

201118016A

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

疾患モデル動物を用いた環境発がん初期過程の分子機構および
感受性要因の解明とその臨床応用に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 筆宝 義隆

平成24（2012）年5月

目次

I. 総括研究報告

- 疾患モデル動物を用いた環境発がん初期過程の分子機構および感受性要因
の解明とその臨床応用に関する研究 ————— 1
筆宝 義隆

II. 分担研究報告

1. ラット大腸がんモデルを用いた発がん初期過程の分子機構及び感受性要因の
解明 ————— 13
筆宝 義隆
2. ポリ ADP-リボシル化を標的とする早期からの制がん法 ————— 16
益谷 美都子
3. ラット ES 細胞の樹立およびノックアウトラットの作成 ————— 19
竹下 文隆
4. Bcl11b ヘテロ遺伝子型が与える発がん感受性と放射線発がんリスク予測 — 22
木南 凌
5. 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明 ————— 27
中島 淳
6. 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明 ————— 30
大島 正伸
7. 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 ————— 34
青木 正博
8. Apc 変異ラットを用いた大腸がん診断・治療評価系の開発 ————— 36
庫本 高志

9. 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 ——— 38
續 輝久

10. 低レベル PhIP の持続的曝露により誘発される DDR の分子機構の解明 — 40
山下 克美

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 42

Ⅳ.研究成果の刊行物・別刷

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）
総括研究報告書

疾患モデル動物を用いた環境発がん初期過程の分子機構および
感受性要因の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 筆宝義隆

独立行政法人国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨

本研究ではヒト大腸発がんの分子機構、特にがんの初期発生段階における遺伝子変異や遺伝子発現の変化や、その発がん過程を修飾する種々の環境因子および遺伝的因子の解明を目指した。マウス野生型腸管細胞から *in vitro* 遺伝的再構成により短期間で腫瘍形成が可能な新規実験系を確立した。*in vitro* で腸管発がんのイニシエーション、プロモーションの過程が再現されると同時に、環境要因の発がんへの影響も本実験系で検証可能であることを示した。Apc 変異により生じる腸管腫瘍細胞では、JNK は c-Jun の活性化を介した転写亢進と mTORC1 の活性化を介した翻訳亢進、の両面で cyclin-E、osteopontin などの発現レベルを上昇させ腫瘍の成長に寄与することを示した。酸化 DNA 損傷に起因する消化管発がんの抑制には、ミスマッチ修復系の関与が強く示唆されることを示した。AOM 誘発マウス大腸化学発癌モデルにおいて、抗糖尿病薬メトホルミンを用いて大腸ポリープの抑制効果を実証し、その分子機構として AMPK の活性化を介した mTOR 経路の抑制を示した。ヒト臨床試験でもメトホルミン投与で ACF が減少すること示した。胃炎および胃癌モデルマウスの解析により、発がん促進または発がん抑制作用のある miRNA の発現が炎症反応依存的に変化することを明らかにした。とくに、miR-7 は、「がん抑制遺伝子」的に機能することを明らかにした。放射線誘発胸腺腫瘍において胸腺内の ISP 細胞が発がん母体細胞であり、BCL11b の片アレル消失は p53-HDM2 回路の調節を介してその放射線応答による細胞周期停止を減弱させることを示した。Apc 遺伝子変異ラットで DSS 誘発大腸炎が遷延するメカニズムとして、血管内皮細胞の管形成異常による血管新生の遅延が大腸炎症を持続させる可能性が強く示唆された。独自に開発したラット ES 細胞培養培地を用いることで、相同組換やその後の長期培養、キメララットの作製を可能とし、発がんモデルである p53 ノックアウト (KO) ラットの作製に成功した。PARP 阻害剤の効果に関する解析では、DNA 修復阻害に加えゲノムワイドな DNA 脱メチル化も誘導され、Parp-1 がその主要標的であること、ガンマ線及び炭素線への増感効果は酸化的 DNA 損傷の増強によることを示した。DNA 損傷応答の初期過程を解析するために、DNA 損傷により分解が誘起される Cdc25A 制御因子解析を目指し、Tet 制御による Tandem Affinity Purification 用発現用の実験系を構築した。

分担研究者

筆宝義隆	国立がん研究センターユニット長
益谷美都子	国立がん研究センター 分野長
木南 凌	新潟大学医学部 教授
大島正伸	金沢大学癌研究所 教授
庫本高志	京都大学医学研究科 准教授
中島 淳	横浜市立大学医学部 教授
青木正博	愛知県がんセンター 部長
山下克美	金沢大学自然科学研究科 准教授
續 輝久	九州大学医学研究院 教授
竹下文隆	国立がん研究センター主任研究員

A. 研究目的

ヒト大腸発がんの分子機構、特にがんの初期発生段階における遺伝子変異や遺伝子発現の変化や、その発がん過程を修飾する種々の環境因子および遺伝的因子の解明

を目指して以下の研究を展開する。

変異原性物質により誘発されるラット大腸発がんモデル系を補完するために昨年度確立した、マウス腸管細胞の *in vitro* 発がん再構成系を用いて発がん過程の再現をさらに展開し、発がん初期過程の分子レベルでの解析を目的とする。

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る Apc Δ 716 マウスを用いて、腸管腫瘍における mTORC1 経路活性化機序、及び Smoothened 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を目的とする。

臭素酸カリウム (KBrO₃) 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の解明を目指す。

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ネクチンの発がんにおける役割を明らかにするために欠損マウスに高脂肪食を投与しその影響を解析する。糖尿病薬メトホルミンはアディポネクチン同様 AMPK を活性化させるため、大腸発がん抑制作用の有無を検討する。

胃炎および胃がんを自然発生するマウスモデルを用いて、炎症反応依存的に発現変化するがん関連 miRNAs を同定し、それらの発現制御機序や腫瘍原性への影響を解析し、炎症反応依存的発がん機構における miRNA の役割を明らかにする。

放射線発がん機構およびそのリスク評価のための基礎データを取得するために、Bcl11bKO/+マウスに誘発される放射線感受性胸腺リンパ腫と放射線により感受性が亢進する腸管腫瘍を対象に、発がん母細胞、放射線の標的細胞の同定を目指す。

Apc 遺伝子に変異をもつ KAD ラットを大腸癌評価モデルとして確立するために、同ラットが示す大腸炎高感受性の発症メカニズムの解明を目指す。

PARP 機能阻害下における DNA 修復応答及びエピジェネティック制御から細胞死の誘発機構を明らかにし、PARP 阻害剤の抗がん作用に影響を与える因子とその機構を解明し、早期がんの治療及び遺伝性がんの高リスク群の予防的治療法の基盤を確立することを目的とする。

環境発がん初期過程の分子機構の解明を目的とし、DDR 初期応答としての細胞周期停止機構に着目して、細胞周期制御因子の分解について、解析を行う。

本研究における動物モデルを用いた解析は、ヒト発がん研究のための検証系としての性格も有し、早期診断や、テーラーメイドながん予防策の構築、がんに対する新規治療薬／予防薬開発のための標的候補分子の同定など臨床応用を目指す。

B. 研究方法

(1) 腸管細胞の *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成：生後 3～5 週程度の C57B/6J マウス小腸から腺管部分を選択的に採取し、単細胞レベルまで分散させた後に、マトリゲルを用いて三次元培養を行った。約 1 週間後に、再び単細胞に分散させ、レンチウイルスベクターを用いて各種がん抑制遺伝子に対する shRNA を導入、または Cre を導入し変異型 Kras の発現を誘導 (LSL-KrasG12D マウス由来の細胞の場合) し、再び 3～4 週間三次元培養を行った後にヌードマウス皮下に接種した。4～6 週間後に腫瘍を回収し、

組織学的な評価を行った。

(2) 腸管細胞に対する環境要因による腫瘍形成促進効果の検討：炎症と化学物質 (大腸発がん物質 PhIP) について、3 次元培養下のマウス小腸細胞に与える影響を調べた。スポンゼルを腹腔内に挿入し、異物惹起炎症により誘導された活性化炎症細胞を単離し、shAPC を導入したマウス小腸細胞と 6 時間共培養 (直接、またはインサートを介して間接に) を行った。PhIP は S9mix により活性化を行い 6 時間暴露した。両者とも 4 週間の 3 次元培養後にヌードマウス皮下に接種した。

(3) Apc 変異マウス腸管腫瘍におけるシグナル経路の解析: HT29 大腸がん細胞に JNK 活性化剤の Anisomycin を投与した際、及び JNK 阻害薬 SP600125 や JNK1/2 に対する shRNA を投与した際の、Cyclin E の mRNA、タンパクレベルでの発現変化を調べた。さらに、Apc 変異マウスの腸管腫瘍で発現が亢進している遺伝子について、SP600125 および mTORC1 阻害薬 RAD001 を投与した際の mRNA、タンパクレベルでの発現変化を調べた。

(4) 酸化ストレスに起因する消化管発がんの解析: DNA 複製エラーの修復やある種の DNA 損傷によるアポトーシス誘導に関与するミスマッチ修復系の Msh2 遺伝子を欠損したマウスを用いて、(a) 食品添加物としても使用されている酸化剤の KBrO₃ の 0.2% 溶液を飲水投与し、酸化ストレス誘発発がん解析を行い、(b) 酸化ストレス誘発消化管腫瘍を用いた癌関連遺伝子の変異解析を PCR - Direct sequencing 法を用いて行った。

(5) 内臓脂肪/adiponectin/AMPK 経路の大腸発がんにおける意義の検討: (a) アディポネクチン欠損マウスに高脂肪食を付加しポリプおよび細胞増殖の変化を解析した。(b) APCMin/+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、AMPK 活性化作用を有するメトホルミンの大腸腫瘍抑制作用を検討した。(c) ヒト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。

(6) 炎症関連胃発がんにおける miRNA の関与の検討: 胃発がん PGE₂ 産生により慢性胃炎を発症する K19-C2mE マウス、および Wnt シグナル活性化と PGE₂ 産生により炎症依存的に胃がんを発生する Gan マウスを用いて、マイクロアレイおよび RT-PCR により炎症反応依存的に発現変化する miRNA を同定した。特定した miRNA の胃がん組織での発現制御機序および腫瘍原性への関与を細胞培養実験等により解析し、発がんに関与する可能性のある新規 miRNA 標的遺伝子の探索を行なった。

(7) Bcl11b 欠失による放射線発がん感受性増強効果の解析：Cs-137 を使用し、生後 8 週のマウスに 3Gy の γ 線照射を行った。FACS 解析の分化マーカーには CD4、CD8 などを用い、データの解析は Flow-Jo Software を用いた。細胞増殖、周期の測定は、マウス腹腔に BrdU 投与して 1 時間後計測した。転写活性の測定には、HDM2 の P2 プロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを作製し、HCT116 細胞 (p53+ または p53-) に導入後ルシフェラーゼ活性で判定した。

(8) Apc 遺伝子変異 KAD ラットにおける大腸炎遷延機構の解析：KAD ラットに 2%DSS を 1 週間飲水投与した。DSS 投与直後、1 週間後、3 週間後に大腸を採取した。抗 APC 抗体を用いて免疫染色を実施し、大腸炎における APC 発現細胞を同定した。抗 CD31 抗体を用いて血管内皮細胞を同定した。リンタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色により弾性繊維を染色した。さらに、初代血管内皮細胞を用いて細胞接着能、管形成能、細胞増殖能、細胞移動能を測定した。

(9) p53 ノックアウトラットの作成：Oct4 遺伝子発現を蛍光でモニターできる ES 細胞を Oct4-Venus トランスジェニックラットから樹立し、この ES 細胞において p53 遺伝子を破壊したアレルを持つ組み換えクローン (p53+/-) を取得、受精卵へのマイクロインジェクションによりキメララットを作製する。得られたキメララットを野生型ラットと交配し、ジャームライントランスミッションを介した p53+/- ラット、更には p53-/- ラットを得る。

(10) PARP 阻害による抗がん作用の解析：(a) PARP 阻害によるエピジェネティック制御の異常をマウス ES 細胞をモデルとして MeDIP 法により CpG アイランドプロファイルなどの解析により行った。(b) PARP 阻害剤による制がん作用及び放射線との併用効果の検討はコバルト 60 照射装置、炭素線照射は放射線医学総合研究所の HIMAC で行い、フローサイトメトリーなどの分子生物学的解析を行った。

(11) DNA 障害応答の初期反応としての Cdc25 の分解機構の解析：Cdc25A と Cdc25B について、Tandem Affinity Purification (TAP) により、DNA 損傷特異的に結合する因子を、質量分析により解明するために、それぞれの Cdc25 の N-末端側に streptavidin 結合ペプチド (SBP) とカルモジュリン結合ペプチド (CBP) をタンデムに配置した cDNA を作製し、テトラサイクリン添加で発現が誘導されるベクターに移した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、所属施設の定める

動物実験に関する規約を遵守し、実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いた。動物の苦痛に対する十分な配慮を払い、屠殺は麻酔と放血の併用で行った。ヒト試料を用いた解析は、疫学研究の倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) 腸管細胞の *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成：APC に対する shRNA を導入した時のみ、3 次元培養中の腸管細胞 organoid の形態が球形になり Wnt 経路の活性化が誘導され皮下腫瘍が形成された。一方、shp53 や shPTEN を単独で導入した場合や、ベクターコントロールのみの導入では腫瘍は誘導されなかった。shAPC に shp53 や shPTEN を組み合わせ導入した際には腫瘍径の増大を認めた。組織型は間質の増生が顕著で、不整形の腺管構造および粘液の貯留が認められた。Ki67 陽性細胞の比率は導入した shRNA に関係なく 50-60%と、高い増殖性を示した。

LSLKrasG12D マウス由来腸管細胞に Cre の導入による Kras の活性化と shAPC の導入を単独または組み合わせで行ったところ、皮下移植した際に変異型 Kras と shAPC は著明な協調作用を示し、2 週間後 2cm 大となるなど急速な腫瘍の増殖を観察した。腫瘍増大の原因は漿液の貯留による膨張もあるが、実質部分の増大も顕著であった。組織学的には細胞密度が高く、拡張した腺管は目立たなかった。この時点で同時に解剖したところ、shAPC と変異型 Kras は同程度の大きさの小腫瘍の状態であった。組織学的にはこれまで同様の腫瘍組織型を示したが、変異型 Kras は単純な円形の腺管を少数認めるのみで、しかも Ki67 はほとんど陰性の非増殖性細胞によって構成されていた。

(2) 腸管細胞に対する環境要因による腫瘍形成促進効果の検討：shAPC 導入後に炎症細胞との共培養を行い、4 週間後にヌードマウス皮下に接種したところ、共培養群では、直接法、間接法ともに非処理群の細胞と比較して腫瘍径の増大を見た。炎症細胞との共培養により活性化したシグナル経路を探索するためにマイクロアレイ解析を行ったところ、共培養群は非処理群とは全く異なる発現プロファイルを示す一方、共培養群の直接法、間接法は非常に類似していた。また、共通の転写制御に関与する因子として STAT3 が実際に活性化していることを見出した。PhIP 暴露を行った細胞は、3 次元培養においては Wnt 活性化を示す球形の organoid の誘導を示さなかった。また、皮下に小腫瘍を形成したが、組織型においても不整形の腺管構造を示さず、また

上皮細胞の成分はごく少量であった。

(3) Apc 変異マウス腸管腫瘍におけるシグナル経路の解析: HT29 細胞における Cyclin E のタンパクレベルでの発現は Anisomycin 投与により顕著に上昇し、その上昇は RAD001 投与や shRNA による JNK1/2 のノックダウンにより強く抑制された。一方、Anisomycin 刺激を受けた HT29 細胞では Cyclin E の mRNA レベルでの発現も顕著に上昇しており、その上昇は RAD001 による影響は受けなかったが、転写因子 c-Jun のノックダウンにより抑制された。また、Apc 変異マウスの腸管腫瘍で発現上昇の見られた遺伝子のうち、osteopontin と proliferin のタンパクレベルでの発現は RAD001 投与により顕著に減少したが、その mRNA レベルでの発現は変化しなかった。一方でこれらの遺伝子の mRNA レベルでの発現は SP600125 投与によって顕著に低下した。

(4) 酸化ストレスに起因する消化管発がんの解析: Mutyh 遺伝子欠損マウスを用いた 0.2% KBrO3 溶液を 16 週間連続飲水投与した消化管発がん実験では、野生型マウスと Mutyh 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、KBrO3 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 個体当たりの平均腫瘍数は、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、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 例を除いて全てヴィエナ分類のカテゴリー 4 と診断された。Msh2 遺伝子欠損マウスに誘発された腫瘍における Ctnnb1 遺伝子の解析は進行中であるが、G→A 変異が多く検出されている。

(5) 内蔵脂肪/adiponectin/AMPK 経路の大腸発がんにおける意義の検討: 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。また、マウスの 2 つの発癌モデルにおいて、どちらもメトホルミン投与により AMPK を活性化することによりポリープの増大が抑制されることを示した。またヒトにおいて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、1 カ月間の投与で ACF は有意に減少した。

(6) 炎症関連胃発がんにおける miRNA の関与の検討: マイクロアレイ解析により、炎症反応依存的に「がん遺伝子」としての機能が報告されている miR-21 と miR-155 の発現が上昇し、「がん抑制遺伝子」として報告されている miR-7 および miR-145 の発現が低下することを明らかにした。そこで、miR-7 に着目して解析を進めた。miR-7 はマウス正常胃上皮細胞で分化にともなって発現誘導されること、および胎仔期から成熟期にかけてマウス胃組織で発現が上昇することを明らかにした。また、胃がん組織では、TNF や IL-1 β などの炎症性サイトカイン発現量と逆相関して、miR-7 発現量が変化しており、炎症反応が強いほど miR-7 発現の抑制が認められた。また、miR-7 の強制発現により胃がん細胞の細胞増殖率および腫瘍原性が低下した。さらに、新規 miR-7 標的遺伝子を同定し、それらが胃がん組織で miR-7 と逆相関して発現誘導されていることを明らかにした。

(7) Bcl11b 欠失による放射線発がん感受性増強効果の解析: (a) CD4-Cre;Bcl11b^{fllox/+}マウスを用い、放射線発がん実験を行ったが、Lck-Cre;Bcl11b^{fllox/+}マウスとは異なり前リンパ腫の発生は見られなかった。従って、DN4, ISP, DP-TCR β low の細胞種が、放射線誘発胸腺リンパ腫の発がん母体と考えられた。(b) 放射線照射後の細胞周期停止への Bcl11bKO/+遺伝子型の影響を検討した。ISP 細胞で、S 期から G1 期への細胞周期進行の停止が減弱することが示された。(c) DNA 損傷時 p53 は HDM2 とフィードバック調節回路を構成する。この調節に BCL11B が関与するかを調べた。p53 依存性の HDM2 プロモーター活性化を、BCL11B が抑制すること、また p53 結合部位に直接結合することがわかった。 γ 線照射による p53 の活性化という条件下では、BCL11B による HDM2 プロモーター活性の抑制作用には減弱がみられた。

(8) Apc 遺伝子変異 KAD ラットにおける大腸炎遷延機構の解析: 抗 APC 抗体を用いた免疫染色の結果、無処置では APC タンパク質は粘膜上皮細胞に発現が見られた。一方、大腸炎症領域では血管内皮細胞に強い発現が見られた。この APC 発現変化は F344 および KAD ラットで同様であった。抗 CD31 抗体を用いた免疫染色の結果、KAD ラット大腸の炎症領域では、F344 ラットに比べて有意に血管数が減少しており、血管新生の遅延が観察された。また PTAH 染色の結果、F344 ラットの大腸炎症領域ではフィブリン層が損傷粘膜層を覆っていた一方、KAD ラットの炎症領域ではほと

んど見られず、粘膜下層にフィブリン塊が蓄積していた。KAD 血管内皮細胞は F344 に比べて細胞接着能が増加していた。また KAD 血管内皮細胞は F344 に比べて太く分岐の少ない管構造を形成した。細胞増殖、細胞移動能に差は見られなかった。

(9) p53 ノックアウトラットの作成：本来のジーンターゲット法は相同組み換え効率極めて低いが、今回 Zinc-finger nuclease を用いることで劇的に向上させ、7つのクローニングで6つ(86%)正しい組み換え体を取得することができた。スクレオフェクションによる遺伝子導入、クローニング、長期培養を行ってもこれらの p53^{+/-} ES 細胞は安定しており、Oct4-Venus の発現は維持され、染色体異常は全く起こさなかった。ES 細胞を受精卵にインジェクションするとキメララットが容易に作製でき、掛け合わせにより p53^{+/-} ラット、更には p53^{-/-} ラットを作製することに成功した。p53^{-/-} ラットは4ヶ月以内がんに発症し、死亡することを確認した。興味深いことに p53^{-/-} マウスは主にリンパ腫を発症するのに対し、p53^{+/-} ラットの場合は多くが肉腫を発症し、マウスとは異なる表現型を有することが分かった。

(10) PARP 阻害による抗がん作用の解析：
(a) PARP 阻害剤及び Parp1 機能阻害下によるエピジェネティック制御異常：PARP 阻害剤 PJ-34 処理2日後の mESCs においてゲノムワイドに CpG メチル化状態を解析すると、広範な CpG の脱メチル化が観察された。脱メチル化あるいはメチル化亢進が認められた多くの領域は Parp-1^{-/-} mESCs での変化と共通であった。Parp-1^{-/-} mESCs における CpG 脱メチル化が H19 と Cdx2 の発現誘導を介して trophoblast 分化を誘導することが示され、PARP 阻害剤は trophoblast 分化を増強することが示唆された。
(b) PARP 阻害剤による制がん作用及び放射線との併用効果の検討： γ 線、炭素線への PARP 阻害剤の増感効果の作用機序は共に、細胞周期 S 期停止と DNA 二本鎖切断のプロセッシング遅滞であることが示唆された。

(11) DNA 障害応答の初期反応としての Cdc25 の分解機構の解析：Cdc25A と Cdc25B は N-末端領域にリン酸化で安定性が制御される領域を有する。昨年までの研究で、その領域のみが発現された細胞に DNA 損傷を与えると、分解が誘発される事が明らかとなったが、一方で分解に要する時間が全長のものよりも長い事がわかっている。また、Cdc25A や Cdc25B の安定性は自身の phosphatase 活性によっても変化する。即ち、活性がある方が不安定である。以上の事から、本研究で

は Cdc25A、Cdc25B の全長タンパク質を細胞内で発現させ、それらに結合する因子を同定する事とした。

SBP と CBP をタンデムに Cdc25A/B の N-末端側に付加し、さらにその上流に発現検出および精製のために Myc タグ付加した。これらを Tet-ON 細胞へ導入し、Tet 添加の有無により発現を検出したところ、Tet 添加特異的に目的タンパク質が検出され、TAP 解析用 cDNA の分離を確認した。

D. 考察

(1) 腸管細胞の *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成：本年度は、マウス野生型腸管細胞からでも *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成が可能であることを確認した。本実験形を用いて shAPC の導入のみにより腫瘍が形成されること、他の遺伝子単独では腫瘍が形成されないこと、shAPC に加えて他の shRNA の導入や変異型 Kras の誘導によりさらに進展していくこと、などを見出した。これらは遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* での報告と基本的に一致した結果であり、*in vitro* でも腸管発がんのイニシエーション、プロモーションの過程が再現されていることを強く示唆した。ここまで、ヒト大腸がんで変異の頻度が特に高いがん関連遺伝子で、遺伝子改変マウスによる個体レベルの研究結果が先行しているものについて、proof of concept の目的で検証を行ってきたが、今後は、さらに大腸がん関連遺伝子について、遺伝子改変マウスが未作成のものについても検討を広げていくことを予定している。

(2) 腸管細胞に対する環境要因による腫瘍形成促進効果の検討：一方、shAPC によりイニシエーションが確立された細胞について、炎症を模倣した短時間の共培養を用いて腫瘍形成が促進されることを示した。すなわち、遺伝的要因のみならず、環境要因によるプロモーションも *in vitro* で再現可能であることを示した。特に、炎症と関連し、多くのがんで活性化されている転写因子 STAT3 について実際に活性化を誘導できたことは興味深く、同系を用いた炎症と大腸発がんの関連の研究に道を開くものと考えられる。

PhIP は、大腸発がんのイニシエーション、プロモーションのそれぞれに関与している可能性が高いと想定されているが、その程度や分子機構に関する理解はいまだ不完全である。本実験型を用いることで shAPC より弱いもののイニシエーション作用が存在することが示唆された。現在プロモーション作用の有無を shAPC 導入細胞を用いて検討中である。なお、PhIP はマウスへ個体への投与では大腸

がんよりもリンパ腫が先に発症するため、DSS などにより炎症刺激を組み合わせることが必要であったが、本実験では *in vitro* で腸管細胞のみを対象にした解析であるため、純粋に PhIP の腸管上皮への影響を観察することが可能なのは大きな利点といえる。

(3) Apc 変異マウス腸管腫瘍におけるシグナル経路の解析：上記の研究結果から、Apc 変異マウスの腸管腫瘍細胞では、cyclin E、osteopontin、proliferin という3つの分子が、JNK によって活性化された mTORC1 により翻訳レベルでの発現調節を受けること、そして予期せぬことに、JNK は同時に c-Jun の活性化を介してこれらの分子の発現を転写レベルにおいても正に制御していることが示唆された。Cyclin E、osteopontin、proliferin はそれぞれ、細胞周期、がん細胞の増殖・転移、血管新生に重要な役割を果たすことが知られており、活性化された JNK は c-Jun の活性化と mTORC1 の活性化という二つの分子機序を用いてこれら重要な分子の発現を強力に亢進させることによって、腸管腫瘍の成長、進展を促進する可能性が示唆された。

(4) 酸化ストレスに起因する消化管がんの解析：通常の飼育条件下で育てた野生型マウスの腸管上皮では、加齢と共に酸化ストレスに起因する突然変異が蓄積する。また、酸化 DNA 損傷による突然変異を抑制する MUTYH 遺伝子を欠損した 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。これらの事実から、腸管での酸化ストレスがミスマッチ修復遺伝子欠損による HNPCC 発症の要因であることが考えられる。今回の KBr03 投与は Msh2 遺伝子欠損マウスの腸管での上皮性腫瘍の発生頻度を顕著に上昇させた。このことは、上記の仮説を強く支持する。現在、Msh2 遺伝子欠損マウスに誘発された腫瘍での変異解析を行っているが、これまでの解析では酸化ストレスに起因する G→T 変異は稀で、多数の G→A 変異が検出されている。今後さらに酸化ストレス誘発変異の詳細な解析を行うことで、ミスマッチ修復欠損により引き起こされるヒト HNPCC の発がん機序の解明を進めたい。

(5) 内蔵脂肪/adiponectin/AMPK 経路の大腸がんにおける意義の検討：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に肥満、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。現

在、ポリペクトミーによりクリーンコロニーとなった患者を対象にポリープの再発をエンドポイントとしたメトホルミンとプラセボを用いた無作為対照前向き試験を実施中である。

(6) 炎症関連胃発がんにおける miRNA の関与の検討：がん遺伝子およびがん抑制遺伝子として作用する miRNA が、炎症反応により発現誘導および発現抑制されているので、炎症反応は様々な分子機序によりがん関連 miRNA の発現変化を誘導して発がん促進に関与すると考えられた。miR-7 発現が正常上皮細胞の分化にともなって誘導されることから、miR-7 発現抑制は、腫瘍細胞の未分化性の維持に重要であると考えられた。miR-7 はすでに脳腫瘍や肺がんが発がん抑制遺伝子として報告されているが、胃がん組織でも炎症反応依存的に発現が低下し、実際に胃がん細胞の増殖率や腫瘍原性を抑制することから、胃がん発生に対しても「がん抑制遺伝子」として作用すると考えられた。本研究では新規 miR-7 標的遺伝子 (Lphn2、Basp1、Mafg) を特定したが、それらによる発現への関与はこれまでに報告がなく、今後の検討課題として重要である。

(7) Bcl11b 欠失による放射線発がん感受性増強効果の解析：(a) BCL11b の片アレルが胸腺細胞の分化段階特異的に欠失するマウスでは、DN4、ISP、DP-TCRβ low という複数の分化段階で分化の進行に障害を与えること、これら分化した細胞種が放射線誘発胸腺リンパ腫・ヒト TALL モデルの発がん母体となることが示された。がん細胞の特性に影響する発がん母体細胞を特定したことはがん治療を考える上で重要である。(b) Bcl11bKO/+ 遺伝子型が電離放射線照射による細胞周期進行の停止を減弱することが示された。T-ALL の発症に寄与する遺伝子変異は2種類に大別されるが、(a) (b) の結果は、BCL11B 変異が細胞周期などに影響するタイプ B グループに属することを示唆する。(c) DNA 損傷時にみられる p53 と HDM2 とのフィードバック調節回路に、BCL11B は直接影響する。DNA 損傷応答へのこの寄与が発がん機構の一つであると考えられた。

(8) Apc 遺伝子変異 KAD ラットにおける大腸炎遷延機構の解析：APC タンパク質は消化管内では粘膜上皮細胞に主に発現し、腸管上皮の維持・再生を制御することが知られている。今回、大腸炎症時において、血管内皮細胞に APC タンパク質の高発現が見られた。このことから、APC タンパク質が炎症時の血管内皮細胞の挙動変化に、何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。今回 KAD ラットで異常が見られたフィブリン層の形成・血管新生

は、炎症修復過程における重要な過程の一つとして知られている。また培養細胞を用いた解析の結果、KAD ラットの血管内皮細胞は太く分岐の少ない管構造を形成した。このことから、KAD ラットで大腸炎症が持続する要因の一つに、血管内皮細胞の管形成異常に基づく血管新生の遅延が生じ、その結果炎症修復が遅延することが考えられた。

(9)p53 ノックアウトラットの作成：現在ラット ES 細胞は2種類の低分子化合物と LIF(2i+LIF) が加えられた無血清培地で培養されているが、この培養法では長期培養により染色体異常が生じ、遺伝子改変ラットを作製することは極めて困難とされている。我々が容易に p53 KO ラットを作製できたのは4低分子化合物と20%の血清含培地 (YPAC 培地) がラット ES 細胞培養に適しているためであり、今後 p53 KO のみならず、がん関連遺伝子の KO ラットを量産することが期待できる。

P53 KO ラットがマウスと異なるがん種を発症したことから、遺伝子改変ラットを用いた発がん研究は非常に有用であり、外科的処置、連続採血などラット特有の実験系を組み合わせることができる。また、我々の開発した Oct4-Venus トランスジェニックシステムを利用することで、がん幹細胞の挙動を追跡することが可能となり、これにより新規の発がんメカニズムの解明が期待できる。

(10)PARP 阻害による抗がん作用の解析：PARP 阻害剤は、DNA 修復阻害剤として臨床応用が試みられているが、ゲノムワイドな DNA 脱メチル化誘導をはじめとするエピゲノム変化を誘導することから、その作用機序の解明と他のエピゲノ製剤のような早期がんへの制がん作用の基礎的検討をさらに行う必要がある。γ線など低 LET 放射線だけでなく炭素線など高 LET 放射線に対しても重致死性の酸化的 DNA 損傷を致死的な損傷へ転換することにより増感に有用である可能性が考えられる。

(11)DNA 障害応答の初期反応としての Cdc25 の分解機構の解析：Cdc25A と Cdc25B は N-末端領域に、DNA 損傷や非遺伝毒性細胞ストレスに応答して分解が制御される領域を有する。当初はこの領域を蛍光タンパク質と融合して細胞に発現させ、siRNA ライブラリー等で安定性制御に関わる遺伝子を同定する事を計画したが、蛍光強度の関係から断念した。

そこで、Cdc25A、Cdc25B それぞれを TAP により分離し、結合タンパク質を質量分析で同定する事とした。実際には、Cdc25A/Cdc25B の N-末端側に streptavidin 結合ペプチド (SBP) とカル

モジュリン結合ペプチド (CBP) をタンデムに配置し、さらに Myc タグを N-末端側に付加した。これにより、抗 Myc 抗体による精製と streptavidin カラム、calmodulin カラムを組み合わせ、マイルドな条件で Cdc25A または Cdc25B 複合体を得る事が可能と思われる。

E. 結論

マウス野生型腸管細胞から in vitro 遺伝的再構成による腫瘍形成が可能であることを確認し、in vitro でも腸管発がんのイニシエーション、プロモーションの過程が再現されることが強く示唆された。また、遺伝的要因のみならず、化学物質や炎症など、環境要因の腸管発がんへの影響も本実験系で検証可能であることを見出した。発がんの初期過程の解析が大きく進展することが期待される。

昨年度までに、Apc 変異マウスの腸管に生じる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、さらに JNK は 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 を活性化することを明らかにした。本年度の研究結果から、JNK は c-Jun の活性化を介した転写の亢進、mTORC1 の活性化による翻訳の亢進という二つの異なる分子機序によって cyclin E、osteopontin、proliferin などの発現レベルを上昇させて腫瘍の成長に寄与することが示唆された。ヒト大腸がんにおいて JNK の活性化は oncogenic に作用することが示唆されているが、本研究はその分子機序を明らかにするものであり、JNK 経路が大腸がんの予防・治療標的となる可能性を強く示唆している。

ミスマッチ修復遺伝子が変異するとヒトでは HNPCC が発生する。他の臓器に比べて消化管は酸化ストレスの負荷が大きいことを示すデータを得ていたため、ミスマッチ修復遺伝子欠損による HNPCC の発症には、酸化ストレスが環境要因であるという仮説を立てた。今回、私達は KBrO3 投与が Msh2 遺伝子欠損マウスの腸管上皮性腫瘍の発生頻度を顕著に上昇させる事を見出し、ミスマッチ修復因子 MSH2 が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を明らかにした。従って、ミスマッチ修復機能の欠損によって引き起されるヒト HNPCC 発症には酸化ストレスが要因であることが強く示唆される。ミスマッチ修復が実際に酸化 DNA 損傷の修復に直接関わっているのか明らかではない。ミスマッチ修復遺伝子の欠損によって引き起されるヒト HNPCC の発がん機序解明のため

に酸化ストレス誘発変異の詳細な解析を進めていく必要がある。

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に肥満、糖尿病など生活習慣病としての側面を持つため、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り、現在そのための臨床試験を実施中である。

がん遺伝子およびがん抑制遺伝子として作用する miRNA の中には、それぞれ炎症反応により発現誘導および発現抑制されるものが存在することが明らかとなった。炎症反応依存的に発現抑制される miR-7 は、胃上皮細胞の分化に参与している可能性があり、また miR-7 発現誘導が胃がん細胞の腫瘍原性を抑制することから、miR-7 は胃がん発生に対して「がん抑制遺伝子」として作用する miRNA と考えられた。炎症反応に依存した miR-7 の発現低下により、胃がん組織では Lphn2、Basp1、Mafg などの miR-7 標的遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。以上の結果から、炎症反応に依存した miR-7 発現の抑制性制御は、将来的に胃がん発生の予防または治療薬開発の標的としてなることが期待される。

白血病モデル・胸腺リンパ腫の発症の母体となる細胞、放射線の標的細胞の同定を試みた。DN2 分化段階以降で Bcl11bK0/+ の遺伝子型となるマウスでは前リンパ腫は検出されるが、DP 分化段階以降の細胞で Bcl11bK0/+ となるマウスでは検出されなかった。従って、DN4, ISP, DP-TCR β low の細胞種が、放射線誘発胸腺リンパ腫の発がん母体と考えられた。これらの発がん母体細胞の特性を、照射後細胞周期停止との関連で検討した。Bcl11bK0/+ 遺伝子型により、S 期から G1 期への細胞周期進行の停止が減弱することが示された。停止が減弱すると、生じた DNA 損傷が蓄積する頻度が増すことになり、これが発がん機構の一つと考えられた。分子レベルでの機構解明のため、培養細胞を用いて解析した。DNA 損傷時 p53 は HDM2 とのフィードバック調節に従うが、この調節に BCL11B が直接関与することがわかった。

KAD ラットを用いることで、炎症時、APC タンパク質が血管内皮細胞に強く発現し、血管新生の制御を介して大腸炎修復過程に重要な役割を示すことを明らかとした。本研究を発展させることで、Apc 遺伝子の生体内における新規機能を明らかにすることが期待される。

ES 細胞からの遺伝子改変ラット作製は

未だ困難とされているが、今回我々は 4 つの低分子化合物と血清とを組み合わせた培養法により、極めて安定的な ES 細胞の培養を可能とし、Oct4-Venus トランスジェニックラットのみならず、p53 ノックアウトラットの作製に成功した。この成果は比較的容易にラット ES 細胞から遺伝子改変ラットを作製できることを証明し、今後他の遺伝子改変ラットの作製が期待できる。

p53 K0 ラットが主に肉腫を発症し、マウスとは異なる表現型を示したことから、マウスでは困難であったヒトがんモデルの作製や、マウスでは見いだせなかった隠れたがん発症メカニズムを解明できる可能性があり、これを元に新たな創薬研究を展開する。

今年度は、テクニカルな事情により当初の計画を変更し、Cdc25A と Cdc25B の制御因子のうちそれぞれのタンパク質に結合する因子を TAP 法により精製し、質量分析により同定するというアプローチをとる事とした。

Myc-SBP-CBP というタグを付加した Cdc25A/ Cdc25B およびコントロールとして作製した Cdc25C は、Tet-ON/HeLa 細胞へ一過的に導入し、Tet の存在下で特異的に発現が誘導される事が確認されていることから、目的のプラスミドは完成されたと考えられる。

Tet-ON/HeLa 細胞は発現細胞株の分離やタンパク質精製に適さない事もわかったため、取扱いが容易な HeLaS3 細胞から Tet-ON 細胞株を樹立中であり、目的の細胞株が得られ次第、TAP 誘導発現細胞株の分離に取りかかる。今年度中に TAP 精製を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takasu S, Mutoh M, Takahashi M, Nakagama H. Lipoprotein lipase as a candidate target for cancer prevention/therapy. *Biochem Res Int.* 2012 in press
2. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res.* 71:4628-4639, 2011.
3. Izumiya M, Tsuchiya N, Okamoto K, Nakagama H. Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer*

- Science, 102:1615-1621, 2011.
4. Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K, Masutani, M. Radiosensitization effect of PARP inhibitor in cells exposed to low and high LET radiation. *Cancer Sci.*, in press.
5. Osada T, Masutani, M. Poly ADP-ribosylation in postfertilization and genome reprogramming: implications for carcinogenesis. In: A. S. Gomes Ed. *Polymerization / Book 1*, Rijeka, Croatia: In Tech, in press.
6. Hagiwara, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takahashi, RU., Takeshita, F. and Ochiya, T.: Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity. *Sci. Rep.*, 2:314(2012).
7. Hirose, Y., Saijou, E., Sugano, Y., Takeshita, F., Nishimura, S., Nonaka, H., Chen, Y.R., Sekine, K., Kido, T., Nakamura, T., Kato, S., Kanke, T., Nakamura, K., Nagai, R., Ochiya, T. and Miyajima, A.: Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109:4263-4268(2012).
8. Narumi, K., Udagawa, T., Kondoh, A., Kobayashi, A., Hara, H., Ikarashi, Y., Ohnami, S., Takeshita, F., Ochiya, T., Okada, T., Yamagishi, M., Yoshida, T. and Aoki, K.: In vivo delivery of interferon- α gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance in reconstituted lymphopenic hosts. *Gene Ther.*, 19:34-48(2012).
9. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Takeshita, F. and Ochiya, T.: Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J. Biol. Chem.*, 287:1397-1405(2011).
10. Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Minoura, K., Takahashi, RU., Takeshita, F., Taya, T., Horii, R., Fukuoka, Y., Kato, T., Kosaka, N. and Ochiya, T.: An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells. *Mol. Cancer*, 10:135(2011).
11. Kawamata M. and Ochiya T. Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis. *Cell Mol Life Sci.*, 68:1911-1915 (2011). (連携研究者の川又、落谷らによる発表)
12. Kawamata M. and Ochiya T. Establishment of Embryonic Stem Cells and Generation of Genetically Modified Rats. *INTECH*, 383-396 (2011). (連携研究者の川又、落谷らによる発表)
13. Go, R., Takizawa, K., Hirose, S., Katsuragi, Y., Aoyagi, Y., Mishima, Y., and Kominami, R. Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a Bcl11b tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. *Leu Res.* in press (2012).
14. Kominami, R. Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proc Jpn Acad Ser B.* 88: 72-87 (2012).
15. Obata, M., Kominami, R., and Mishima, Y. BCL11B tumor suppressor inhibits HDM2 expression in a p53-dependent manner. *Cell Signal.* 24: 1047-1052 (2012).
16. Enomoto, T., Ohmoto, M., Iwata, T., Uno, A., Saitou, M., Yamaguchi, T., Kominami, R., Matsumoto, I., and Hirota, J. Bcl11b/Ctip2 controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. *J Neurosci.* 31: 10159-10173 (2011).
17. Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima N, Wada K, Takeda K, Nakagama H, Nakajima A. Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut.* 2011 Oct;60(10):1363-71.
18. Sakai E, Takahashi H, Kato S, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Maeda S, Yoneda M, Taguri M, Nakajima A. Investigation of the prevalence and number of aberrant crypt foci associated with human colorectal neoplasm. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Sep;20(9):1918-24.
19. 高橋宏和、藤井徹朗、山田英司、大久保秀則、日暮琢磨、酒井英嗣、細野邦広、遠藤宏樹、中島淳 特集/外来で診る肥満症 肥満の合併症 がん 臨床と研究・88巻7号 p.43(829)-46(832) 出版社 大道学館 2011年
20. 中島淳、細野邦広、遠藤宏樹、高橋宏和 特集 AMPキナーゼと糖・脂質・エネルギー代謝 update AMPキナーゼと癌内分泌・糖尿病・代謝内科 第33巻 第2号 p.115-122 科学評論社 2011年
21. 高橋宏和、細野邦広、中島淳 大腸

線種切除後の再発予測因子としての aberrant crypt foci の検討 日本消化器がん検診学会雑誌 第 49 巻 5 号 (210)2011

22. Kong, D., Piao, Y. S., Yamashita, S., Oshima, H., Oguma, K., Fushida, S., Fujimura, T., Minamoto, T., Seno, H., Yamada, Y., Satou, K., Ushijima, T., Ishikawa, T., and Oshima, M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene*, 2011 in press
23. Oshima, H., and Oshima, M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 47: 97-106 (2012)
24. Oshima, H., Popivanova, B. K., Oguma, K., Kong, D., Ishikawa, T., 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)
25. Fujishita, T., Aoki, M., and Taketo, M. M. JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through activation of mTOR complex 1 in *Apc* Δ 716 mice. *Gastroenterology*, 140:1556-1563 (2011).
26. Kuramoto T, Kuwamura M, Tagami F, Mashimo T, Nose M, Serikawa T. Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal glomerulosclerosis. *Exp Anim*. 2011;60(1):57-63.
27. Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T. A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg²⁺ channel MRS2 results in demyelination in the rat. *PLoS Genet*. 2011;7(1):e1001262.
28. Kuramoto T, Yokoe M, Hashimoto R, Hiai H, Serikawa T. A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the *Edaradd* gene. *BMC Genet*. 2011;12(1):91.
29. Lim, T.-H., Fujikane, R., Sano, S., Sakagami, R., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., and Hidaka, M. Activation of AMP-activated protein kinase by MAP1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair*, 11: 259-266 (2012)
30. Uchida S., Watanabe N., Kudo Y.,

Yoshioka K., Matsunaga T., Ishizaka Y., Nakagama H., Poon R. Y. C., and Yamashita K. SCFbTrCP mediates stress-activated MAPK-induced Cdc25B degradation. *Journal of Cell Science* 124: 2816-2825 (2011)

2. 学会発表

1. 筆宝義隆、小沼邦重、落合雅子、中釜 斉 腸管発がんの *in vitro* 再構成 第 26 回発癌病理研究会、札幌 (2011 年 8 月)
2. 筆宝義隆、中釜 斉 腸管発がんの *in vitro* 再構成 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011 年 10 月)
3. 小沼邦重、土橋祥子、落合雅子、中釜 斉、筆宝義隆 Dissecting potential roles of inflammation in carcinogenesis with *in vitro* reconstitution model 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011 年 10 月)
4. 小沼邦重、筆宝義隆、中釜 斉 *In vitro* reconstitution of inflammation-related colon carcinogenesis 第 16 回日韓がん研究ワークショップ、札幌 (2011 年 12 月)
5. 小沼邦重、筆宝義隆、土橋祥子、落合雅子、稲瀬安希、中釜 斉 *in vitro* 腸管発がん再構成系における炎症の発がん促進作用 平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津 (2012 年 1 月)
6. 稲瀬安希、筆宝義隆、小沼邦重、土橋祥子、落合雅子、中釜 斉 *in vitro* 発がん再構成系を用いた MSH2 欠損関連大腸発がん経路の解析 平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津 (2012 年 1 月)
7. 益谷美都子、平井崇久、白井秀徳、藤森 浩彰 PARP 阻害剤の抗がん剤としての作用機構、第 15 回学術集会日本がん分子標的治療学会学術集会、東京 (2011 年 6 月) (第 15 回学術集会 PROGRAM; P. 55, 2011 年)
8. 益谷美都子 PARP の機能と抗がん剤としての PARP 阻害剤の作用機序遺伝医学合同学術集会 2011、京都 (2011 年 6 月)
9. Hiroaki Fujimori, Mitsuko Masutani. Hypomethylation in H19/Igf2 imprinting control region of *Parp-1* deficient mouse embryonic stem cells triggers trophoblast differentiation. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011 年 10 月)
10. Takahisa Hirai, Hidenori Shirai, Ryuichi Okayasu, Keisuke Sasai, Mitsuko Masutani, Radiosensitization effect of PARP inhibitor in cells exposed to low and high LET radiation,

ASTRO 53rd Annual Meeting, Miami, Florida, USA. (2011年:10月)

11. 平井 崇久、白井 秀徳、岡安 隆一、笹井 啓資、益谷 美都子、 γ 線、及び炭素線照射に対するPARP阻害剤による増感作用、日本放射線腫瘍学会第24回学術大会、神戸(2011年12月)

12. 藤森浩彰、益谷美都子 Parp-1欠損マウスES細胞におけるH19/Igf2 ICRの脱メチル化は、トロホブラスト分化を誘導する。第84回日本生化学会大会、神戸(2011年9月)

13. 木南凌、坂牧僚、葛城美德、中釜斉、落合雅子 Bcl11bはベータカテニンの転写とDNA損応答を制御する腸管腫瘍抑制遺伝子である 第70回日本がん学会学術総会、名古屋(2011年9月)

14. 中島淳、遠藤宏樹、酒井英嗣、高橋宏和 肥満と大腸癌：メカニズムと予防 第28回日本医学会総会2011東京6からだの調節と代謝 シンポジウム 肥満の成因と治療 平成23年4月 東京

15. Hiroki Endo, Kunihiro Hosono, Takashi Uchiyama, Hirokazu Takahashi, Masahiko Inamori, Atsushi Nakajima. Leptin Signaling Regulates Colorectal Tumor Growth Through Stat3 Signaling: Tumor Growth Induced by Dietary Intake: AACR 101st Annual Meeting. 2011 April, Washington D.C.

16. Kunihiro Hosono, Hiroki Endo, Atsushi Nakajima, Hirokazu Takahashi. Metformin Suppresses Azoxymethane Induced Colorectal Carcinogenesis Via Activating AMP-Activated Protein Kinase: AACR 101st Annual Meeting. 2011 April, Washington D.C.

17. 内山崇、高橋宏和、中島淳 肥満関連大腸癌におけるレプチンシグナルの関与 第1回 肥満と消化器疾患研究会(日本消化器病学会 附置研究会) シンポジウム：「内臓脂肪型肥満の成立と臓器障害」平成23年5月 東京

18. 高橋宏和、藤井徹朗、山田英司、大久保秀則、日暮琢磨、酒井英嗣、内山崇、細野邦広、遠藤宏樹、中島淳 大腸線種発症に寄与する肥満指標の検討 第1回 肥満と消化器疾患研究会(日本消化器病学会 附置研究会) 平成23年5月 東京

19. 八木浩一、高橋宏和、赤木究、瀬戸泰之、油谷浩幸、中島淳、金田篤 大腸線種におけるメチル化エピジェノタイプと癌遺伝子変異との相関 第70回日本癌学会学術総会 平成23年10月 名古屋

20. 酒井英嗣、森岡孝満、崔長旭、高松玲佳、日暮琢磨、大久保秀則、山田英司、遠藤宏樹、細野邦広、高橋宏和、中島淳、吉見直己 孤発性大腸癌患者における

MDFの病理学的検討 第70回日本癌学会学術総会 平成23年10月 名古屋

21. 山田英司、杉山美智子、大久保秀則、日暮琢磨、酒井英嗣、細野邦広、遠藤宏樹、高橋宏和、中島淳 IL-6導入モデルにおける大腸発癌の検討 第70回日本癌学会学術総会 平成23年10月 名古屋

22. 内山崇、高橋宏和、中島淳 大腸内視鏡サーベイランスの設定に Aberrant crypt foci (ACF)測定は有効か? 消化器がん検診・消化器病学会・消化器内視鏡学会合同 シンポジウム 11. 消化器がんの発育速度と有効な検診間隔 平成23年10月 福岡

23. 内山崇、高橋宏和、酒井英嗣、細野邦広、遠藤宏樹、中島淳 散発性大腸発癌におけるIL-6シグナルの解析 第53回日本消化器病学会大会 平成23年10月 福岡

24. 大久保秀則、冬木晶子、松浦哲也、谷口礼央、留野渉、内山崇、村田依子、栗山仁、秦康夫、遠藤宏樹、高橋宏和、中島淳 内視鏡的大腸ポリープ切除後の検査間隔に影響するリスクファクターの検討 第53回日本消化器病学会大会 平成23年10月 福岡

25. Eiji Sakai, Hirokazu Takahashi, Shingo Kato, Takashi Uchiyama, Kunihiro Hosono, Hiroki Endo, Shin Maeda, Masato Yoneda, Masataka Taguri, Atsushi Nakajima Validity of ACF using as a surrogate biomarker for colorectal cancer AACR Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research October 2011, Boston

26. Oshima H, and Oshima M: COX-2/PGE2 signaling and infectious stimulation in mouse gastric tumorigenesis. 9th International Gastric Cancer Congress (IGCC), 韓国・ソウル(2011年4月)

27. 大島 正伸: 炎症性微小環境と消化管発がん. 第1回「がん微小環境」公開ワークショップ、東京(2011年6月)

28. Oshima M: Mouse models of gastric cancer by Wnt activation and PGE2 induction. 4th Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium, シンガポール(2011年7月)

29. Oshima M: Inflammatory responses in gastric cancer development. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋(2011年10月)

30. Oshima M: TNF- α and inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. 23th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, 韓国・ソウル(2011年10月)

31. Oshima M: TNF- α and infectious stimulation in gastric tumorigenesis. 1st International Scientific Coordination Network (ISCN) <日仏がん研究ワークショップ>, フランス・モンペリエ (2011年11月)
32. Oshima M: Inflammatory-associated promotion of gastric tumorigenesis. 9th Japan-China Cancer Research Workshop, <日中がん研究ワークショップ>, 中国・上海 (2011年12月)
33. 大島 正伸: 炎症性微小環境の形成と消化管発がん. 第3次対がん10か年総合戦略・文科省がん支援活動合同公開シンポジウム, 東京 (2012年1月)
34. Oshima M: Inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. 2nd Internal Symposium on Carcinogenic Spiral, 京都 (2012年1月)
35. 青木正博、藤下晃章、武藤誠 JNK シグナル伝達経路はmTORC1の活性化を介してApc 変異マウスの腸管腫瘍形成を促進する 第15回日本がん分子標的治療学会学術集会 東京 (2011年6月)
36. 青木正博、藤下晃章、武藤誠 JNK promotes intestinal tumor formation in Apc mutant mice through activation of mTOR complex 1 and c-Jun. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋 (2011年10月)
37. 藤下晃章、青木正博、武藤誠 The roles of mTORC1 in the intestinal adenocarcinoma 第70回日本癌学会学術総会 名古屋 (2011年10月)
38. 園下将大、青木正博、武藤誠 Stimulation of colon cancer metastasis by Notch signaling 第70回日本癌学会学術総会 名古屋 (2011年10月)
39. 佐久間圭一朗、青木正博、神奈木玲児 EGF and bFGF induce EMT and E-selectin ligand glycan expression on colorectal cancer cells 第70回日本癌学会学術総会 名古屋 (2011年10月)
40. Aoki, M., Fujishita, T., and Taketo, M.M. JNK promotes intestinal tumor formation in Apc mutant mice through activation of mTOR complex 1 and c-Jun. AACR 's Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy Special Conference 米国フロリダ州オーランド (2011年11月)
41. 青木正博 Roles of the JNK/mTORC1 signaling in intestinal tumorigenesis of Apc mutant mice 第16回日韓がん研究ワークショップ 札幌 (2011年12月)
42. Kyoto Apc Delta ラットを用いた大腸癌化学療法試験法の確立 吉見 一人、田中 卓二、芹川 忠夫、庫本 高志 第58回日本実験動物学会、平成23年5月、東京
43. Establishment of chemotherapeutic in vivo test for colon cancer using Kyoto Apc Delta rat 吉見 一人、田中 卓二、庫本 高志 第70回日本癌学会、平成23年10月、名古屋
44. 大野みずき、中西恵美、續 輝久 マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析 日本分子生物学会第34回年会、横浜 (2011年12月)
45. Teruhisa Tsuzuki, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of Mutyh-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO₃, The 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (第2回遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム)、東京 (2011年11月)
46. 大野みずき、中西恵美、續 輝久、マウス腸管における放射線誘発酸化 DNA 損傷の解析 日本環境変異原学会第40回大会、東京 (2011年11月)
47. 大野みずき、中西恵美、續 輝久、マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析 日本放射線影響学会第54大会、神戸 (2011年11月)
48. 大野みずき、作見邦彦、古市正人、中西恵美、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、日本遺伝学会第83回大会、京都 (2011年9月)
49. Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Noritaka Matsumoto, Yoshimichi Nakatsu, Antitumorigenic effects of p53 and mismatch DNA repair system on oxidative stress-induced intestinal tumors in mice 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland (2011年8月)
50. Mizuki Ohno, Megumi Nakanish, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse tissues, 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland (2011年8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

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

ラット大腸がんモデルを用いた発がん初期過程の分子機構及び感受性要因の解明

分担研究者 筆宝義隆

独立行政法人国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨

2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) を用いた大腸化学発がん研究を従来ラットで行ってきたが、それを補完して大腸発がん機構の分子レベルでの解析をより迅速に推進かつ詳細に遂行するために、マウスを用いた *in vitro* 腸管発がん遺伝的再構成系を確立した。複数のがん抑制遺伝子に対する shRNA をレンチウイルスにより C57BL6/J マウス（野生型）正常腸管初代培養細胞に導入することで、短期間にヌードマウス皮下に腺がん類似の組織型を呈する腫瘍の作成に成功した。さらに、遺伝的要因だけでなく、炎症や化学物質などの環境要因も組み合わせることで発がんへの影響を検証することが可能であることを確認した。本実験系を用いることにより、遺伝子改変マウスを作成することなく *in vitro* で個々の遺伝子の発がん初期過程における役割や感受性への関与の検討が可能となり、今後の研究の大きな進展が期待される。

A. 研究目的

ヒト大腸発がんの分子機構、特にがんの初期発生段階における遺伝子変異や遺伝子発現の変化や、その発がん過程を修飾する種々の環境因子および遺伝的因子の解明を目指す。これまでは加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質 PhIP、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine により誘発されるラット大腸発がんモデルを主として用いて個体レベルでの動物実験を行ってきたが、細胞レベルでの解析が困難な点、解析に時間を要する点などの欠点を補完するために、昨年度新たにマウス腸管細胞の *in vitro* 発がん再構成系の構築も試み、p53 欠損細胞への shRNA 導入による腫瘍作成に成功した。本年度はさらに、C57BL6/J マウス由来の野生型腸管細胞からの発がんを目指して研究を展開した。本研究による動物モデルを用いた解析は、ヒト発がん研究のための検証系としての性格を有し、最終的にはヒトがんの早期診断や、遺伝子情報に基づいたテーラーメイドながん予防策の構築、さらには、がんに対する新規治療薬や予防薬開発のための標的候補分子の同定などへの臨床応用を目指す。

B. 研究方法

(1) 腸管細胞の *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成：生後 3～5 週程度のマウス小腸から EDTA 入り PBS を用いて腺管部分を選択的に採取し、単細胞レベルまで分散させた後に、マトリゲルを用いて三次元培養を開始する。幹細胞などの未分化な細胞がマトリゲル上に接着して増殖するため、約 1 週間後に、再び単細胞に分散させ、レンチウイルスベクターを用いて各種がん抑制遺伝子に対する

shRNA を導入し、再び 3～4 週間 3 次元培養を行った後にヌードマウス皮下に接種する。4～6 週間後に腫瘍を回収し、組織学的な評価を行った。

(2) LSL-KrasG12D マウス由来腸管細胞における変異型 Kras の活性化：Kras 遺伝子座に loxP-STOP-loxP カセットおよび変異型 Kras (Kras^{G12D}) をノックインしたアレルを有するマウスを (1) と同様に 3 次元培養し、Cre-recombinase をレンチウイルスベクターにより *in vitro* で導入することで、Kras^{G12D} の発現を誘導した。組み替えが起きたことはゲノム PCR で確認した。

(3) 腸管細胞と炎症細胞の共培養：スポンゼルを腹腔内に挿入し、異物惹起炎症を誘発し、5 日後にヘパリン入り PBS で細胞を回収し、活性化炎症細胞を単離した。腸管細胞と直接またはカルチャーインサートを介して間接に、すでに shRNA を導入してある腸管細胞と 6 時間共培養を行った。4 週間 3 次元培養を行った後にヌードマウス皮下に接種した。

(4) 3 次元培養下腸管細胞への PhIP 投与：PhIP は生体内では肝臓で活性化された後に変異原性を有するため、*in vitro* で腸管細胞へ投与する際にはラット肝臓抽出物である S9mix を添加し、PhIP10 μ M を 6 時間のみ細胞に暴露して 4 週間 3 次元培養を行った後にヌードマウス皮下に接種した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立がん研究センターの定める動物実験に関する規約を遵守し、実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いた。動物の苦痛に対する十分な配慮を払い、屠殺は麻酔と放血の併用で行った。ヒト試料を

用いた解析は、疫学研究の倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) 野生型腸管細胞からの *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成：大腸がん抑制遺伝子である APC に対する shRNA を導入した時のみ、3次元培養中の腸管細胞 organoid の形態が球形になり Wnt 経路の活性化が誘導されていることが示唆された。shAPC の導入のみでも皮下腫瘍が形成されることが多かったが、全例ではなかった。shp53 や shPTEN を単独で導入した場合や、ベクターコントロールのみの導入では腫瘍は誘導されなかった。shAPC に shp53 や shPTEN を組み合わせて導入した際には腫瘍形成率がほぼ全例となり、また腫瘍径も増大した。ただし、組織型に関しては有意な差は認めなかった。p53 欠損細胞由来皮下腫瘍同様、間質の増生が顕著で、不整形の腺管構造および粘液の貯留が認められた。Ki67 陽性細胞の比率は導入した shRNA に関係なく 50~60% であり、いずれも高い増殖性を示した。

(2) 変異型 Kras 発現腸管細胞からの *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成：Cre の導入による Kras の活性化と shAPC の導入を単独または組み合わせて行ったところ、皮下移植した際に変異型 Kras と shAPC は著明な協調作用を示し、2週間後 2cm 大となりヌードマウスが致死となるほど急速な腫瘍の増殖を観察した。腫瘍増大の原因は漿液の貯留による膨張もあるが、実質部分の増大も顕著であった。組織学的には細胞密度が高く、拡張した腺管は目立たなかった。この時点で同時に解剖したところ、shAPC と変異型 Kras は同程度の大きさの小腫瘍の状態であった。組織学的にはこれまで同様の腫瘍組織型を示したが、変異型 Kras は単純な円形の腺管を少数認めるのみで、しかも Ki67 はほとんど陰性の非増殖性細胞によって構成されていた。

(3) 炎症細胞との共培養による腫瘍形成：shAPC 導入後に炎症細胞との共培養を6時間行い、4週間後にヌードマウス皮下に接種したところ、共培養群では、直接法、間接法ともに非処理群の細胞と比較して腫瘍径の増大を見た。炎症細胞との共培養により活性化したシグナル経路を探索するためにマイクロアレイ解析を行ったところ、共培養群は非処理群とは全く異なる発現プロファイルを示す一方、共培養群の直接法、間接法はほぼ同一の発現プロファイルを示した。このことから、何らかの培養上清因子がこうした変化を誘導していることが強く示唆される。

また、共通の転写制御に関与する因子として STAT3 が実際に活性化していることを見出した。

(4) PhIP 投与による腫瘍形成：PhIP 暴露を6時間行った細胞は、3次元培養においてはこれまでの shAPC の導入で見られたような球形の organoid の誘導を示さなかった。また、皮下には小腫瘍を形成したが、組織型においても不整形の腺管構造を示さず、また上皮細胞の成分はごく少量であった。

D. 考察

本年度は、マウス野生型腸管細胞からでも *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成が可能であることを確認した。本実験形を用いて shAPC の導入のみにより腫瘍が形成されること、他の遺伝子単独では腫瘍が形成されないこと、shAPC に加えて他の shRNA の導入や変異型 Kras の誘導によりさらに進展していくこと、などを見出した。これらは遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* での報告と基本的に一致した結果であり、*in vitro* でも腸管発がんのイニシエーション、プロモーションの過程が再現されていることを強く示唆した。ここまで、ヒト大腸がんの変異の頻度が特に高いがん関連遺伝子で、遺伝子改変マウスによる個体レベルの研究結果が先行しているものについて、proof of concept の目的で検証を行ってきたが、今後は、さらに大腸がん関連遺伝子について、遺伝子改変マウスが未作成のものについても検討を広げていくことを予定している。

一方、shAPC によりイニシエーションが確立された細胞について、炎症を模倣した短時間の共培養を用いて腫瘍形成が促進されることを示した。すなわち、遺伝要因のみならず、環境要因によるプロモーションも *in vitro* で再現可能であることを示した。特に、炎症と関連し、多くのがんで活性化されている転写因子 STAT3 について実際に活性化を誘導できたことは興味深く、同系を用いた炎症と大腸発がんの関連の研究に道を開くものと考えられる。

PhIP は、大腸発がんのイニシエーション、プロモーションのそれぞれに関与している可能性が高いと想定されているが、その程度や分子機構に関する理解はいまだ不完全である。本実験型を用いることで shAPC よりは弱いもののイニシエーション作用が存在することが示唆された。現在プロモーション作用の有無を shAPC 導入細胞を用いて検討中である。なお、PhIP はマウスへ個体への投与では大腸

がんよりもリンパ腫が先に発症するため、DSS などにより炎症刺激を組み合わせることが必要であったが、本実験では *in vitro* で腸管細胞のみを対象にした解析であるため、純粋に PhIP の腸管上皮への影響を観察することが可能なのは大きな利点といえる。

E. 結論

マウス野生型腸管細胞から *in vitro* 遺伝的再構成による腫瘍形成が可能であることを確認し、*in vitro* でも腸管発がんのイニシエーション、プロモーションの過程が再現されることが強く示唆された。また、遺伝要因のみならず、化学物質や炎症など、環境要因の腸管発がんへの影響も本実験系で検証可能であることを見出した。発がんの初期過程の解析が大きく進展することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Sugiyama M, Sakai E, Hosono K, Nagashima Y, Inayama Y, Wada K, Hippo Y, Nakajima A. Role of the long form leptin receptor and of the STAT3 signaling pathway in colorectal cancer progression. *Int J Oncol.* 39(4): 935-40, 2011.

(連携研究者 中釜斉による発表)

2. Takasu S, Mutoh M, Takahashi M, Nakagama H. Lipoprotein lipase as a candidate target for cancer prevention/therapy. *Biochem Res Int.* 2012 in press

3. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res.* 71:4628-4639, 2011.

4. Izumiya M, Tsuchiya N, Okamoto K, Nakagama H. Systematic exploration of

cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer Science*, 102:1615-1621, 2011.

2. 学会発表

1. 筆宝義隆、小沼邦重、落合雅子、中釜 斉 腸管発がんの *in vitro* 再構成 第 26 回発癌病理研究会、札幌 (2011 年 8 月)

2. 筆宝義隆、中釜 斉 腸管発がんの *in vitro* 再構成 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011 年 10 月)

3. 小沼邦重、土橋祥子、落合雅子、中釜 斉、筆宝義隆 Dissecting potential roles of inflammation in carcinogenesis with *in vitro* reconstitution model 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011 年 10 月)

4. 小沼邦重、筆宝義隆、中釜 斉 *In vitro* reconstitution of inflammation-related colon carcinogenesis 第 16 回日韓がん研究ワークショップ、札幌 (2011 年 12 月)

5. 小沼邦重、筆宝義隆、土橋祥子、落合雅子、稲瀬安希、中釜 斉 *in vitro* 腸管がん再構成系における炎症の発がん促進作用 平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津 (2012 年 1 月)

6. 稲瀬安希、筆宝義隆、小沼邦重、土橋祥子、落合雅子、中釜 斉 *in vitro* 腸管がん再構成系を用いた MSH2 欠損関連大腸発がん経路の解析 平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津 (2012 年 1 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

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

ポリADP-リボシル化を標的とする早期からの制がん法

分担研究者 益谷 美都子

独立行政法人国立がん研究センター研究所 ゲノム安定性研究分野 分野長

研究要旨

PARP 阻害剤の効果には、DNA 修復阻害だけでなくゲノムワイドな DNA 脱メチル化誘導をはじめとするエピゲノム変化誘導も含まれることが示唆された。PARP 阻害剤によるエピゲノム変化誘導においては Parp-1 分子が主要な標的であることが示唆された。PARP 阻害剤の作用機序の解明と共に、エピゲノム制御の作用点からの早期がんに対する制がん効果の検討をさらに行う必要がある。また、PARP 阻害剤のガンマ線及び炭素線への増感効果は塩基除去修復経路の阻害による、亜致死性の非 DNA 二本鎖切断酸化的クラスター障害を致死的な損傷へ転換によることが示唆された。γ 線などの低 LET 放射線だけでなく炭素線など高 LET 放射線でも亜致死性の DNA 損傷を致死的な損傷へ転換することにより増感に有用である可能性が考えられる。

A. 研究目的

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) は DNA 修復応答に関与し、PARP (ポリ(ADP-リボース)合成酵素)阻害剤は BRCA 変異等を有するがんに対し、単剤での臨床試験において有効性が検討されている。PARP 阻害剤はアルキル化剤などの化学療法剤や放射線の効果増強剤としても基礎及び臨床研究が進んでいる。本研究では PARP 阻害剤及び機能阻害下における DNA 修復応答及びエピジェネティック制御から細胞死の誘発機構を明らかにし、ポリ ADP-リボシル化経路阻害による早期からの制がん法を確立する。PARP 阻害剤の抗がん作用に影響を与える因子とその機構を解明し、早期がんの治療及び遺伝性がんの高リスク群の予防的治療法の基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) PARP 阻害によるエピジェネティック制御の異常:マウス ES 細胞におけるゲノムワイドな CpG アイランドプロファイルの異常が起きていることが判明した。PARP 阻害剤 PJ-34 処理 2 日後の mESC においてゲノムワイドに CpG メチル化状態を解析すると、全ての染色体で CpG の脱メチル化が観察された。脱メチル化は約 4% のプローブで認められ、遺伝子のプロモーター領域及び gene body の領域が大部分を占めた。CpG メチル化亢進も同様に遺伝子のプロモーター領域及び gene body の領域が多かったが、脱メチル化亢進の頻度が約 2 倍上回っていた。PARP 阻害剤により脱メチル化あるいはメチル化亢進が認められた領域は Parp-1^{-/-} mESC での変化と共通の領域が多く認められ、

ンター研究所のガンマセル 220 を使い、炭素線照射は放射線医学総合研究所の HIMAC で行った。炭素線照射は線量分布の入り口部分とブラッグピークの代表的な LET 値として LET13 keV/μm と 70 keV/μm を用いた。細胞周期解析はフローサイトメトリーで行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については、国立がんセンターの「動物実験に関する指針」を遵守した。遺伝子組換え実験は、各研究機関の遺伝子組換え実験安全委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

1) PARP 阻害剤及び Parp1 機能阻害下によるエピジェネティック制御の異常:昨年年度での検討から Parp-1^{-/-} mESC においてゲノムワイドな CpG アイランドプロファイルの異常が起きていることが判明した。PARP 阻害剤 PJ-34 処理 2 日後の mESC においてゲノムワイドに CpG メチル化状態を解析すると、全ての染色体で CpG の脱メチル化が観察された。脱メチル化は約 4% のプローブで認められ、遺伝子のプロモーター領域及び gene body の領域が大部分を占めた。CpG メチル化亢進も同様に遺伝子のプロモーター領域及び gene body の領域が多かったが、脱メチル化亢進の頻度が約 2 倍上回っていた。PARP 阻害剤により脱メチル化あるいはメチル化亢進が認められた領域は Parp-1^{-/-} mESC での変化と共通の領域が多く認められ、

残りは異なる遺伝子領域であった。さらに網羅的な遺伝子発現解析の結果と比較すると、PARP 阻害剤処理後、脱メチル化亢進が認められた領域のうち、複数の遺伝子領域において CpG の脱メチル化と転写上昇が関連付けられた。*Parp-1*^{-/-} mESCs において脱メチル化が亢進した領域の一つは *H19/Igf2* imprinting control region (*H19/Igf2* ICR) である。昨年度この領域のエピゲノム変化の解析から、ヒストン H3K4 のメチル化及びヒストン H3 のアセチル化が亢進し、転写因子 CTCF の結合が増大によるクロマチン構造の活性化が生じ、*H19* の発現上昇を誘導することが示唆されていた。今年度、さらに解析したところ、この領域への DNA メチル化酵素 Dnmt1 の結合低下が観察され、*Parp-1*^{-/-} mESCs における *Dnmt1* の発現低下がその機構の一つとして推測された。

Non-coding RNA である *H19* 遺伝子はがん化において loss of imprinting、あるいは過剰発現を示すことが知られている。mESCs においては *Parp-1* 機能阻害下での *H19* 遺伝子発現誘導が胚細胞腫瘍形成時に trophoblast 誘導に関わる可能性が考えられたため、mESCs において *H19* 遺伝子を導入し、強制発現を行った。ベクターとしては EF-1 プロモーターに *H19* 遺伝子を連結したものをを用い、野生型 J1 株に導入し、安定導入株を単離した。この一過性発現下と安定導入株における *H19* 発現誘導は trophoblast 系譜への分化に極めて重要な転写因子 *Cdx2* の発現を上昇させることが判明した。また、trophoblast 系譜の後期のマーカーである *proliferin* の発現は *H19* の発現下で PARP 阻害剤処理により約 2 倍に増強された。このことから、*Parp-1*^{-/-} mESCs における CpG 脱メチル化が *H19* 発現上昇と *Cdx2* の発現誘導を介して mESCs の分化運命変更へ寄与することが示され、PARP 阻害剤は trophoblast 分化を増強することが示唆された。マウス ES 細胞をヌードマウス子宮内に移植し作成した胚細胞腫瘍についての組織病理学的解析を行ったところ、*Parp-1*^{-/-} mESCs 由来の腫瘍では trophoblast 系譜の出現が認められ、肺や肝臓への転移頻度の増加を認めた。また *Parp-1* の機能阻害や PARP 阻害剤はマウスにおいて胚など、種々の組織でエピゲノム異常を起こすことを見いだした。

2) PARP 阻害剤による制がん作用及び放射線との併用効果の検討: 膀胱癌細胞株である MIA PaCa2 を用いて、臨床試験に使用されている PARP 阻害剤 AZD2281 処理下で認められる γ 線、炭素線 LET13、70 に

対する増感効果について生存率への影響の解析と増感の機構を昨年に続いて解析した。フローサイトメトリーで解析したところ、 γ 線、照射後と同様に S 期アレストと、その後、G2/M アレストへの移行増加を認めた。また、PARP 阻害剤の有無に関わらず、アポトーシスの細胞集団を示す subG1 の増加がなかったことから、mitotic catastrophe、又は壊死が PARP 阻害剤による主な細胞死の経路と考えられた。shRNA ライブラリーを用いて PARP 阻害剤の効果規定因子の検索系を作成した。

D. 考察

mESCs を用いたこれらの結果により、*Parp* 阻害剤の効果には、DNA 修復阻害だけでなくゲノムワイドな DNA 脱メチル化誘導をはじめとするエピゲノム変化誘導も含まれることが示唆された。*Parp-1* 機能阻害と *Parp* 阻害により多くの共通のエピゲノム変化が認められることから *Parp-1* 分子が主要な標的であるが、他の *Parp* ファミリー分子も標的である可能性が示唆された。*Parp-1*^{-/-} mESCs では *H19/Igf2* imprinting control region の脱メチル化が重要な転写因子 *Cdx2* の発現を上昇させ、胚細胞腫瘍形成時に認められる胎盤系譜への分化が誘導されることがモデル実験系で示された。

γ 線、炭素線に対する PARP 阻害剤の増感効果の作用機序は共に、細胞周期 S 期停止と引き続き起こる G2/M 期停止を導く DNA 損傷修復応答の遅延と DNA 二本鎖切断のプロセッシングの遅滞であることが示唆された。この効果は炭素線においては、p53 のリン酸化とは独立して起こっていることが示唆された。これらの DNA 損傷修復応答の遅延は崩壊した複製フォークによって生じる持続的な DNA 二本鎖切断と PARP 阻害剤の二本鎖切断修復経路への影響であると推測された。高 LET の重粒子線による DNA 障害は光子線と比較しより複雑であり、複雑なクラスター DNA 障害は DNA 二本鎖切断と非 DNA 二本鎖切断酸化的クラスター障害 (non-DSB oxidative clustered DNA lesions (OCDL)) の 2 つに大別される。クラスター障害の産生は LET 依存的に増加する。OCDL は酸化塩基、AP 部位 (apurinic-apyrimidinic sites) と DNA 一本鎖切断が含まれ、これらの DNA 障害は PARP が重要な役割を演じる BER で主に修復される。従って、PARP 阻害剤のガンマ線及び炭素線への増感効果は BER 経路の阻害によって、亜致死の OCDL を致死的な損傷へ転換することによると示唆された。