

唆された。従って、*Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型が与える放射線誘発胸腺リンパ腫感受性と *p53*^{KO/+}遺伝子型がもたらすそれとは、機構という点で異なることが示唆される。前者は分化障害による特別な細胞の増加とその細胞増殖に、後者は変異誘発の抑制に働くと考えられる。

*Lck-Cre;Bcl11b-flox/+*マウスを作製し、クローナルに異常増殖する胸腺細胞が放射線照射後に出現するかどうかを調べた。このマウスでは、DN2 分化段階以降の胸腺細胞で *Bcl11b*^{KO/+}となるので、DN2 分化段階以降の細胞が発がん母体となる、と考えられる。一方、クローナル増殖を示す前リンパ腫細胞の約半数は、未分化な形質をもつ傾向にあることがわかった。高い分化度を示すマーカーと未分化な分化度を示すマーカーが同時にもつ細胞が出現していることがわかった。

クローナル増殖する前がん胸腺細胞はすでに変異をもつことをすでに報告している。この変異を誘発する機構は不明であるが、V(D)J 組換えに働く RAG1/2 酵素が組換え領域以外の DNA を誤って切断し、変異を導入する可能性が指摘されている。実際、胸腺リンパ腫でみられるがん遺伝子・Notch1 の活性化変異や *Bcl11b* 遺伝子領域にみられる染色体脱落も、RAG1/2 酵素によることがわかっている。CD8SP 細胞は TCR α 座と TCR β 座の組換えを2回経験し、TCR β 座の組換えだけを経験する ISP 細胞と比べ、変異が誘発される可能性は高いはずである。このことも、CD8SP 細胞が胸腺リンパ腫発症の母体細胞である可能性を支持する。

D-2 照射後の細胞増殖への影響

Bcl11b^{KO/+}マウスに12Gy、1回の全身照射を行い、16時間後に腸管上皮細胞の増殖と移動を観察した。野生型マウスでは照射により、移動の抑制が強く観察されたが、*Bcl11b*^{KO/+}マウスではその抑制は減弱していた。この移動の抑制は増殖の抑制に起因すると考えられる。実際、増殖マーカー

・Ki-67の染色やBrdU取り込み実験でも、照射後の腸管細胞増殖の抑制が観察された。また、移動細胞分布は非照射、照射後の野生型マウスに比べ幅広くなっていた。これは、移動抑制の減弱が一様でないことを示唆する。これらの結果は、*Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型が照射による細胞増殖、細胞移動の阻害に影響を与えることを意味する。

BrdU取り込み実験では増殖抑制が顕著に見られた細胞は、いわゆる幹細胞領域にある細胞であった。この細胞の増殖は主にWnt/ β -catenin経路により調節される。そこで、TOP/GALマウスを用い、12Gy照射後24時間の影響をみると、GAL陽性細胞は増加していることがわかった。すなわち、幹細胞は照射により増殖していること、細胞分裂が抑制されるのではなく、むしろ活性化されることがわかった。一方、TA細胞の分裂は抑制される。

腸管上皮細胞の増殖と移動が照射により抑制されるという現象には、p53遺伝子が関与すると予測される。そこで、p53染色の比較を行った。野生型マウスのクリプト内細胞では、p53陽性細胞が多数出現するが、その陽性細胞数は*Bcl11b*^{KO/+}マウスでは減少していた。従って、p53タンパク質の増加、安定化に*Bcl11b*が正に働くと考えられる。しかし、その機構は今後の課題として残る。

E 結論

放射線誘発胸腺リンパ腫の発がん母細胞、放射線の標的細胞の同定を試みた。*Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺細胞内に存在するCD8SP細胞は、分化障害と細胞増殖能亢進を示した。また、CD8SP細胞を含むDN2分化段階以降の胸腺細胞で*Bcl11b*^{KO/+}となるfloxマウスでも、クローナルに異常増殖する前リンパ腫細胞が照射後に出現した。これらの結果は、CD8SP細胞が放射線誘発胸腺リンパ腫の母体細胞の有力候補であることを示唆する。次に、照射後の

腸管上皮細胞の増殖と移動を検討した。*Bcl11b*^{KO/+}マウスで増殖抑制の減弱がみられ、それは特にTA細胞領域で顕著であった。また、移動の抑制も減弱しており、このとき p53 染色陽性細胞数も減少していた。これらの結果は、放射線照射は p53 を介し増殖抑制をもたらすが、このとき *Bcl11b* を必要とすることを示唆する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikawa, T., Hirose, S., Masuda, K., Kakugawa, K., Satoh, R., Shibano-Satoh, A., Kominami, R., Katsura, Y. and Kawamoto, H. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science*, 329: 93-96 (2010).
2. Go, R., Hirose, S., Morita, S., Yamamoto, T., Katsuragi, Y., Mishima, Y. and Kominami, R. *Bcl11b* heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in γ -irradiated mice. *Cancer Science*, 101: 1347-1353 (2010).
3. Yamamoto, T., Morita, S., Go, E., Obata, M., Katsuragi, Y., Fujita, Y., Maeda, Y., Yokoyama, M., Aoyagi, Y., Ichikawa, H., Mishima, Y. and Kominami, R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in γ -ray induced mouse atrophic thymus. *Int. J. Radiation Oncology*

Biol, 77: 235-243 (2010).

4. Okumura, H., Miyasaka, Y., Morita, Y., Nomura, T., Mishima, Y., Takahashi, S. and Kominami, R. *Bcl11b* Heterozygosity Leads to Age-Related Hearing Loss and Degeneration of Outer Hair Cells of the Mouse Cochlea. *Experimental Animals*, in press (2011).

2. 学会発表

1. Go, R., Hirose, S., Katsuragi, Y., Mishima, Y. Kominami, R. *Bcl11b* heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in gamma-irradiated. The 69th Annual Meeting of the Japanese cancer Association.
2. Sakamaki, A., Katsuragi, Y., Obata, M., Ochiai, M., Nakagama, H., Gondo, Y., Mishima, Y. Kominami, R. *Bcl11b* is an intestinal tumor suppressor that controls intestinal cell homeostasis. The 69th Annual Meeting of the Japanese cancer Association.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明

分担研究者 中島 淳
横浜市立大学附属病院消化器内科 教授

研究要旨

肥満および内臓脂肪型肥満は大腸がんの確実な促進因子であるが、内臓脂肪より分泌されるアディポサイトカインは重要な役割を担う。メトホルミンは AMPK を活性化させるが、本研究では大腸発がん抑制作用を検討した。ディポネクチン欠損マウスでは高脂肪食付加で有意なポリープの増加、細胞増殖の亢進を認めた。この機序として、アディポネクチン欠損と高脂肪食付加によって mTOR/S6K/S6pathway が活性化することが関与していた。大腸がんのハイリスク群に対するメトホルミンの腫瘍への作用を、大腸がんのサロゲートマーカーである ACF を色素拡大内視鏡で観察し1カ月間の投与で ACF は有意に減少した。今後、前向き無作為化試験により有効性を実証する必要がある。

A. 研究目的

肥満および内臓脂肪型肥満は大腸がんの確実な促進因子であるが、内臓脂肪より分泌されるアディポサイトカインは重要な役割を担う。アディポネクチン欠損マウスに高脂肪食を付加しポリープおよび細胞増殖の変化を解析する。糖尿病薬として臨床応用されているメトホルミンは AMPK を活性化させるが、本研究では大腸発がん抑制作用を検討する。

B. 研究方法

アディポネクチン欠損マウスに高脂肪食を付加しポリープおよび細胞増殖の変化を解析した。APC^{Min/+}マウスおよび AOM 誘発化学発がんマウスの2つのモデルを用い、メトホルミンの大腸腫瘍抑制作用を検討した。また、大腸がんのハイリスク群に対しメトホルミンを1カ月投与し、大腸がんのサロゲートマーカーである ACF の変化を検討した。

（倫理面への配慮）

ヒトを対象とした研究は内視鏡的観察のみの非侵襲的なものである。本研究に参加することによる被験者の不利益については、発生しないと考えている。万が一、不利益が発生した場合には十分な対

処を行う体制である。本研究は横浜市立大学倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

アディポネクチン欠損マウスでは高脂肪食付加で有意なポリープの増加、細胞増殖の亢進を認めた。この機序として、アディポネクチン欠損と高脂肪食付加によって mTOR/S6K/S6pathway が活性化することが関与していた。また、アディポネクチンの発がん抑制作用は Adipo R1 の標的分子である AMPK を介しことが示唆された。大腸がんのハイリスク群に対するメトホルミンの腫瘍への作用を、大腸がんのサロゲートマーカーである ACF を色素拡大内視鏡で観察し検討した。1カ月間の投与で ACF は有意に減少した。

D. 考察

アディポネクチン欠損マウスの結果から肥満関連大腸発がんには AMPK/mTOR 経路が重要であることを見出し、その活性化薬であるメトホルミンは発がんモデルマウスにおいて糖脂質代謝およびアポトーシスには作用せず、腫瘍増殖に対し抑制的に働いていた。ヒトに対するパイロットスタディーでは ACF を大腸がんのサロゲートマーカーとして用いたため、短

い観察期間で効果判定が可能となった。

E. 結論

本邦において大腸がんは増加しており、リスクファクターとして遺伝的要因のほか、肥満、糖尿病など生活習慣病としての一側面を持つため、これらの改善およびメトホルミンなど抗糖尿病薬が大腸発がん予防となる可能性がある。前向き無作為化試験により有効性を実証する必要がある。また、対象を大腸腺腫とした場合の有効性も確認する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Uchiyama T, Suzuki K, Nozaki Y, Yoneda K, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Tomatsu A, Chihara T, Shimpo K, Nakagama H, Nakajima A: Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Molecular Carcinogenesis*, 2010, 49 (7): 662-671.
2. Nakajima A, Endo H, Yoneda K, Fujisawa T, Sugiyama M, Hosono K, Nozaki Y, Takahashi H, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Shimamura T, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Wada K, Nakagama H: Molecular mechanisms linking adiponectin receptor signalling and cancer. *The Open Obesity Journal*, 2010, 2, 43-49.
3. Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Uchiyama T, Suzuki K, Iida H, Sakamoto Y, Yoneda K, Koide T, Tokoro C, Abe Y, Inamori M, Nakagama H, Nakajima A: Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(9): 1077-1083.
4. Takahashi H, Hosono K, Uchiyama T,

Sugiyama M, Sakai E, Endo H, Maeda S, Schaefer KL, Nakagama H, Nakajima A: PPARgamma ligand as a promising candidate for colorectal cancer chemoprevention: A pilot study. *PPAR Res* 2010, 2010. pii.

5. Uchiyama T, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Endo H, Hosono K, Yoneda K, Yoneda M, Inamori M, Nagashima Y, Inayama Y, Wada K, Nakajima A. Leptin receptor is involved in STAT3 activation in human colorectal adenoma. *Cancer Sci*. 2010 Nov 19.
 6. 内山崇, 高橋宏和, 中島淳: メタボリックシンドロームと大腸癌. *G.I. Research*, 先端医学社, 2010, 18 (3): 23-28.
 7. 高橋宏和, 内山崇, 中島淳: 性差からみた消化器疾患の病態と予後 内臓脂肪およびアディポネクチンと大腸発癌の性差. *消化器内科*, 2010, 50 (4): 315-319 .
 8. 高橋宏和, 細野邦広, 中島淳: Aberrant crypt foci とサプリメントの相関解析. *消化と吸収*, 2010, 32 (1): 43-46.
 9. 高橋宏和, 遠藤宏樹, 中島淳: 肥満と大腸癌. *肥満と消化器疾患*, 2010, 119-133.
- ##### 2. 学会発表
1. Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Takahashi T, Inamori M, Nakajima A: Leptin signaling regulates colorectal tumor growth through Stat3 signaling: tumor growth induced by dietary intake. *AACR 101st annual meeting*, Washington D.C., 2010, 4.
 2. Hosono K, Endo H, Nakajima A, Takahashi H: Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis via activating AMP-activated protein kinase. *AACR 101st annual meeting*, Washington

- D. C., 2010, 4.
3. Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Iida H, Fujita K, Takahashi H, Yoneda M, Inamori M, Kirikoshi H, Kubota K, Nakajima A: Critical role of leptin in the regulation of colorectal tumor growth through STAT3 signaling: tumor growth induced by dietary intake. DIGESTIVE DISEASE WEEK 2010, Poster Session (Poster of Distinction), New Orleans, 2010, 5.
 4. Hosono K, Endo H, Uchiyama T, Suzuki K, Iida H, Sakamoto Y, Takahashi H, Koide T, Tokoro C, Abe Y, Inamori M, Kubota K, Saito S, Ueda A, Miura T, Nakajima A: Capsule endoscopy findings in the small intestine of HIV carrier. DIGESTIVE DISEASE WEEK 2010, Poster Session, New Orleans, 2010, 5.
 5. Takahashi H, Sakai E, Uchiyama T, Sugiyama M, Hosono K, Endo H, Maeda S, Nakajima A: Analysis of aberrant crypt foci as an effective predictor after colorectal polypectomy. 2010 JCA, English Workshops (cancer prevention and chemoprevention), Osaka, 2010, 9.
 6. Hosono K: Investigation of gastrointestinal tract involvement of small intestine in HIV carrier by capsule endoscopy. 18th United European Gastroenterology Week, Poster Session, Barcelona, 2010, 10.
 7. Takahashi H, Sakai E, Sugiyama M, Uchiyama T, Iida H, Hosono K, Endo H, Sakamoto Y, Koide T, Tokoro C, Inamori M, Abe Y, Maeda S, Nakajima A: Analysis of human aberrant crypt foci after colorectal polypectomy. 18th United European Gastroenterology Week, Poster Session, Barcelona, 2010, 10.
 8. Takahashi H, Sakai E, Uchiyama T, Sugiyama M, Hosono K, Endo H, Nakajima A: Relationship of human aberrant crypt foci and formation of colorectal polyps. 9th annual AACR international conference frontiers in cancer prevention research, Poster Session, Philadelphia, 2010, 11.
 9. Hosono K, Takahashi H, Sakai E, Uchiyama T, Endo H, Nakajima A: Metformin treatment suppresses colorectal aberrant crypt foci in humans: Results from a short-term feasibility study. Frontiers in Cancer Prevention Research 2010, Poster Session, Philadelphia, 2010, 11.
 10. Sakai E, Endo H, Uchiyama T, Hosono K, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima A: The effect of resveratrol on azoxymethane (AOM)-induced colon carcinogenesis in mice with aberrant crypt foci (ACF). Frontiers in Cancer Prevention Research 2010, Poster Session, Philadelphia, 2010, 11.
 11. 細野邦広: 抗糖尿病薬メトホルミンを用いた生活習慣病における大腸癌の予防戦略. 第6回日本消化管学会総会学術集会 トピックフォーラム2 生活習慣病と消化管疾患, 福岡, 2010, 2.
 12. 内山崇, 高橋宏和, 中島淳: 大腸腫瘍におけるレプチンシグナル経路の解析. 第96回日本消化器病学会総会ワークショップ3 新潟, 2010, 4.
 13. 高橋宏和, 細野邦広, 内山崇, 飯田洋, 遠藤宏樹, 野崎雄一, 坂本康成, 藤田浩司, 米田正人, 古出智子, 所知加子, 後藤歩, 稲森正彦, 阿部泰伸, 小林規俊, 桐越博之, 窪田賢輔, 斉藤聡, 上野規男, 中島淳: 大腸腫瘍進展における糖尿病関連因子の相関解析. 第96回日本消化器病学会総

- 会 ポスター (大腸悪性臨床-5), 新潟, 2010, 4.
14. 細野邦広, 高橋宏和, 中島淳: 大腸癌における生活習慣関連因子の実態と化学予防による対策の可能性. 第96回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション2 (生活習慣病としての消化器疾患の実態と対策), 新潟, 2010, 4.
 15. 遠藤宏樹, 高橋宏和, 中島淳: 食事摂取により増大する大腸腫瘍: レプチンシグナルの関与. 第96回日本消化器病学会総会 シンポジウム6 (消化器がんと栄養療法), 新潟, 2010, 4.
 16. 中島淳, 高橋宏和: 肥満と大腸がん. なぜ, 今, 消化器病研究に肥満が重要か? トピックスセミナー (第28回日本医学会総会プレシンポジウム), 第96回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010, 4.
 17. 高橋宏和, 細野邦広, 中島淳: 大腸腺腫切除後の再発予測因子としての aberrant crypt foci の検討. 第49回日本消化器がん検診学会総会 シンポジウム2 (大腸がん検診における精検受診率の向上の方策), 沖縄, 2010, 6.
 18. 杉山美智子, 酒井英嗣, 内山崇, 篠原義康, 細野邦広, 遠藤宏樹, 高橋宏和, 中島淳: IL-6 の過剰発現による化学発癌モデルマウスにおける大腸ポリープの検討. 第69回日本癌学会学術総会 ポスター, 大阪, 2010, 9.
 19. 遠藤宏樹, 内山崇, 酒井英嗣, 杉山美智子, 細野邦広, 高橋宏和, 前田慎, 中島淳: レプチンによる Stat3 経路を介した大腸腫瘍増大の制御. 第69回日本癌学会学術総会 ポスター, 大阪, 2010, 9.
 20. 高橋宏和, 酒井英嗣, 内山崇, 杉山美智子, 細野邦広, 遠藤宏樹, 前田慎, 中島淳: 大腸線種切除後の線種再発予測因子としてのヒト ACF の検討. 第69回日本癌学会学術総会 English workshops, 大阪, 2010, 9.
 21. 細野邦広, 遠藤宏樹, 杉山美智子, 高橋宏和, 中島淳: 大腸線種における TNF- α , TNF-R1, TNF-R2 の発現解析. 第69回日本癌学会学術総会 ポスター, 大阪, 2010, 9.
 22. 高橋宏和, 内山崇, 中島淳: 大腸発癌におけるレジスチンおよび TNF- α の相関解析. 第18回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2010) シンポジウム6. メタボリック症候群 (生活習慣病) における消化と吸収 (消化吸収学会・消化器病学会・肝臓学会合同), 横浜, 2010, 10.
 23. 細野邦広, 高橋宏和, 中島淳: 大腸発癌過程における TNF- α 関連因子の解析. 第18回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2010) パネルディスカッション18. 大腸がん研究の新たな展開と治療戦略 (消化器病学会・消化器内視鏡学会・消化器外科学会合同), 横浜, 2010, 10.
 24. 内山崇, 高橋宏和, 遠藤宏樹, 細野邦広, 飯田洋, 坂本康成, 藤田浩司, 古出智子, 米田正人, 所知加子, 阿部泰伸, 稲森正彦, 桐越博之, 小林規俊, 畷村健, 窪田賢輔, 斉藤聡, 中島淳: 大腸癌治療・予防の新しい分子標的としてのレプチンシグナル経路の解析. 第18回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2010), ポスター, 横浜, 2010, 10.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明

分担研究者 大島正伸
金沢大学がん進展制御研究所 教授

研究要旨 COX-2/PGE₂経路依存的に胃粘膜に炎症および腫瘍病変を発生する *Gan* マウスを用いて、炎症反応誘導機序および発がん促進機序の研究を行なった。*Gan* マウスを無菌化して飼育すると炎症反応は抑制され、胃がん発生も抑制された。PGE₂ 受容体 EP4 シグナルの阻害によっても、炎症反応と胃がん発生の双方が抑制された。さらに、細菌感染刺激と PGE₂ シグナルの相互作用により CCL2 および CCL8 の発現が誘導され、また腫瘍組織へのマクロファージ浸潤は腫瘍間質細胞の生存・維持に重要であることが明らかとなった。網羅的遺伝子発現解析結果から、COX-2/PGE₂ 経路依存的に発生する炎症組織では EGFR リガンドとそれらを細胞膜から遊離させる ADAM ファミリーそれぞれの遺伝子発現が誘導されて、EGFR が活性化していることが明らかとなった。実際に EGFR 阻害薬の投与により *Gan* マウス胃がん組織が退縮した。以上の結果により、EP4 阻害薬、EGFR 阻害薬をはじめ、除菌や CCL2/CCL8 阻害薬などのコンビネーションによる胃がんの化学予防および治療戦略の可能性が示された。また、本研究課題では、新しい炎症依存的胃がんマウスモデルの開発を同時に進めている。

A. 研究目的

慢性炎症反応は発がんに関与しており、炎症性プロスタグランジン PGE₂ が重要な役割を果たすと考えられている。本研究では COX-2/PGE₂ 経路依存的に胃粘膜に炎症を発生し、胃がんを自然発生するマウスモデル (*Gan* マウス) を用いて、腫瘍組織で炎症反応が誘導される機序、および炎症反応により発がんが促進される機序を明らかにする。 *Gan* マウスは Wnt シグナル活性化と COX-2/PGE₂ 経路の相互作用により胃がんを発生するマウスモデルで、発がんの分子発生機序からがん組織の遺伝子発現プロファイルまで、ヒトの胃がんを再現したモデルである。したがって、本研究により新たな胃がんの化学予防および治療戦略推進に重要な知見が得られることが期待される。

胃発がんにおいても細菌感染の関与が考えられる。また、4 種類ある PGE₂ 受容体 (EP1~EP4) の中で、細胞内 cAMP 上昇に作用する EP2、EP4 を介したシグナルが発がんに関与する可能性が報告されている。そこで、*Gan* マウス胃がん組織での炎

症反応誘導における細菌感染刺激と PGE₂ 受容体 EP4 の役割を、無菌化マウス作製および EP4 阻害薬投与等の実験により明らかにする。さらに炎症反応で重要なマクロファージの役割およびケモカイン発現についても明らかにする。

また、これまでの遺伝子発現解析から *Gan* マウス胃がん組織では炎症反応依存的に多くの遺伝子変異が認められている。その中から、発がんにおける重要性が確立されている EGFR シグナルに関与する分子について着目し、発現解析および阻害薬投与実験を行なう。これにより炎症反応依存的な EGFR シグナル活性化の可能性について明らかにする。

最後に、本研究では新しい胃がんモデルマウスの作製も行なう。ヒト胃がん組織では Wnt 活性化を認めないものもある。そこで、TGF-βシグナル遮断と PGE₂ 経路依存的な炎症反応による胃がんモデルマウスを作製し、*Gan* マウスと同様の炎症反応に関する研究を行なうことを目的とする。

B. 研究方法

無菌化 *Gan* マウス実験：実験動物中央研究所にて *Gan* マウスを帝王切開により無菌化し、無菌環境のビニールアイソレーター内で飼育した。6週齢で一部の無菌化 *Gan* マウスを一般の SPF 飼育室へ移動させ、野生型 SPF マウスと同居させて消化管内常在菌を感染させた。両者のマウスを30週齢で病理解剖し、胃がん発生について解析した。

EP4 阻害薬投与実験：52週齢および27週齢で *Gan* マウスに EP4 阻害薬を3週間連続投与し、胃がん組織への影響について同週齢 *Gan* マウスと比較解析する。

マクロファージ関連実験：クロドロネートリポソームを *in vivo* で投与するとマクロファージに貪食され、クロドロネートの作用によりマクロファージは細胞死を起こす。クロドロネートリポソームを尾静注または開腹して直接胃がん組織に注入してマクロファージを枯渇させ、腫瘍組織への影響を組織学的に解析した。また、マクロファージ遊走に関わるケモカイン、CCL2~CCL8 の発現を無菌化および SPF 飼育の *K19-C2mE* マウスと *Gan* マウス、および野生型マウスの胃組織を用いて RT-PCR にて解析した。さらに、胃がん組織へのマクロファージ浸潤における CCL2 の役割を明らか胃にするため、CCL2 中和抗体を *Gan* マウスに投与し、組織学的解析を行なった。

EGFR 関連遺伝子発現実験：EGFR リガンドである amphiregulin, epiregulin, HB-EGF, betacellulin, EGF, TGF- α および ADAM ファミリー (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 28) の遺伝子発現を、各種マウスモデル胃組織を用いた網羅的解析結果から抽出して比較解析した。さらに、これらの遺伝子発現について、COX-2 阻害薬である celecoxib および EP4 阻害薬を投与した *Gan* マウス胃がん組織を用いて RT-PCR により解析した。また、EGFR 活性化について各種マウス胃組織を用いた免疫染色により解析した。

EGFR 阻害薬投与実験：EGFR 阻害薬 (ZD1839) および celecoxib を単独またはコンビネーションで *Gan* マウスに投与

し、胃がん組織への影響を解析した。

新規胃がんマウスモデルの作製：TGF- β II 型受容体遺伝子 (*Tgfbr2*) のコンディショナルノックアウトマウスである *Tgfbr2*(flox/flox) マウスを *Gan* マウスと交配させて複合マウスを作製する。タモキシフェン投与により活性化する CreER を胃粘膜上皮特異的に発現する *K19-CreER* 発現カセットをマウス受精卵前核にマイクロインジェクションして、*K19-CreER* マウスのファウンダーを作製した。さらにタモキシフェン投与依存的な Cre 活性化を検討しするために ROSA26-LacZ レポーターマウスと交配した。

(倫理面への配慮)

本研究で実施した動物実験は、金沢大学動物実験委員会で承認された計画に沿って行なった。

C. 研究結果

胃がん発生における細菌感染と EP4 シグナルの役割：30週齢無菌化 *Gan* マウスにおける胃がんの大きさは同週齢 SPF 飼育 *Gan* マウスの約40%まで減少した。また、6週齢で無菌環境から SPF へ移動させて消化管内常在菌を再構築した *Gan* マウスの胃がんの大きさは、SPF 飼育 *Gan* マウスの60%と、無菌化 *Gan* マウスよりも有意に大きくなった。一方、27週齢および52週齢から3週間の EP4 阻害薬投与により、胃がんサイズはそれぞれ非投与 *Gan* マウスの32%、23%まで減少した。組織解析の結果、無菌化 *Gan* マウスでは COX-2 発現が上昇しているのにも関わらず炎症反応が抑制されており、胃粘膜組織へのマクロファージ浸潤も顕著に抑制された。EP4 阻害薬投与 *Gan* マウスの胃組織でも、炎症反応が認められずにマクロファージ浸潤も抑制された。以上の結果から、細菌感染刺激と EP4 シグナルの双方がマクロファージ浸潤をともなう炎症反応の誘導に重要であり、誘導される炎症反応が胃がん発生促進に関与すると考えられた。

CCL2 によるマクロファージ浸潤とその役割：*K19-C2mE* マウスは PGE₂ 経路誘導

により胃炎を発症し、胃粘膜に多数のマクロファージが浸潤する。*K19-C2mE* マウス胃組織では CCL2 および CCL8 の発現が野生型マウスに比較して有意に上昇していたが、無菌化 *K19-C2mE* マウスでは発現誘導が認められなかった。同様の傾向は無菌化 *Gan* マウスと SPF 飼育 *Gan* マウスの比較でも確認され、細菌感染刺激と PGE₂ シグナルの双方が CCL2 および CCL8 の発現誘導に関与していると考えられた。さらに CCL2 中和抗体の投与により *Gan* マウス胃がん組織のマクロファージ浸潤が顕著に抑制され、CCL2 は胃がん組織への重要なマクロファージ遊走ケモカインと考えられた。

腫瘍発生におけるマクロファージの役割を解析するためにクロドロネートリポソームを *Gan* マウスに投与した結果、マクロファージが枯渇した腫瘍領域では、間質における出血と間質細胞の変性およびアポトーシスの誘導が認められた。腫瘍上皮細胞はそれに続いて萎縮変化を起こしていた。すなわち、マクロファージは腫瘍間質細胞の生存や維持に関与していると考えられた。

炎症反応依存的な EGFR シグナル活性化：各種マウスモデル胃組織を用いた網羅的遺伝子発現解析結果から、EGFR リガンドおよび EGFR リガンドを細胞膜から遊離させる蛋白分解酵素 ADAM ファミリーの遺伝子について抽出して比較解析した結果、amphiregulin, epiregulin, HB-EGF, betacellulin, および ADAM8, 9, 10, 17 の発現が *K19-C2mE* マウス胃炎組織および *Gan* マウス胃がん組織で有意に上昇していた。さらにこれらの遺伝子発現誘導は、celecoxib または EP4 阻害薬を投与した *Gan* マウスの胃組織では有意に減少した。したがって、PGE₂ 依存的な炎症反応がこれらの遺伝子の発現誘導に関与することが考えられた。複数の EGFR リガンドと ADAM ファミリーの双方が誘導された事と一致して、*K19-C2mE* マウス、*Gan* マウス胃組織を用いた免疫染色により、活性化型のリン酸化 EGFR が検出された。

マクロファージ細胞株 RAW264 を LPS

刺激により活性化すると、COX-2 発現が誘導され、同時に amphiregulin や epiregulin の発現も誘導された。重要なことに、celecoxib や EP4 阻害薬存在下では amphiregulin と epiregulin の発現は顕著に抑制された。したがって、胃がん組織内の活性化マクロファージがこれらの因子を PGE₂/EP4 シグナル依存的に産生していると考えられた。

EGFR 阻害薬と COX-2 阻害薬による胃がん発生抑制：*Gan* マウスに celecoxib を 3 週間投与すると胃がんサイズが非投与対照群の約 10%まで減少した。重要なことに EGFR 阻害薬の投与でも、非投与対照群の約 24%まで減少し、COX-2/PGE₂ 依存的な胃がん発生機序の中で、EGFR 活性化の重要性が明らかとなった。EGFR 阻害薬と celecoxib を併用して投与した結果、*Gan* マウスの胃がん組織は肉眼的に検出できないまで退縮した。

新規胃がんモデルマウスの作製：*Gan* マウスと同様に Wnt シグナル活性化が認められる胃がんは、症例全体の 30~50%である。他の原因で発生する胃がん組織における炎症反応の役割を同様にして解明するため、TGF- β シグナル遮断と PGE₂ 依存的な炎症による新規胃がんモデルマウスの作製を進めている。TGF- β は胃がん発生に抑制的に作用すると考えられている。これまでに *Tgfbr2* (flox/flox) *Gan* 複合マウスを作製した。*Tgfbr2* を胃粘膜特異的に欠損させるため、*K19-CreER* マウスの作製を試みており、現在複数系統のファウンダーが作製された。これらのファウンダーマウスと ROSA-LacZ レポーターマウスとの交配実験を行ない複合マウスを得た。今後、タモキシフェン投与による胃粘膜特異的 Cre 活性の確認実験を行なう。

D. 考察

悪性がん全体の約 15%は感染が関与すると言われており、感染に起因した慢性炎症が発がんを促進すると考えられている。一方で COX-2/PGE₂ 経路が発がんに必要なことは疫学的にも実験的にも確立さ

れている。COX-2 の発現は TLR を介した感染刺激でも、TNF- α などの炎症性サイトカインによっても誘導されるので、感染刺激は直接または間接的に COX-2 発現を誘導し、それが発がんを促進する可能性が考えられている。しかし、本研究により PGE₂ 経路が誘導されている状況でも、そこに感染刺激がないと炎症が起きないことが明らかとなり、さらに常在菌の感染があっても EP4 を介した PGE₂ シグナルが亢進していないと炎症が発生しないことが明らかされた。したがって、感染刺激は COX-2/PGE₂ 経路を誘導すると同時に、PGE₂ 経路と協調して炎症反応を誘導することが出来ると考えられた。すなわち、EP4 シグナル遮断と抗生物質による除菌は、それぞれ胃がん組織での炎症反応発生を抑制する可能性が想定され、胃がんの予防・治療戦略として重要と考えられた。

Tumor-associated macrophage (TAM) と呼ばれる腫瘍組織に浸潤するマクロファージには血管新生、細胞浸潤などさまざまな役割が報告されている。本研究では、TAM が腫瘍組織間質細胞の生存を支持している可能性が新たに考えられた。TAM の枯渇により間質が崩壊すれば腫瘍細胞も生存出来なくなるので、本研究結果から、CCL2 や CCL8 阻害薬などマクロファージの浸潤を標的とした間接的な胃がん予防・治療の戦略が考えられた。今後詳細な分子機序の解析が必要である。

COX-2 阻害薬は大腸がんの化学予防薬として期待されたが、心臓への副作用のために現在は他の標的の探索が進められている。一方で、本研究では PGE₂ の下流で EGFR が活性化する機序を明らかにし、EGFR の阻害が COX-2/PGE₂ 依存的に発生する胃がんを退縮させる事を示した。すなわち、EGFR 阻害薬または COX-2 または EP4 阻害薬と EGFR 阻害薬の併用による胃がん予防の可能性が考えられた。大腸がんを対象とした研究でも、COX-2 と EGFR 双方の阻害による有意な腫瘍発生抑制が報告されている。

Gan マウスを用いた本研究により、EP4、

CCL2、CCL8、EGFR などの分子に胃がん予防・治療の標的としての可能性が考えられた。今後、これらの分子の阻害による胃がん退縮機序をより詳細に解明し、また新しい胃がんモデルマウスにおいても同様の機序が作用しているか明らかにすることで、上記の分子を中心に、炎症反応を標的とした消化器がんの予防・治療薬開発に貢献が期待できる。

E. 結論

胃がん発生マウスモデル (Gan マウス) を用いた研究により、細菌感染刺激と PGE₂ 受容体 EP4 を介したシグナルの双方が、胃がん発生に重要な炎症反応の発生に必要であることを明らかにした。その重要な機序として、細菌感染刺激と PGE₂ の相互作用によるマクロファージ遊走ケモカイン CCL2/CCL8 の発現誘導、およびそれによる胃粘膜へのマクロファージ浸潤が考えられた。腫瘍マクロファージの役割の一つとして、腫瘍間質細胞の生存・維持への関与が考えられた。また、感染と PGE₂ により誘導される胃炎組織では、EGFR リガンド、Amphiregulin, epiregulin, HB-EGF, betacellulin およびそれらを細胞膜から遊離する ADAM ファミリー、Adam8, 9, 10, 17 の遺伝子発現が誘導されて、EGFR を活性化していることを明らかにした。以上の結果は、COX-2 阻害薬にかわる胃がん発生予防および治療薬開発戦略への重要な知見となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Oshima, H., Hioki, K., Popivanova, B. K., Oguma, K., van Rooijen, N., Ishikawa, T. O., and Oshima, M. Prostaglandin E₂ signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology*, 140: 596-607 (2011).

Oshima, H., Popivanova, B. K., Oguma, K., Kong, D., Ishikawa, T. O., and Oshima, M. Activation of epidermal growth

factor receptor signaling by the prostaglandin E₂ receptor EP4 pathway during gastric tumorigenesis. *Cancer Sci.*, 102: 713-719, 2011.

Ishimoto, T., Nagano, O., Tamada, M., Motoshima, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., Baba, H., and Saya, H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 19: 387-400, 2011.

Sonoshita, M., Aoki, M., Fuwa, H., Aoki, K., Hosogi, H., Sakai, Y., Hashida, H., Takabayashi, A., Sasaki, M., Robine, S., Itoh, K., Yoshioka, K., Kakizaki, F., Kitamura, T., Oshima, M., and Taketo, M.M. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell*, 19: 125-137, 2011.

Oshima, H., and Oshima, M. Mouse models of gastric tumors: Wnt activation and PGE₂ induction. *Pathol. Int.*, 60: 599-607, 2010.

Oguma, K., Oshima, H., and Oshima, M. Inflammation, tumor necrosis factor and Wnt promotion in gastric cancer development. *Future Oncol.*, 6: 515-526, 2010.

2. 学会発表

Oshima, H., Oguma, K., Hioki, K., and Oshima, M. Recruitment of tumor-associated macrophages by cooperation of PGE₂ pathway and infectious stimulation. 第101回アメリカ癌学会学術総会、米国ワシントンDC (2010年4月)

大島正伸 胃癌モデルマウスにおける initiation-promotion 解析 第19回日本がん転移学会学術集会、金沢市 (2010年6月)

大島正伸 Wnt 活性化と炎症による胃がん発生の分子機序 第29回分子病理学研究会、つくば市 (2010年7月)

大島正伸 胃癌発生を促進する炎症反応の分子機序 第7回日本病理学会カンファレンス、岡山市 (2010年8月)

大島正伸 胃発がんにおける炎症反応とプロスタグランジン E₂ の役割 第25回発癌病理研究会、松島町 (2010年8月)

Oshima, M. Gastric tumorigenesis in mice through Wnt activation and PGE₂-induced inflammatory responses. 第14回国際免疫学会サテライトシンポジウム、金沢市 (2010年8月)

Oshima, H., and Oshima, M. Gastric tumorigenesis through bacterial infection and COX-2/PGE₂ signaling pathway. 第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

Oshima, M. Promotion of gastric tumorigenesis by inflammatory prostaglandin E₂. 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同大会 [BMB2010]、神戸市 (2010年12月)

Oshima, H., and Oshima, M. Inflammatory microenvironment by cooperation of PGE₂ and bacterial infection in mouse gastric tumors. 第15回日韓がん研究ワークショップ、韓国仁川市 (2010年12月)

Oshima, M. Prostaglandin E₂-associated inflammation and bacterial infection

in gastric tumorigenesis. 第1回発がん
スパイラル国際シンポジウム、東京
(2011年2月)

Oshima, H., Kong, D., Ishikawa, T.O.,
and Oshima, M. Downregulation of tumor
suppressor microRNA in inflammatory
microenvironment. 第1回発がんスパイ
ラル国際シンポジウム、東京(2011年2
月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Apc変異マウスの腸管腫瘍形成に寄与するシグナル経路の解明

分担研究者 青木正博
愛知県がんセンター研究所分子病態学部 部長

研究要旨 大腸がん発生初期段階を制御する分子機構を解明することを目的として、腸管に腺腫性ポリープを多数発症する $Apc^{\Delta 716}$ マウスを用いて、腸管腫瘍形成及び mTORC1 経路活性化における JNK シグナル経路の役割を明らかにした。 $Apc^{\Delta 716}$ マウスに JNK 阻害薬の SP600125 を投与したところ、JNK 経路および mTORC1 経路の不活化を伴って、腫瘍形成は有意に抑制された。また、ヒト大腸がん細胞株に anisomycin を投与することにより JNK を活性化させたところ mTORC1 経路は顕著に活性化され、逆に SP600125 の投与または shRNA ベクターによる JNK ノックダウンにより JNK 経路を抑制したところ、mTORC1 経路は不活化された。さらに JNK は Raptor のセリン 863 残基を直接リン酸化することにより mTORC1 を活性化することが分かった。これらの結果から、微小腺腫が大きな腺腫に成長するためには JNK の活性化を介した mTORC1 の活性化が必要なことが明らかとなり、JNK/mTORC1 経路が大腸がんの予防・治療標的となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

$Apc^{\Delta 716}$ マウスは大腸がん初期病変である腺腫性ポリープを発症するモデルであり、我々はその腫瘍形成に mTOR complex1 (mTORC1) と Smoothed が重要な役割を担うことを示してきた。本研究は、腸管腫瘍における mTORC1 経路活性化機序、及び Smoothed による Wnt シグナル活性化機序を明らかにし、大腸がん発生初期段階を制御する分子機構を解明することから大腸がんの新たな予防・治療法の開発に繋げることを目的としている。

B. 研究方法

$Apc^{\Delta 716}$ マウスに SP600125 を経口投与し、ポリープの数、大きさを対照群と比較した。また、免疫染色、ウェスタンブロットにより、JNK、mTORC1 経路への影響を調べた。大腸がん細胞株に anisomycin 投与、SP600125 投与、JNK のノックダウンなどを行い、mTORC1 経路への影響を調べた。また、in vitro リン酸化反応等により、JNK による mTORC1 活性化の分子機序を調

べた。

(倫理面への配慮)

マウスの飼育・管理およびそれらを用いた実験は、全て京都大学及び愛知県がんセンターの動物実験実施に関する規程に基づいて行った。

C. 研究結果

$Apc^{\Delta 716}$ マウスに JNK 阻害薬 SP600125 を投与したところ、JNK 経路、および mTORC1 経路の不活化を伴って、腸管腫瘍形成は有意に抑制された。また、大腸がん細胞株に anisomycin を投与することにより JNK を活性化させたところ、mTORC1 経路は顕著に活性化され、逆に SP600125 の投与または shRNA ベクターによる JNK ノックダウンにより JNK 経路を抑制したところ、mTORC1 経路は不活化された。さらに、in vitro で JNK は mTORC1 の構成要素である Raptor をリン酸化した。そのリン酸化は主にセリン 863 残基に生じており、このセリン 863 をアラニンに置換したところ、JNK による mTORC1 活性化は強く抑制

された。

D. 考察

Apc 変異マウスの腸管腫瘍では mTORC1 経路と JNK 経路が共に活性化されていることは既に確認していたが、SP600125 の投与実験から、mTORC1 の活性化には JNK の活性化が重要な役割を果たすと考えられた。また、大腸がん細胞株を用いた実験から mTORC1 の活性化には JNK の活性化が必要かつ十分であることが示唆された。さらに、JNK が Raptor を直接リン酸化すること、セリン 863 をアラニンに置換することで mTORC1 の活性化が阻害されたことから、JNK は Raptor のセリン 863 をリン酸化することによって mTORC1 経路を活性化すると考えられた。

E. 結論

Apc 変異マウスの腸管においては *Apc* 遺伝子座の LOH による *Apc* の機能消失が腫瘍形成に必要なかつ十分と考えられていたが、本研究結果により、微小腺腫が大きな腺腫に成長するためには JNK の活性化を介した mTORC1 の活性化が必要なことが明らかとなった。また、JNK が mTORC1 の構成要素である Raptor を直接リン酸化することによって mTORC1 を活性化することも分かったが、これは mTORC1 の新たな活性化機序を解明したものである。これらの成果は、JNK/mTORC1 経路が大腸がんの予防・治療標的となる可能性を示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Deguchi, A., Miyoshi, H., Kojima, Y., Okawa, K., Aoki M., Taketo, M.M. LKB1 suppresses p21-activated kinase-1 (PAK1) by phosphorylation of Thr109 in the p21-binding domain. *J Biol Chem*, 285: 18282-18290 (2010)
2. Kitamura, T., Fujishita, T., Loetscher, P., Revesz, L., Hashida, H., Kizaka-Kndoh, S., Aoki, M.,

Taketo, M.M. Inactivation of chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1) suppresses colon cancer liver metastasis by blocking accumulation of immature myeloid cells in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 13063-13068 (2010)

3. Sonoshita, M., Aoki, M., Fuwa, H., Aoki, K., Hosogi, H., Sakai, Y., Hashida, H., Takabayashi, A., Sasaki, M., Robine, S., Itoh, K., Yoshioka, K., Kakizaki, F., Kitamura, T., Oshima, M., and Taketo, M.M. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell*, 19:125-137 (2011)
4. Aoki, K., Kakizaki, F., Sakashita, H., Manabe, T., Aoki, M., and Taketo, M.M. Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its non-transcriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res.* 71:593-602 (2011)

2. 学会発表

1. 藤下晃章、青木正博、武藤誠 JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through mTORC1 pathway activation in *Apc* Δ716 mice. BMB2010 神戸市 (2010年12月)
2. 藤下晃章、青木正博、武藤誠 JNK シグナルは mTORC1 経路活性化を介して *Apc* 変異マウスにおける腸管腫瘍形成を促進する 第69回日本癌学会学術総会 大阪市 (2010年9月)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし

Apc変異ラットを用いた大腸がん診断・治療評価系の開発

分担研究者 庫本高志
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 准教授

研究要旨

家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である *Apc* 遺伝子に変異をもつ KAD ラットは、AOM と DSS による大腸化学発がんを高感受性を示す。本年度は、KAD ラットが抗癌剤の評価系として利用可能かどうかを検討した。代表的な抗癌剤である 5-FU を用いたところ、1 頭あたりの腫瘍数では、5-FU 投与群と非投与群間で有意な差はなかったが、腺癌 1 個あたりの体積は、5-FU 投与群で有意に減少しており、既存の評価モデルと同様、KAD ラットにおいても 5-FU の腫瘍退縮効果が確認できた。KAD ラットは既存の発がんモデルに比べ、短期間で確実に大腸腫瘍を誘発できる。従って、KAD ラットを用いることで、抗癌剤の効果的な開発が推進されると期待される。

A. 研究目的

Kyoto *Apc* Delta (KAD) ラット (F344-*Apc*^{m1Kyo}) は、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である *Apc* 遺伝子にナンセンス変異 (S2523X) を持つ。KAD ラットは、大腸腫瘍を自然発症しないが、化学発がん物質に対して感受性が高い。つまり、5 週齢の KAD ラットに、発がん剤としてアゾキシメタン (AOM) を、その 1 週後に、発がん促進剤としてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 1 週間投与すると、AOM 投与後 15 週で、全ての個体に約 10 個の大腸腫瘍を誘発できる。一方、対照系統である F344 ラットに同様のプロトコールで大腸がんを誘発した場合、50%の個体に、わずか 0.8 個の腫瘍しか誘発できない。このように、KAD ラットを用いることで、大腸腫瘍を短期間に、確実に誘発できる。従って、KAD ラットは大腸腫瘍に対する抗癌剤の検定、開発に有用であると考えられている。

抗癌剤の検定や開発における KAD ラットの有用性を具体的に示すことを目的として、本年度は、ヒト大腸癌に対する代表的な抗癌剤である 5-fluorouracil (5-FU) を用いた化学療法試験を実施した。

B. 研究方法

5 週齢の雄 KAD ラット 27 頭に対して、AOM (20 mg/kg 体重) を背部皮下投与した。1 週後、2 % DSS を 1 週間飲水投与した。実験開始後 9 週目に大腸管腔内の内視鏡観察を行い、誘発腫瘍数に基づいて、溶媒投与群 (n=9)、5-FU 50 mg/kg 投与群 (n=9) 及び 75 mg/kg 投与群 (n=9) に群分けした。

各群について、5-FU もしくは生理食塩水の尾静脈内投与を週 1 回 3 週連続で行った後に、1 週間休薬させ、これを 1 クールとして全 2 クール実施した。実験期間中、毎週体重を測定および死亡の有無を観察し、KAD ラットに対する 5-FU の副作用を評価した。なお、5-FU 投与プロトコールは、事前に無処置の雄性 KAD ラットに 5-FU を尾静脈投与する実験を行い、その体重減少及び死亡率より設定した。

AOM 投与 16 週間後に各個体について剖検を実施した。大腸は採取した後、管腔内を PBS で洗浄し、長軸に沿って切開後、病理組織学的解析のために固定した。剖検および病理解析で観察された大腸腫瘍について、1 頭あたりの腫瘍个数、腫瘍 1 個あたりの体積を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に基づき実施した。

C. 研究結果

内視鏡を用いた大腸管腔内観察の結果、全ての個体について1~3個の(腫瘍)が確認され、各群の合計腫瘍数が均一になるよう群分けした。

5-FU 50 mg/kg 投与群では実験期間中死亡例は観察されず、また溶媒投与群に比べて体重の減少率が10%未満であった。一方5-FU 75 mg/kg 投与群では、死亡例が観察されたこと、また溶媒投与群に比べて体重の減少率が10%を超えたことから、75 mg/kgは大腸腫瘍誘発KADラットにおける毒性用量と判断し、5-FU 50 mg/kg 投与群を評価の対象とした。

剖検の結果、1頭あたりの腫瘍数、腫瘍1個あたりの体積について5-FU投与群と溶媒投与群で有意な差は見られなかった。

病理解析の結果、腺腫および腺癌の腫瘍数について5-FU投与群と溶媒投与群で有意な差は見られなかった。一方、腺癌1個あたりの体積については、5-FU投与群で $34.4 \pm 6.8 \text{ mm}^3$ 、溶媒投与群で $65.9 \pm 9.5 \text{ mm}^3$ ($p < 0.02$)と、有意な差が見られた。

D. 考察

5-FUの効果は腫瘍退縮効果と言われており、ヒトにおける5-FU単独投与の効果は約30%と言われている。今回、担がんKADラットにおいても、約30%の腫瘍退縮効果が見られた。KADラットに誘発された大腸腫瘍は、5-FUに対する反応においても、ヒト大腸癌との類似性が確認できた。

従来の抗癌剤の検定には、Apc遺伝子に変異をもつMinマウスや担がんラットが多用されている。しかし、Minマウスの腫瘍は腺腫であり小腸に発症する。また、野生型ラットを用いた担がんモデルは、腫瘍誘発開始から薬剤検定までの期間が非常に長く、腫瘍発生数のばらつきも大

きい。

KADラットを用いた担がんモデルは、従来よりも短期間で、大腸のみに、悪性度の高い腺癌を一定数誘発でき、また内視鏡観察により確実に担がん動物を選抜することができる。従って、KADラットは、新規化合物の大腸癌に対する抗腫瘍効果の評価や、新たな投与プロトコルの開発に有用な評価系モデルであると考えられる。

E. 結論

AOM/DSS大腸癌誘発KADラットを化学療法試験法に有用な発がんモデルとして確立した。本評価モデルを利用することで、大腸癌に対する抗癌剤の開発が促進されるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Genetic analyses of fancy rat-derived mutations. Kuramoto T, Yokoe M, Yagasaki K, Kawaguchi T, Kumafuji K, Serikawa T. *Exp Anim.* 2010; 59(2): 147-55.
2. Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal glomerulosclerosis. Kuramoto T, Kuwamura M, Tagami F, Mashimo T, Nose M, Serikawa T. *Exp Anim.* 2011; 60(1): 57-63.
3. A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg²⁺ channel MRS2 results in demyelination in the rat. Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T. *PLoS Genet.* 2011; 7(1): e1001262.

2. 学会発表

1. Apc変異ラット(KADラット)におけるDSS誘発大腸炎 吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志 第57回日本実験動物学会、平成22年5月12日~14日、京都市

2. ジンクフィンガーヌクレアーゼにより作製した X 連鎖重症複合免疫不全ラット 真下知士、滝澤明子、吉見一人、国広弥生、田上史、日合弘、庫本高志、芹川忠夫 第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日～14 日、京都市
 3. APC タンパク質 C 末ドメインは DSS 誘発大腸炎症に重要な役割を果たす 吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志 第 25 回発癌病理研究会、平成 22 年 8 月 24 日～26 日、松島町
 4. APC タンパク質 C 末ドメインは DSS 誘発大腸炎症に重要な役割を果たす 吉見一人、田中卓二、庫本高志 第 69 回日本癌学会、平成 22 年 9 月 22 日～24 日、大阪市
 5. KAD ラットを用いた大腸癌化学療法試験法の確立 吉見一人、橋本貴生、田中卓二、丹羽佑介、芹川忠夫、庫本高志 第 108 回関西実験動物研究会、平成 22 年 12 月 10 日、京都市
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

酸化ストレスに起因する発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究

分担研究者 續 輝久
九州大学 大学院医学研究院 教授

研究要旨

Msh2 遺伝子欠損マウスを用いて、臭素酸カリウム (KBrO_3) の飲水投与による消化管での酸化ストレス誘発発がん実験を行い、酸化ストレスを付与された *Msh2* 遺伝子欠損マウスの腸管では、顕著に上皮性腫瘍の発生頻度の上昇が認められた。これらの結果から、MSH2 は酸化ストレスに起因する発がんの抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになった。従って、ミスマッチ修復系遺伝子の欠損によって引き起こされるヒト遺伝性非腺腫性大腸がん (HNPCC) 発症には、酸化ストレスが要因であることが考えられる。

A. 研究目的

私達は遺伝子欠損マウスを用いて、*MUTYH* 遺伝子に欠損を持つ MAP 患者では酸化ストレスに起因する自然突然変異が大腸腺腫症を引き起こすことを示した。同時に、臭素酸カリウム (KBrO_3) の飲水投与による、消化管での酸化ストレス誘発発がん系を確立した。本研究では、この系を用いて、ミスマッチ修復系が酸化ストレスに起因する発がんの抑制に果たす役割を解明し、ヒト遺伝性非腺腫性大腸がん (HNPCC) の発がん機序を考察する。

B. 研究方法

1) *Msh2* 遺伝子欠損マウスの飼養

近交系 C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Msh2* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Msh2* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。マウスの飼養については、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則並びに動物実験規則に従って実施した。

2) 臭素酸カリウム溶液の投与

KBrO_3 を純水に溶解し、0.2%溶液を調製後に濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。投与法は、16週間の自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

3) 発がん実験

マウスを安楽死させた後、腸管を摘出して10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を70%エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

4) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、九州大学動物実験委員会の承認を得て、九州大学動物実験規則に従い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。

C. 研究結果

臭素酸カリウム誘発消化管発がん

これまでの *Mut yh* 遺伝子欠損マウスを用いた0.2%の KBrO_3 溶液を16週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、野生型マウスと *Mut yh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸に1個体当たりそれぞれ平均0.8および51.0個の上皮性腫瘍の発生を認めた。今回、 KBrO_3 を投与した野生型マウス5匹および *Msh2* 遺伝子欠損マウス4匹に生じた1個体当りの平均腫瘍数は、それぞれ 1.2 ± 0.98 , 27.3 ± 1.09 であった。非投与群の *Msh2* 遺伝子欠損マウ

スには1個体当たり平均1.2±0.75個の腫瘍が観察された。これらのKBrO₃投与で誘発された腫瘍は、前回同様すべて十二指腸および空腸の口側領域に生じていた。病理解析の結果、これらの腫瘍は1例を除き全てヴィエナ分類のカテゴリー4と診断された(1例はカテゴリー3に分類された)。現在、*Msh2* 遺伝子欠損マウスに誘発された腫瘍組織における *Cttnb1* 遺伝子の解析を行っている。

D. 考察

ミスマッチ修復遺伝子が欠損するとヒトでは HNPCC が発生する。私達はこれまでに、野生型マウス腸管上皮細胞では加齢と共に酸化ストレスによる突然変異が蓄積することを見だし、消化管は酸化ストレスの負荷が大きい器官であることが推測された。また、酸化 DNA 損傷による突然変異を抑制する *MUTYH* 遺伝子に欠損を持つ MAP 患者では、酸化ストレスに起因する自然突然変異が大腸腺腫症を引き起こす。これらの発見から、ミスマッチ修復系遺伝子の欠損による HNPCC の発症には、酸化ストレスが大きく寄与していることが考えられる。今回の実験で、KBrO₃ の投与により酸化ストレスが付与された *Msh2* 遺伝子欠損マウスの腸管では、顕著に上皮性腫瘍の発生頻度の上昇が認められた。このことは、上記の仮説を支持する。MSH2 が酸化 DNA 損傷である 8-オキソグアニンの除去に関与することを示唆するデータが報告されているが、ミスマッチ修復が実際に 8-オキソグアニンの DNA からの除去に直接関わっているか等の詳細は明らかではない。現在、*Msh2* 遺伝子欠損マウスに誘発された腫瘍での *Cttnb1* 遺伝子の解析を行っているが、これまでに G→A 変異を見いだしている。*Cttnb1* 遺伝子等のがん関連遺伝子の解析やトランスジーンを用いた酸化ストレス誘発変異の詳細な解析により、ミスマッチ修復遺伝子の欠損によって引き起こされるヒトの HNPCC の発がん機序の解明をめざして進めたい。

E. 結論

MSH2 は酸化ストレスに起因する発がんの抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになった。従って、ミスマッチ修復系遺伝子の欠損によって引き起こされるヒトの HNPCC 発症には酸化ストレスが要因であることが考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuzuki, T., Piao, J., Isoda, T., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Nakatsu, Y. Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice (Abstract). *Health Physics*, 100: 293-294, 2011.
- 2) Sagata, N., Iwaki, A., Aramaki, T., Takao, K., Kura, S., Tsuzuki, T., Kawakami, R., Ito, I., Kitamura, T., Sugiyama, H., Miyakawa, T., Fukumaki, Y. Comprehensive behavioral study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. *Genes, Brain Behavior*, 9: 899-909, 2010.
- 3) Nakamura, T., Meshitsuka, S., Kitagawa, S., Abe, N., Yamada, J., Ishino, T., Nakano, H., Tsuzuki, T., Doi, T., Kobayashi, Y., Fujii, S., Sekiguchi, M., Yamagata, Y. Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *J. Biol. Chem.*, 285: 444-452, 2010.

2. 学会発表

- 1) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Prevention of Oxidative Mutagenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer, 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM): Harmonize Gene & Environment, Pattaya, Thailand, 2010. 12. 17.
- 2) 大野みずき, 作見邦彦, 續輝久, 中別

- 府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学学会年会合同大会, 神戸, 2010. 12. 8.
- 3) 中西恵美, 大野みずき, 中津可道, 續輝久, 腸管と精巣における放射線誘発 DNA 損傷とその修復機構の解析, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学学会年会合同大会, 神戸, 2010. 12. 7.
- 4) 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作, 續輝久, 酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響, 日本環境変異学会第 39 回大会, 茨城, 2010. 11. 16.
- 5) 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續輝久, 低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構: 腸管と精巣における解析, 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都, 2010. 10. 20.
- 6) 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續輝久, 中別府雄作, 笹栗俊之, 酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010. 9. 22.
- 7) 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim, 中津可道, 續輝久, 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫, 哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死, 日本遺伝学会第 82 回大会, 札幌, 2010. 9. 20.
- 8) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, Workshop: Biological effects of low-level exposure to ionizing radiation, health risks and clinical consequences, Richland, WA, USA, 2010. 5. 5.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
特になし。
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。