

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460472

研究課題名(和文)慢性炎症による腸管発癌のドライバー遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of driver genes in inflammation-related intestinal tract carcinogenesis

研究代表者

岡田 太 (Okada, Futoshi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00250423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の炎症発癌におけるドライバー遺伝子の同定を目的に、マウスの腸管上皮組織を3次元培養下で再構築し、どの遺伝子変化が炎症性の発癌と結びつくのかを検討した。炎症の誘発には生体外異物を用いた。K-ras遺伝子変異を有するマウスから得た腸管組織を慢性炎症下に置くとdormant腫瘍を形成した。p53遺伝子ホモ欠損マウスから得た腸管組織を慢性炎症下に置くと致死増殖した。しかし、急性炎症下では致死増殖腫瘍は観察されなかった。また、p53遺伝子ヘテロ欠損マウスの腸管組織も観察されなかった。以上より、慢性炎症による腸管発癌において、p53遺伝子変異が極めて重要な役割を担うことを見いだした。

研究成果の概要(英文)：I tried to determine driver genes in inflammation-related intestinal tract carcinogenesis by using three-dimensional tissue culture system. Solid surface foreign-body such as plastic plate was used to induce inflammation. Reconstitutive intestinal tract obtained from K-ras mutant mice formed dormant tumors under chronic inflammation in mice. Intestinal tissue obtained from p53^{-/-} mice developed lethal tumors under chronic inflammation; however, the tissue spontaneously regressed under acute inflammation. Moreover, intestinal tissue obtained from p53^{+/-} mice does not form tumors in the chronic inflammatory environment. I found that p53 gene mutation has a role in the development of inflammation-related intestinal carcinogenesis.

研究分野：実験病理学

キーワード：炎症発癌 慢性炎症 ドライバー遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト発癌要因の中で、炎症の占める割合は約25%と推計されている()。大腸癌においても炎症がリスク因子となることが示されて久しい。一方で、大腸発癌における遺伝子変化の蓄積は、人類が最初に示した“多段階発癌”の分子機構でもある。大腸癌は、散発性大腸癌(adenoma-carcinoma sequence)と、炎症性大腸癌(dysplasia-carcinoma sequence)に大別されるが、主要な遺伝子変化(p53, DCC/DPC4, K-ras, APC)はほぼ共通し、発癌過程のどの進展段階に突然変異が導入されるのかが異なる。しかしながら、どの遺伝子変化が炎症による発癌と直接結びつくのかは不明のままである。この因果関係が解決されなかった理由として、炎症反応を限局して誘導する仕組みが整わなかったことと、腸管から得た正常上皮細胞の遺伝子発現を自在に調節し、長期培養できる方法論が無かったことが挙げられる。

(2) 申請者は、上記の課題を鑑み、解決に結びつく2つの仕組みに思い当たった。第一に、申請者が開発した異物による炎症を限局して誘導できる仕組みを活用する。異物炎症を用いて、1) ヒト大腸腺腫細胞の炎症による発癌モデルを確立し()、2) 急性炎症では癌化に不十分であり慢性炎症が必要であること()、3) 増生線維に由来する一酸化窒素(Nitric oxide)が癌化の主因となること()、4) 炎症の存在は発癌の正所臓器(大腸)以外に異所(皮下)においても癌化を進展させることなどを報告してきた()。第二に、正常腸管上皮の遺伝子発現をshRNAにより調節後、組織を再構築して長期観察ができる3次元培養による組織再構築法に着目した。この技術は、国立がん研究センター研究所筆宝義隆博士らが確立し()、申請者は、同博士との研究連携協定を終え、当該技術は既に導入済みである。

(3) 本申請課題は、大腸発癌関連遺伝子(p53, DCC, K-ras, APC等)発現を調節した腸管上皮細胞を用いて3次元組織再構築体を作製し、これを異物に付着させた後にマウスに生じさせた炎症環境下に置く手法をとる。これによって、どの遺伝子変化が炎症発癌のドライバー遺伝子となるのかを同定することができる。さらに、予てより炎症発癌研究の懸案であった発癌を促すシグナル分子の探索に挑むことが叶う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症による腸管発癌のドライバー遺伝子を決定する。さらに、ドライバー遺伝子により駆動する発癌シグナル分子の解

析を最終目標にする。本研究より、炎症および上皮細胞の双方の観点から炎症発癌の新たな分子機構を提示する。

3. 研究の方法

(1) 正常腸管上皮細胞の癌抑制遺伝子の抑制と癌遺伝子の活性化：腸管は遺伝子改変マウスから得る。これにより、炎症下で発癌する腸管上皮細胞を宿主由来の細胞と区別することができる。常法()に従い、マウス大腸あるいは小腸から上皮細胞を腺管単位で剥離する。

癌抑制遺伝子(p53, DCC, APC)は、shRNAを用いレンチウイルスを介して発現を抑制する。腸管は、移入組織に由来することを識別するためにGFPトランスジェニックマウスから得る。

癌遺伝子(K-ras)は、LoxP-Stop-LoxP-K-ras^{G12D}ノックインマウスを用いて、これの腸管上皮組織を剥離した後にレンチウイルスを介してCreを発現し、変異型K-rasアレール発現(活性化)を誘導する。

目的通りにp53, DCC, APCが発現抑制されていること、およびK-ras^{G12D}が活性化されていることをWBおよびpull-downアッセイにて確認し、3次元培養による細胞再構築体を作製する。

(2) 炎症による腸管発癌のドライバー遺伝子の探索：2種の生体外異物の移入によって惹起される炎症を活用する。一つ目の異物は、移入数週間以内に体内に自然吸収され、炎症反応が消退するゼラチンスポンジを用いた急性炎症発癌モデル()を用いる。二つ目の異物は、急性期から慢性期の炎症へ自然移行するプラスチックプレートを用いた慢性炎症発癌モデル()を用いる。(1)の研究で作製される3次元細胞再構築体を上記2種類の異物とともに移入して発癌の有無を観察する。この段階で炎症発癌のドライバー遺伝子と、発癌に必要な炎症の質(急性もしくは急性と慢性の双方)が明らかにされる。

急性炎症による発癌評価()

- 1) ノードマウス皮下に小切開を加えてゼラチンスポンジ(3×5×10 mm)を移入する。
- 2) 3次元細胞再構築体(1×10⁶個)を移入スポンジ内に接種する。
- 3) 切開部分を縫合クリップで留める。

慢性炎症による発癌評価()

- 1) プラスチックプレート(1×5×10 mm)上にマトリゲルを薄塗し、この上に3次元細胞再構築体(1×10⁵個)を付着させる。
- 2) ノードマウス皮下に小切開を加えて移入し、切開部はクリップで留める。発癌した際には、炎症によるメチル化の

関与の有無を明らかにするため、脱メチル化剤 (5-aza-dc, 125 μg/kg, 腹腔内投与, 週 2 回) を投与する群を加え、再度発癌頻度を比較する。

移入局所の組織を経時的に回収し、以降の解析のためにタンパク質と核酸を抽出・保存する。また、免疫組織染色用に一部組織を固定保存する。

増殖腫瘍は細胞株として樹立し、以降の実験に備える。また、発癌は組織学的に検証する。発癌組織は移入した腸管上皮由来であることを示すために、GFP トランスジェニックマウスの場合には GFP タンパク質の WB を、K-ras^{G12D} 遺伝子ノックインマウスの場合には、Neo 遺伝子の PCR により検証する。

対照群は、異物移入を行わない 3 次元細胞再構築体の単独移植とする。

(3) 炎症による腸管発癌のドライバー遺伝子の検証

増殖腫瘍から樹立した培養細胞株に、発癌前の細胞再構築体に加えた遺伝子発現を解除 (抑制の場合には強制発現, 活性化の場合には抑制) して、造腫瘍性が喪失することで腸管発癌のドライバー遺伝子であることの検証を試みる。

(4) 炎症発癌を促すシグナル解析

腸管発癌のドライバー遺伝子により駆動するシグナル分子を明らかにするため、移入した細胞再構築体と、そこから発癌した細胞の各々から細胞株を樹立し、特徴的な分子を探索する。DNA マイクロアレイ解析と二次元電気泳動を施行し、炎症性転写因子、炎症性サイトカインやケモカインに焦点を当てて標的分子を絞り込む。

異物とともに移入した 3 次元細胞再構築体と、そこから発癌した細胞から各々細胞再構築体を作製し、それぞれの mRNA を回収して DNA アレイ解析を行う

加えて、各オルガノイドからタンパク質を抽出し、二次元電気泳動 (2DE) を施行する

アレイ解析とプロテオミクス解析の結果から候補分子を両解析に共通分子の観点から絞り込みを行う。

炎症局所における候補分子発現を WB, 免疫組織染色もしくは qRT-PCR 法にて検証する。

4. 研究成果

(1) 腸管の炎症発癌におけるドライバー遺伝子の同定を目的に、マウスの腸管上皮組織を 3 次元培養下で再構築し、多段階発癌過程のどの遺伝子変化が炎症性の発癌に結び付くの

かを検討した。炎症の誘発は生体外異物を用いた。現在までのところ、K-ras 遺伝子変異を有する雄マウスから得た腸管組織を雌のヌードマウスに生じさせた慢性炎症下に置くと触知可能な dormant 腫瘍を一部の移植マウスに形成した。しかしながら、1 年を超えた観察を行っても致死増殖する個体は観察されなかった。

(2) 同様の実験条件下において、p53 遺伝子ホモ欠損マウスから得た大腸組織を慢性炎症下に置くと、移植 90 日以降より増殖を開始し、最終的に致死増殖した。増殖腫瘍は移植した腸管組織に由来することは、組織を得た雄マ

慢性炎症下における大腸オルガノイドの腫瘍化 driver としての p53 遺伝子の証明												
	腫瘍増殖性 (*p<0.01 vs WT)											
	慢性炎症 (-)					慢性炎症 (+)						
	WT	p53 ^{+/+}	p53 ^{-/-}	活性化 K-ras	APC KO	WT	p53 ^{+/+}	p53 ^{-/-}	活性化 K-ras	APC KO	K-ras +APC	
大腸オルガノイド	0/8	0/9	0/9	0/8	0/6	9/9*	0/8	0/9	9/9*	0/8	0/6	9/9*
小腸オルガノイド	0/8	0/9	0/9	0/8	1/6	9/9*	0/8	0/9	0/9	0/8	2/6	9/9*

ウスに由来する Y 染色体を指標として検証した。しかし、p53 遺伝子ホモ欠損マウス由来の小腸上皮組織を用いても腫瘍増殖する個体は観察されなかった。また、p53 遺伝子ホモ欠損マウスから得た大腸上皮組織ならびに小腸上皮組織を急性炎症下に置いても致死増殖する腫瘍は観察されなかった。さらに、p53 遺伝子ヘテロ欠損マウスの大腸もしくは小腸組織を急性炎症下、もしくは慢性炎症下に置いても致死増殖する腫瘍は観察されなかった。

(3) K-ras 遺伝子変異と APC 変異を有する大腸あるいは小腸組織は、炎症環境下での存在の有る無しに関わらず癌化した。

(4) p53 遺伝子が腸管の炎症発癌のドライバー遺伝子として想定されたが、出現した腫瘍組織が当初の予想と異なり線維肉腫であった。この事実より、以下の 3 つの可能性を考えた。第一に、腸管組織から上皮細胞を腺管単位で剥離する際に混在した線維芽細胞ががん化した場合。第二に、上皮由来の癌化を果たしたが p53 遺伝子ホモ欠失を伴うことで上皮-間葉分化転換を起こした場合。第三に、p53 遺伝子に加算して働くドライバー遺伝子がほかに存在する場合を考えた。第一の可能性は、腸管組織採取時に細胞クローニングを行い、上皮細胞であることを確認後に検証実験を試みたが、クローニングに成功せず現在も試行中である。また、第二の可能性は、増殖腫瘍から培養株を得て、これに Bone morphogenic protein 等の間葉-上皮分化転換に関わる因子を添加培養しても間葉系細胞形態である紡錘形から上皮系細胞形態である敷石状への転換は認められなかった。第三の可能性は、今後

も継続して解析を行う予定にある。以上より、慢性炎症による腸管発癌において、p53 遺伝子変異が極めて重要な役割を担うことを見いだした。しかし、最終結論に至るには今後の検討を継続する必要がある。

<引用文献>

Okada F. Inflammation-related carcinogenesis: current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms. *Yonago Acta Med.*, 57 巻, 2014 年, 65-72

Okada F, Kawaguchi T, Habelhah H, Kobayashi T, Tazawa H, Takeichi N, Kitagawa T, Hosokawa M. Conversion of human colonic adenoma cells to adenocarcinoma cells through inflammation in nude mice. *Lab Invest* 80 巻, 2000 年, 1617-1628

Tazawa H, Kawaguchi T, Kobayashi T, Kuramitsu Y, Wada S, Satomi Y, Nishino H, Kobayashi M, Kanda Y, Osaki M, Kitagawa T, Hosokawa M, Okada F. Chronic inflammation-derived nitric oxide causes conversion of human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 319: 2835-2844, 2013. *Int. J. Cancer*, 121 巻, 2007 年, 2364-2372

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. U.S.A.*, 110 巻, 2013 年, 11127-11132

Tazawa H, Okada F, Kobayashi T, Tada M, Mori Y, Une Y, Sendo F, Kobayashi M, Hosokawa M. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: Implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am. J. Pathol.*, 163 巻, 2003 年, 2221-2232

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5件)

Kimura Y, Nagai N, Tsunekawa N, Sato-Matsushita M, Yoshimoto T, Cua D, Iwakura Y, Yagita H, Okada F, Tahara H, Saiki I, Irimura T and Hayakawa Y.

IL-17A-producing CD30+ V β 1 T cells drive inflammation-induced cancer progression. *Cancer Sci.*, 査読有, 107 巻, 2016 年, 1206-1214, DOI:10.1111/cas.13005

Otsuki N, Konno T, Kurahashi T, Suzuki S, Lee J, Okada F, Iuchi Y, Homma T and Fujii J. The SOD1 transgene expressed in erythroid cells alleviates fatal phenotype in congenic NZB/NZW-F1 mice. *Free Radic. Res.*, 査読有, 50 巻, 2016 年, 793-800, DOI:10.1080/10715762.2016

Hirahata M, Osaki M, Kanda Y, Sugimoto Y, Yoshioka Y, Kosaka N, Takeshita F, Fujiwara T, Kawai A, Ito H, Ochiya T and Okada F. PAI-1, a target gene of miR-143, regulates invasion and metastasis by up-regulating MMP-13 expression of human osteosarcoma. *Cancer Med.*, 査読有, 5 巻, 2016 年, 892-902, DOI:10.1002/cam4.651

Fanhchaksai K, Okada F, Nagai N, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Hatano S, Makino S, Nakamura T and Watanabe H. Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth. *Int. J. Cancer*, 査読有, 138 巻, 2016 年, 630-641, DOI:10.1002/ijc.29804

Takenobu M, Osaki M, Fujiwara K, Fukuhara T, Kitano H, Kugoh H and Okada F. PITX1 is a possible predictor of the response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Clin. Oncol.*, 査読有, 5 巻, 2016 年, 89-94, DOI:10.3892/mco.2016.880

[学会発表](計2件)

岡田 太, 異物誘発炎症による発癌・悪性化進展, 第25回日本がん転移学会 2016年7月22日, 米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)

岡田 太, 炎症発がん予防への実験的挑戦, 第23回日本がん予防学会総会, 2016年7月2日, 名古屋大学大学院医学系研究科基礎研究棟第4講義室(愛知県名古屋市)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：

<https://byoutaiseikagaku.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 太 (OKADA, Futoshi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00250423

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：