CDX2PG19Cre;Apcflox/flox;Tgfr2flox/flox mice*' (以下, *Apc+Tgfr2* KO mice) を作製した。このマウスモデルでは近位大腸に高分化腺癌が形成されたが, ほとんどが4週齢までに腫瘍出血死した。そこで3週齢でマウスの全大腸を摘出し形成された腫瘍を観察し回収した。レーザーマイクロダイセクション法で抽出した癌組織のtotal RNAを用い, *Apc* KO mice 腫瘍 (n=3) と *Apc+Tgfr2* KO mice 腫瘍 (n=3) の遺伝子発現を網羅的に解析したところ, *Tgfr2* KOに伴い19.25倍に発現上昇していた遺伝子 *X* を同定した (p=0.045)。免疫組織化学的染色で *X* の発現を評価し, 全体の癌組織に占める免疫染色される癌細胞の割合が30%以上を陽性と判定した。*TGFR2* 変異ヒト大腸癌症

例11例中11例(100%)が *X* 発現陽性であったのに対して, マイクロサテライト安定大腸癌症例15例中10例(66.7%)が *X* 発現陽性であり (p=0.033), ヒト大腸癌サンプルにおいて *X* の高発現は *TGFR2* 変異と相関しているということが示唆された。さらに, *in vitro* にて大腸癌細胞株で *X* をノックダウンすると細胞増殖能は有意に低下し, 逆に *X* を強制発現すると細胞増殖能は有意に上昇した。以上の結果から大腸上皮特異的に *Apc* と *Tgfr2* をノックダウンして近位大腸で高分化腺癌を形成する *in vivo* マウスモデルを作製, 解析し, 遺伝子 *X* が TGF-シグナルに制御され, 大腸癌において細胞増殖を亢進していることが示唆された。

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 2 件)

1. Miguchi M, Hinoi T, Shimomura M, et al; The generation of colorectal cancer mouse model based on microsatellite instability and the identification of transforming growth factor-beta signal target, AACR annual meeting 2015 年 4 月 20 日、フィラデルフィア (U.S.A)

2. マイクロサテライト不安定大腸癌マウスモデルの作製と TGF-シグナルターゲットの同

定、三口真司、檜井孝夫、下村 学ほか：第70回日本消化器外科学会総会、2015年7月15日、浜松

〔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

下村 学 (Shimomura Manabu)
広島大学・大学病院・医科診療医
研究者番号：60457249

(4)研究協力者

檜井 孝夫 (Hinoi Takao)

研究者番号： 10444689