

E. 結論

PARP 阻害剤はマウス ES 細胞分化系で特定の遺伝子群の DNA 脱メチル化を誘導し、エピゲノム制御に関与することが判った。また、PARP 阻害剤はがん治療の放射線増感剤として γ 線など低 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 OCDL 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. Osada T, Masutani, M. PolyADP-ribosylation in postfertilization and genome reprogramming: implications for carcinogenesis. In: A. S. Gomes Ed. Polymerization / Book 1, Rijeka, Croatia: In Tech, in press.

2. 学会発表

1. 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)

2. 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)

3. 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) (70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, PROGRAM; P. 305, P-2050, 2011 年)

4. 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)

5. 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) (日本放射線腫瘍学会第 24 回学術大会抄録集, P. 234, 2011 年 11 月)

6. 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)

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

ラット ES 細胞の樹立およびノックアウトラットの作成

分担研究者 竹下文隆

独立行政法人国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 主任研究員

研究要旨

環境中の発がん要因に対する標的遺伝子の機能の解析に利用可能な新規の遺伝子改変発がんモデルラットの作製を行うため、これまで極めて困難とされてきたラット ES 細胞の樹立を行った。ES 細胞の安定的培養法の確立によりジーンターゲットングによる相同組み換え、更にはキメララットを介して p53 ノックアウトラットの作製に成功した。本研究成果により今後トランスジェニックやノックアウトラットを ES 細胞から安定的に供給でき、ラット個体における発がん分子メカニズムの解明に向けた研究の飛躍が期待される。

A. 研究目的

ラットはある種の生理機能や薬物代謝機能がマウスよりヒトに類似しており、化学発がんモデルとしての学問的蓄積も極めて大きい。しかしラット胚性幹

(Embryonic Stem, ES) 細胞が樹立できないことから、ノックアウト (KO) ラット作製は極めて困難とされてきた。本研究では4つの低分子化合物による独自の培養方法により ES 細胞の樹立に成功しており、KO ラットの作製および環境中の発がん要因に対する標的遺伝子の機能の解析に利用可能な新規の発がんモデルラットの作製を目標とする。

B. 研究方法

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 細胞においてジーンターゲットング法により p53 遺伝子を破壊したアレルを持つ組み換えクローン (p53^{-/-}) を取得し、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。

C. 研究結果

本来のジーンターゲットング法は相同組み換え効率が悪く、100 個以上のコロニーをクローニングしなければならないが、今回 Zinc-finger nuclease を用いることで、効率を劇的に向上させ、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。ヌ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、掛け合わせによりジャームライントランスミッションを介して 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ヶ月以内にがんを発症し、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。

D. 考察

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つの低分子化合物と20%の血清が含まれた培地 (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。

E. 結論

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 KO 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も、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiwara, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takahashi, R., Takeshita, F. and Ochiya, T.: Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity. *Sci. Rep.*, 2:314(2012).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Minoura, K., Takahashi, R., 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).

- 6) 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)
 - 7) 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)
- ### 2. 学会発表
- 1) 藤原智洋、小坂展慶、吉岡祐亮、高橋陵宇、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広 肉種のがん幹細胞様性質を制御する microRNA の同定 第3回日本 RNAi 研究会、広島市 (2010年8月)
 - 2) 尾崎充彦、杉本結衣、竹下文隆、小坂展慶、押村光雄、落谷孝広 ヒト骨肉種肺転移抑制に関わる miR-143 の標的遺伝子群の同定とヒト骨肉種組織標本における発現解析 第3回日本 RNAi 研究会、広島市 (2010年8月)
 - 3) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、園家暁、落谷孝広 microRNA を用いた膀胱がんに対する新規核酸医薬の開発 第3回日本 RNAi 研究会、広島市 (2010年8月)
 - 4) 萩原啓太郎、小坂展慶、高橋陵宇、竹下文隆、落谷孝広 天然抗がん物質はがん抑制的 microRNA の発現亢進を介してがんの悪性化を抑える 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
 - 5) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、園家暁、落谷孝広 膀胱がんの悪性化に関与する microRNA の同定と機能解析 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
 - 6) 田原栄俊、福永早央里、竹下文隆、玉置彩、日野由美子、工藤保誠、高橋陵宇、嶋本顕、落谷孝広 マイクロ RNA は、癌細胞の老化プログラムを制御する 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
 - 7) 小坂展慶、吉岡祐亮、萩原啓太郎、竹下文隆、落谷孝広 がん悪性化における分泌型マイクロ RNA の意義 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
 - 8) 高橋陵宇、竹下文隆、本間紀美、内野慧太、小野麻紀子、尾野雅哉、加藤菊

- 也、落谷孝広 薬剤耐性制御因子を標的とした新規がん幹細胞治療法の開発 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
- 9) 小野麻紀子、津田均、竹下文隆、高橋陵宇、田村研治、明石-田中定子、木下貴之、藤原康弘、落谷孝広 乳癌におけるRPN2の発現の検討 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
- 10) 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、吉岡祐亮、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広 骨肉種のがん幹細胞様性質を司る分子機構の探索 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
- 11) 尾崎充彦、杉本結衣、知念日菓利、竹下文隆、落谷孝広、井上久雄、押村光雄 ヒト骨肉種肺転移抑制効果を示すmiR-143の標的遺伝子の同定 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月)
- 12) 川又理樹、落谷孝広 Oct4-Venusトランスジェニック由来胚性幹細胞からのp53遺伝子欠損ラットの作製 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市 (2011年10月) (連携研究者の川又、落谷らによる発表)
- 13) Takahashi, RU., Takeshita, F., Ono, M., Uchino, K. and Ochiya, T. Ribophorin2 stabilizes mutant p53 by suppressing Glycogen Synthase Kinase 3beta in breast cancer onset and metastasis 第34回日本分子生物学会年会、横浜市 (2011年12月)
- 14) Fukunaga, S., Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Kudo, Y., Tamaki, A., Ishihara, E., Matsunaga, J., Takahashi, RU., Takata, T., Shimamoto, A., Ochiya, T. and Tahara,

- H. The potential of senescence-associated miRNAs as tumor suppressor 第34回日本分子生物学会年会、横浜市 (2011年12月)
- 15) Sugimoto, Y., Osaki, M., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Oshimura, M. and Ochiya, T. Identification of lung metastasis inhibitory miR-143 target genes in human osteosarcoma cells 第34回日本分子生物学会年会、横浜市 (2011年12月)
- 16) Kawamata, M. and Ochiya, T. Generation of knockin/knockout rats from embryonic stem cells p53 deficiency leads to developmental anomaly Rat Genomics & Models, Cold spring harbor meeting, NY (2011年12月) (連携研究者の川又、落谷らによる発表)

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

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

分担研究者 木南 凌
新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨

発がん母体細胞はがん細胞の性質の一部を規定するため、がん細胞の特性、がん治療を考える上で重要である。*Bcl11b*^{KO/+}ヘテロマウスで観察される放射線感受性胸腺リンパ腫（白血病モデル）、腸管腫瘍（大腸がんモデル）を対象に発がん母体細胞、放射線の標的細胞の同定を試みた。DN2分化段階以降で*Bcl11b*^{KO/+}の遺伝子型となるfloxマウスでは、前リンパ腫は検出されたが、DP分化段階以降の細胞で特異的に*Bcl11b*^{KO/+}となるマウスでは検出されなかった。すなわち、DN4, ISP, DP-TCRb^{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。これらの細胞の放射線照射後の細胞周期停止を調べた。*Bcl11b*^{KO/+}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唆された。停止が減弱すると、生じたDNA損傷が蓄積する頻度が増すため、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BCL11Bの機能を解析した。BCL11Bはp53とHDM2はフィードバック調節機構に関与し、このDNA損傷応答への寄与が発がん機構の一つであることが示唆された。

A. 研究目的

発がんの母体となる細胞は、そこから生じたがん細胞の性質の一部を規定する。従って、発がん母体細胞を明らかにすることは、発がんの機構、がん細胞の特性、がん治療を考える上で重要である。一般に、発がん母体細胞に備わった一つの性質に幹細胞としての性質が挙げられ、組織幹細胞が発がん母体細胞となり、何らかの変異を蓄積させた結果、がん細胞へと形質転換すると考えられている。一方、分化した細胞も発がん母体細胞となる可能性が残っている。このケースでは、がん化した細胞、あるいは発がん過程にある細胞が幹細胞の性質を獲得すると考えられる。本研究では、*Bcl11b*^{KO/+}マウスでみられる放射線感受性胸腺リンパ腫、放射線により感受性が亢進する腸管腫瘍を対象にする。*Bcl11b*は我々が単離した遺伝子であり、色々な細胞種で発現するが、胸腺細胞や腸管の細胞はその中に含まれる。具体的な目標は、リンパ腫および腸管腫瘍を形成する発がん母細胞、放射線の標的細胞を同定することにある。この母細胞・標的細胞の同定は、放射線傷害の蓄積性に関して新しい知見と、放射線暴露健康リスクへのより適切な評価を与える。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

マウスを使用した実験については、本学

の動物実験倫理委員会で承認を得ており、指針に基づく動物実験方法を遵守している。

B-1 マウスと放射線照射

Bcl11b^{KO/+}マウスの作製と維持は、以前報告した通りである。本研究で使用したマウスは、新潟大学内の SPF 下の飼育施設で飼育している。

B-2 フローサイトメトリー

1-2×10⁶個のマウス胸腺細胞を2%FCS, 0.2%NaN₃を加えたリン酸緩衝液内で4℃、20分間抗体と反応させた。用いたモノクローナル抗体は、抗CD4-PerCP-Cy5.5もしくは抗CD4-APC、抗CD8-PE、抗TCRβ-FITC (eBioscience社)を用いた。非特異的抗原抗体反応を防ぐために、一次抗体反応前に抗CD16/32抗体を添加した。抗体染色した細胞はFACSscan(Becton-Dickinson社)を用いてFACS分析を行い、データの解析はFlowJo Software(Tree-Star社)を用いた。死細胞や壊死組織片は解析時に、forward scatter (FSC)、side scatter (SSC)を用いて除外した。

アポトーシスはAnnexin V (BD Bioscience社)で測定した。胸腺細胞をリン酸緩衝液内で室温、15分間抗体と反応させた。用いたモノクローナル抗体は、抗AnnexinV-FITC (BD Bioscience社)とPIを用いた。アポトーシスはFITC⁺/PI⁻細胞とした。

BrdUの取り込み実験では、100μgの

BrdU (10mg/ml) をマウスの腹腔内へ投与し 1 時間後に γ 線照射をした。胸腺を BrdU 投与 1 時間後あるいは 5 時間後に分け、cytofix/cytoperm (BD Bioscience 社) で固定し、BrdU Flow Kit (BD Bioscience 社) で解析した。1-2 \times 10⁶ 個のマウス胸腺細胞を、固定、浸透化し、37°C で 60 分間 DNaseI (300 μ g/ml) と反応させた。洗浄後、室温で 20 分間抗 FITC-BrdU 抗体と反応させた。染色した細胞は FACSCalibur (Becton-Dickinson 社) を用いて FACS 分析を行った。

B-3 転写活性の測定

BCL11B (ヒト Bcl11b) による HDM2 (ヒト MDM2) の転写および翻訳への影響は、RT-PCR 法とウエスタンブロット法で解析した。BCL11B の HDM2 プロモーターへの結合とその領域は、クロマチン免疫沈降法により調べた。BCL11B の HDM2 の転写活性への影響は、HDM2 の P1 および p53 応答配列をもつ P2 プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを作製し、HCT116 細胞 (p53⁺ または p53⁻) を用いてデュアルルシフェラーゼアッセイ法で測定した。BCL11B による転写活性調節に必要な領域は、HDM2-P2 プロモーター領域の欠失変異体レポーターベクターを作製し解析した。

C. 研究結果

C-1 非照射時での *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型が与える胸腺細胞の細胞分化、細胞増殖への影響については昨年度報告した。細胞分化については、2 種類の ISP と DP-TCRb^{low} の分化段階で、胸腺細胞の分化進行の障害が観察された。しかし、ISP 細胞、DP 細胞の両者とも、細胞増殖能については、*Bcl11b*^{KO/+} 胸腺と *Bcl11b*^{+/+} 胸腺の間で大きな差はみられなかった。一方、発がん母体細胞となる DN4, ISP, DP-TCRb^{low} の細胞への *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型の放射線応答性については不明である。そこで、細胞数および細胞分裂周期への影響について検討した。

C-1-1 細胞数への影響

各胸腺分化細胞について *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型がもたらす細胞増殖影響に関しては、照射との関連で検討する必要がある。そこで、1Gy の γ 線をマウスに照射し、4 時間後に細胞分化、細胞数への影響を検討した。細胞周期測定のため、 γ 線照射の 1 時間前に BrdU をマウスに投与した。胸腺細胞を CD4, CD8, TCRb 細胞表面マーカーおよび BrdU 抗体で染色し、フローサイトメーターで分画した。ISP 細胞を含め、各分化段階の細胞で分化への大きな影響はみられなかった。また、ISP 細胞と DP 細

胞のどちらの細胞分画でも大きな細胞数の減少はみられなかった。

C-1-2 細胞分裂周期への影響

次に、細胞周期への影響を調べた。コントロールとして、非照射のマウスで BrdU 投与 1 時間後、5 時間後の胸腺細胞を解析した。この解析では、BrdU 取り込み有り (+) と無し (-) にまず 2 分割し、さらに FSC 値が大 (L) と小 (S) の細胞群に分画した。したがって、4 分画に分けられた。BrdU⁺FSC^L は BrdU 投与後 S 期に入った大型細胞、すなわち S/G2/M 期に存在する細胞であり、BrdU⁺FSC^S は BrdU 投与後 S 期に入った細胞が小型の G1 期の細胞まで細胞周期が進行したものを表す。BrdU⁺FSC^L および BrdU⁺FSC^S は BrdU を取り込まなかった細胞で、今回の解析対象とはしなかった。

BrdU 投与 1 時間後の DN, ISP, DP 細胞では、ほとんどの BrdU 取り込み (BrdU⁺) 細胞は大きく、細胞周期の S/G2/M 期にあることが示された。一方、BrdU 投与 5 時間後では、DN, ISP, DP 細胞すべてで BrdU⁺FSC^L 分画の細胞数は低下し、BrdU⁺FSC^S が増加する。この結果は、BrdU 投与後 5 時間の間に多くの BrdU⁺ 細胞が S 期から G1 期に進行したことを示す。

γ 線照射は異なった分化段階の細胞により異なった影響を与えた。BrdU 投与後 5 時間、 γ 線照射後 4 時間の DP 細胞では、非照射時にみられた BrdU⁺FSC^S 細胞の増加がみられなかった。BrdU 取り込み (BrdU⁺) 細胞は大きく、BrdU⁺FSC^L 分画にあった。これは照射による S/G2/M 期での細胞周期進行の停止を示唆する。この停止に、*Bcl11b*^{KO/+} 胸腺と *Bcl11b*^{+/+} 胸腺の間で大きな差はみられなかった。一方、ISP 細胞では、BrdU⁺FSC^L 分画の細胞数は低下し、BrdU⁺FSC^S の増加がみられた。これは照射による細胞周期進行の停止が減弱していることを示唆する。興味深いことには、この細胞周期進行停止の減弱が、*Bcl11b*^{+/+} 胸腺より *Bcl11b*^{KO/+} 胸腺の方でより弱かった。このことは、*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型が放射線照射誘発の細胞周期進行停止を減弱させる作用のあることを示唆する。一方、DN 細胞は ISP 細胞と同様に、BrdU⁺FSC^S 細胞の増加を示し、照射による細胞周期進行の停止が弱いことを示唆する。しかし、この停止減弱作用に、*Bcl11b*^{KO/+} 胸腺と *Bcl11b*^{+/+} 胸腺の間で大きな差はみられなかった。

C-2 *Bcl11b* の腸管クリプト細胞への影響 *Bcl11b*^{KO/+} マウスを用い、腸管への放射線影響を *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型が修飾することについては昨年報告した。しかし、この影響が腸管細胞特異的かどうかについては不明である。そこで、先ず

Bcl11b^{fllox/fllox};Lgr5-Cre マウスを作製し、*Lgr5* 発現細胞でのみ *Bcl11b^{KO/KO}* 遺伝子型とし、このマウスを用いて非照射時での影響を調べた。すなわち、CBC 細胞 (*Lgr5* を発現)、TA 細胞の増殖についての影響を検討した。8 週齢のマウス小腸では *Bcl11b* 発現を消失したクリプトは約 1/5 に観察されたが、隣り合わせの組織標本で BrdU 取り込み、Ki67 染色を行った。しかし、発現クリプトと非発現クリプトの間では変化は観察されなかった。また、組織構築にも異常はみられなかった。これらの結果は、*Bcl11b* が無くても *Lgr5* 発現細胞は影響を受けないことを示唆する。ただ、これは *Bcl11b^{KO/KO}* 遺伝子型の影響であり、発がんに貢献する *Bcl11b^{KO/+}* 遺伝子型ではない。

そこで、*Bcl11b^{fllox/+};Lgr5-Cre* マウスを作製した。これは、*Bcl11b^{KO/+}* マウスで照射後異常増殖する細胞 (照射後停止がみられない) と *Lgr5* 発現細胞との関連性を明らかにする目的で作製された。このマウスを用い、照射後のクリプト内での *Lgr5* 発現細胞数の変化を Ki67 染色で調べた。*Bcl11b* 染色が減弱したクリプト細胞では、Ki67 染色のシグナル増大が観察された。すなわち、*Lgr5* 発現細胞が *Bcl11b^{KO/+}* 遺伝子型となることで、腸管への放射線影響が観察されたことを示唆する。しかし、これを結論付けるためには更なる検討が必要である。

C-3 BCL11B 転写抑制因子の標的遺伝子：HDM2 (MDM2)

Bcl11b^{KO/+} ヘテロ遺伝子型は照射後胸腺リンパ腫発症に寄与する。しかし、その機構は不明である。*Bcl11b^{KO/+}* ヘテロマウスは非照射では発症しないが、このマウスに *p53KO^{KO/+}* 遺伝子型を導入した *Bcl11b^{KO/+};p53KO^{KO/+}* 二重ヘテロマウスは、高頻度に胸腺リンパ腫を発症する。このことは、*Bcl11b* は *p53* と協調して細胞のがん化に作用することを示唆する。そこで、BCL11B が *p53*-HDM2 フィードバックループに直接影響を与えるかどうかについて、培養細胞を用いて検討した。

BCL11B に対する shRNA を発現するウイルスベクターを、BCL11B を発現している MOLT-4 細胞に導入した。抑制効率を調べると約 20% までに低下する抑制効果がみられた。このとき、転写調節を受ける HDM2-P2 プロモーターからの転写産物量は増加し、HDM2 タンパク質量も増加した。これに対して、恒常的発現を担う P1 プロモーターからの転写には BCL11B の影響はみられなかった。これは、BCL11B の転写抑制能を示唆する。この抑制が直接作用かどうかを調べるため、MOLT-4 と Jurkat

細胞を用い、抗 BCL11B 抗体でクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、HDM2-P2 プロモーター領域が濃縮され、この領域に BCL11B が結合することが分った。

p53 を発現する HCT116 細胞 (BCL11B は非発現) に BCL11B を強制発現させると、HDM2-P2 プロモーター活性は対照の 20% にまで抑制した。一方、*p53* を欠損する HCT116 細胞ではその抑制効果が約 58% と減弱した。一方、HDM2-P1 プロモーター活性には影響しなかった。このことから、BCL11B の HDM2 転写抑制は、*p53* に依存することが示唆された。次に、HDM2-P2 プロモーターの欠失変異体に対する BCL11B の影響を調べた。2 か所に *p53* 結合配列 (BE) があり、両者の欠失で BCL11B による HDM2 プロモーター活性の抑制が認められなくなった。また、転写開始点より遠位の *p53*BE だけの欠失では、BCL11B によるプロモーター活性の抑制が 50% 程度に低下した。

p53 は γ 線照射によって活性化されるが、この条件下での HDM2 発現に対する BCL11B の影響を調べた。まず、*p53* 活性をもつ HCT116 細胞に遺伝子導入後、 γ 線 10Gy を照射し、20 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、P2 プロモーター活性の増加が認められたが、HDM2-P1 では変化がなかった。次に、 γ 線照射による DNA 損傷条件下で BCL11B の抑制効果を調べた。非照射 (20% の抑制活性) の場合と比べて P2 プロモーター活性抑制の減弱 (38% の活性) がみられた。このことは HDM2 プロモーター活性化において BCL11B が *p53* との協同性を示すことが示唆された。

D. 考察

D-1 ヒト T 細胞性急性白血病で検出される BCL11B 変異とその発がんへの寄与
Bcl11b は、Zinc-finger ドメインをもつ転写因子をコードし、T 細胞や腸管のクリプト細胞などで発現している。注目すべきことは、ヒト T 細胞性急性白血病 (T-ALL) の約 16% に BCL11B 変異が最近報告され、ヒトでもがん抑制遺伝子として働いていることがわかった。また、T-ALL でも BCL11B はハプロ不全ながん抑制遺伝子として働く。

T-ALL の遺伝子変異は発症に寄与する機構によって、2 種類に大別されている。タイプ A 変異は、遺伝子異常が T 細胞の分化停止を引き起こす役割を担うものであり、特定の T-ALL サブタイプに特異性がある。タイプ B 変異は細胞周期の異常などの表現型を与えるもので、T-ALL サブタイプに広く検出される。タイプ A 変異

がもたらす分化停止機能と共役して発がんに貢献するとされている。本研究から、*Bcl11b* の減弱が DN4, ISP, DP-TCRb^{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、また *Bcl11b*^{KO/+} 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。これらの結果は、*BCL11b* 変異がタイプ B の遺伝子変異グループに属することを示唆する。D-2 前リンパ腫細胞の発生母体となる細胞種の同定

Bcl11b^{KO/+}ヘテロマウスは照射後胸腺リンパ腫発症するが、非照射では発症しない。また、*Bcl11b*^{KO/+}マウスは胸腺細胞分化に影響するが、その影響度は大きくはない。これらの結果は、*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型単独では胸腺細胞の表現型や発がん性に大きな影響を与えず、発がんは放射線照射に依存することを示し、このモデルが放射線発がん機構を研究するよいモデルであることを示す。*Lck-Cre;Bcl11b*^{flox/+}マウスではγ線照射によりリンパ腫の発症や前リンパ腫細胞の出現が観察されたが、*CD4-Cre;Bcl11b*^{flox/+}マウスでは、前リンパ腫細胞の出現はみられなかった。前者は DN2 分化段階以降で *Bcl11b*^{KO/+} の遺伝子型、すなわち片アレルの消失となるが、後者は DP 分化段階以降の細胞で特異的に *Bcl11b*^{KO/+} となる。これらの結果を総合すると、DN4, ISP, DP-TCRb^{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る。これらの細胞種は増殖期にある細胞で、この性質が発がん母体となる一つの特色と考えられる。

D-3 *Bcl11b*^{KO/+}-ISP 細胞にみられる照射影響の修飾

非照射のマウスでは細胞増殖、細胞周期について、*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型の影響はみられなかった。しかし、電離放射線を 1Gy 照射したときには、ISP 細胞は細胞周期 S 期で周期停止の減弱が観察された。照射は DNA 損傷を引き起こし、損傷シグナルにより細胞の周期が停止をもたらす。実際、DP 細胞では S 期にあった細胞は S/G2/M 期に留まり、G1 期に進行しないことが示された。しかし、ISP 細胞は DP 細胞ほど進行の停止が強くなく、一部の細胞は S 期から G2/M 期を通過し G1 期に進行する。すなわち、照射による細胞周期進行の停止が弱い。重要な点はこの停止を、*Bcl11b*^{KO/+} 胸腺ではより多くの細胞が G1 期に進行したことである。すなわち、*Bcl11b*^{KO/+} 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唆された。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

れる。

D-4 *Lgr5* 発現細胞特異的 *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型の導入とその影響

Bcl11b^{flox/flox}; *Lgr5-Cre* マウスおよび *Bcl11b*^{flox/+}; *Lgr5-Cre* マウスを作製し、腸管クリプト細胞の増殖への影響を検討している。*Bcl11b*^{flox/flox}; *Lgr5-Cre* マウスの非照射時では大きな影響は観察されなかったが、照射後の *Bcl11b*^{flox/+}; *Lgr5-Cre* マウスでは、増殖シグナルの増大が観察された。すなわち、*Lgr5* 発現細胞が *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型となることで、腸管への放射線影響が観察されたことが示唆された。しかし、これらは予備的な結果であり、結論付けるためには更なる検討が必要である。

D-5 p53 と HDM2 はフィードバックループ調節

Bcl11b^{KO/+}ヘテロ遺伝子型は照射後胸腺リンパ腫発症に寄与する。その機構解明のために、培養細胞を用いて解析した。*Bcl11b* の転写標的遺伝子としては、p21, p57, p27 といった細胞周期進行に関わる調節因子が知られている。今回の結果では、p53 と HDM2 はフィードバックループ調節機構に *BCL11B* が関与することがわかった。すなわち、*BCL11B* は p53 依存性に HDM2 の転写活性を負に制御することが明らかになった。p53 を活性化する放射線による DNA 損傷条件下では、*BCL11B* による HDM2 転写の抑制が基底状態（非照射）での抑制活性と比べて減少する。このことは、HDM2 プロモーター活性に対して活性化 p53 と *BCL11B* が競合的に作用することを示唆する。

Bcl11b^{KO/+}; *p53*^{KO/+} 二重ヘテロマウスは、胸腺リンパ腫を高頻度に自然発症する。このことは、*Bcl11b* は p53 と協調して細胞のがん化に作用すること、また放射線照射の代用に *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型がなることを示唆し、興味深い。以上の知見は、T-ALL (他のがんも含め) 発症への *BCL11B* 変異の関与の機構についての理解を深める一助となるとともに、新たな治療法への手がかりを与えるものと考えられる。

E. 結論

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。*Lck-Cre;Bcl11b*^{flox/+}マウスは DN2 分化段階以降で *Bcl11b*^{KO/+} の遺伝子型となるが、この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 *Bcl11b*^{KO/+} となるマウスでは検出されなかった。すなわち、DN4, ISP, DP-TCRb^{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。発がん母体と

なる細胞の特性を、放射線照射後の細胞周期停止との関連で検討した。*Bcl11b*^{KO/+} 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とフィードバックループ調節に従うが、この調節にBCL11Bが直接関与することがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. 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).
 2. Kominami, R. Role of the transcription factor *Bcl11b* in development and lymphomagenesis. *Proc Jpn Acad Ser B.* 88:72-87 (2012).
 3. Obata, M., Kominami, R., and Mishima, Y. BCL11B tumor suppressor inhibits HDM2 expression in a p53-dependent manner. *Cell Signal.* 24:1047-1052 (2012).
 4. 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).

2. 学会発表

木南凌、坂牧僚、葛城美徳、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、名古屋市 (2011年9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
特記すべきことなし。

メトホルミンによる大腸発がん予防の検討

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。現在はポリープ切除しクリーンコロンとなった患者を対象にしてメトホルミンとプラセボを用いた前向き無作為化試験実施中である。

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、細胞増殖を抑制すると考えられている。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。現在は、大腸ポリープの12カ月後の再発をエンドポイントとした前向き無作為臨床試験を実施中である。

（倫理面への配慮）

ヒトを対象とした研究は、定期的なモニタリングを行うことにより薬剤の副作用を未然に防ぐように配慮している。また医師主導臨床試験に対する賠償責任保険に加入しており、万が一の場合には十分に補償する体制を整えている。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。またメトホルミンを投与することにより APC^{Min/+}マウスおよび AOM 誘発化学発がんマウスそれぞれにおいてポリープの増大が抑制されていた。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。

今後は、大腸ポリープや大腸癌をエンドポイントとした前向き臨床試験が必要である。

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り、現在そのための臨床試験を実施

中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
 2. 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.
 3. Sakai E, Morioka T, Yamada E, Ohkubo H, Higurashi T, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Takamatsu R, Cui C, Shiozawa M, Akaike M, Samura H, Nishimaki T, Nakajima A, Yoshimi N. Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2011 Oct 20.
 4. 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 臨床と研究・88 巻 7 号 p.43(829)-46(832) 出版社 大道学館 2011年7月20日発行
 5. 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8月28日発行
 6. 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
8. 学会発表
1. 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

10日 東京

2. 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.
3. 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.
4. 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13日 東京
5. 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）一般演題（3）平成23年5月13日 東京
6. 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 English Oral Sessions 平成23年10月3日 名古屋
7. 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 Japanese Oral Sessions 平成23年10月4日 名古屋
8. 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 ポスター 平成23年10月5日 名古屋
9. 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21日 福岡

10. 内山崇、高橋宏和、酒井英嗣、細野邦広、遠藤宏樹、中島淳 散发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 ポスターセッション 大腸-腫瘍2 平成23年10月20日 福岡
11. 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 ポスターセッション 大腸-腫瘍3 平成23年10月20日 福岡
12. 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 Poster Session October 23, 2011 , Boston

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

消化器がん発生に關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

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) シグナル依存的に胃炎を發生する *K19-C2mE* マウスおよび PGE₂ 経路と Wnt シグナルの相互作用により炎症をともなう胃がんを發生する *Gan* マウスを用いて網羅的 microRNA (miRNA) 発現解析を行ない、炎症反応依存的に発現誘導および抑制される miRNA を同定した。その中で、炎症反応依存的に発現低下する miR-7 に着目して解析を行なった。miR-7 は未分化な正常胃粘膜上皮では発現レベルが低く、細胞分化にともなって発現量が上昇する。また、多くの胃がん組織では炎症性サイトカインの発現量と逆相関して miR-7 発現が抑制されており、さらに胃がん細胞への miR-7 導入により細胞増殖率と軟寒天中コロニー形成率が低下した。また、レポーター遺伝子を用いた解析により、活性化マクロファージ由来低分子が胃がん細胞における miR-7 発現を低下させることが明らかとなった。したがって、miR-7 は炎症反応依存的に腫瘍細胞での発現が抑制される「がん抑制性 miRNA」であると考えられた。さらに本研究により、新規 miR-7 標的遺伝子を同定した。これらの遺伝子産物による発がんへの影響について今後の研究により明らかにする。

A. 研究目的

慢性炎症反応が発がん促進に重要な役割を果たすと考えられている。その中でもプロスタグランジン E₂ (PGE₂) シグナルに依存した宿主反応が、炎症と発がんの双方に重要であることが、これまでのマウスモデルを用いた研究により明らかにされている。本研究では、PGE₂ 経路依存的に慢性胃炎を發症するマウス (*K19-C2mE* マウス) および Wnt シグナルと PGE₂ 経路の相互作用により炎症依存的に胃がんを自然發生するマウス (*Gan* マウス) を用いて、炎症性微小環境による胃がん發生促進機序について明らかにすることを目的として行なう。

約 21 塩基の RNA 分子からなる miRNA は、mRNA の 3' -UTR に結合して翻訳を阻害することなどにより、遺伝子発現を抑制する。がん遺伝子やがん抑制遺伝子の mRNA を標的とする miRNA は、その発現制御の逸脱により発がん促進に關与することが報告されている。しかし、炎症反応による発がん促進機構における、miRNA の關与については未だ明らかにされていない。そこで、*K19-C2mE* マウスおよび *Gan* マウスの胃炎・胃がん組織を用いて、炎症依存的に発現変化する miRNA の解析を行なった。本研究により、がん抑制遺伝子として作用する miR-7 が、炎症反応依存的に胃粘膜上皮細胞で発現低下して、胃がん發生に關与する可能性が示された。

B. 研究方法

網羅的 miRNA 発現解析: *K19-C2mE* マウス胃炎組織、*Gan* マウス胃がん組織、およ

び野生型マウス正常胃粘膜組織から抽出した RNA を用いて、マイクロアレイにより網羅的 miRNA 発現解析を行ない、胃炎および胃がん組織で発現上昇または発現低下する miRNA 群を抽出した。その中から選択した miRNA について、炎症およびがん組織での発現変化を RT-PCR により解析し、炎症依存的に胃がん組織で発現変化する miRNA を特定した。

正常組織における miR-7 発現実験: マウス胃粘膜上皮を初代培養し、継代培養すると分化が誘導される。この実験系で分化マーカーの発現解析により分化誘導を確認し、未分化および分化した胃上皮細胞での miR-7 発現を RT-PCR で解析した。さらに、正常マウス胎仔 (E15)、新生仔 (1, 14 日齢)、成熟マウス (6 週齢) の胃粘膜における miR-7 発現を RT-PCR で解析した。

ヒト胃がん組織の miR-7 発現解析: 金沢大学病院におけるヒト胃がん手術例の組織 27 例から抽出した RNA を用いて、TNF- α 、IL-1 β 、および miR-7 の発現量を RT-PCR にて定量し、比較解析した。

miR-7 による腫瘍原性解析: ヒト胃がん細胞 (Kato-III, AZ521) に miR-7 前駆体 (premiR-7) をトランスフェクションにより導入し、細胞増殖率の変化を MTT アッセイ法により解析した。また、premiR-7 を導入した各細胞の足場非依存増殖能の変化について、軟寒天中コロニー形成により解析した。

炎症による miR-7 発現抑制機序の解析実験: miR-7 の標的配列を含むルシフェラーゼ発現レポーターベクターを作製し、

Kato-III 細胞に導入した。マクロファージ細胞 RAW264 を LPS 刺激により活性化させて得られた conditioned medium (CM) を用いて屢次フェラーゼレポーター導入 Kato-III 細胞を刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、CM を限外濾過により分子量別に分画して同様の実験を行ない、miR-7 発現を抑制する責任因子の分子量を同定した。

個体レベルでの炎症依存的 miR-7 発現抑制の確認：野生型マウス胃粘膜に *Helicobacter felis* を感染させると慢性胃炎を発症し、一方で *Gan* マウスを無菌化して飼育すると PGE₂ 依存的炎症反応が抑制されることが明らかとなっている。そこで、*H. felis* 感染正常マウスおよび無菌飼育 *Gan* マウスそれぞれの胃組織における miR-7 発現量を RT-PCR で解析し、生体内における炎症反応と miR-7 発現レベルの関連について解析した。

新規 miR-7 標的遺伝子の探索：*Gan* マウスおよび *K19-C2mE* マウス胃組織の網羅的遺伝子発現解析結果から、炎症反応依存的に発現誘導される遺伝子を抽出し、さらにヒト・マウス双方の mRNA の 3' -UTR 領域に miR-7 標的配列を持つ遺伝子を選出した。胃がん細胞に premiR-7 を導入し、これら候補標的遺伝子の発現が抑制されるか確認実験を行なった。また、ヒト胃がん組織における miR-7 発現レベルと、特定した miR-7 標的遺伝子発現の関連について解析した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験および動物実験は金沢大学組換え実験委員会および動物実験委員会で承認された計画に沿って実施した。ヒト胃がん組織から抽出した RNA を用いた発現解析実験は、金沢大学倫理委員会で承認された計画にしたがって実施した。

C. 研究結果

網羅的 miRNA 発現解析：マイクロアレイ解析の結果、*K19-C2mE* マウス胃炎および *Gan* マウス胃がん組織の双方で、野生型マウスの正常胃粘膜に較べて 2 倍以上発現が上昇した miRNA が 21 個、0.5 倍以下に発現低下した miRNA が 29 個あった。これらの miRNA は炎症反応依存的に胃がん組織で発現変化したと考えられる。興味深いことに炎症依存的に発現誘導される miRNA の中に「がん遺伝子」として報告された miR-21 および miR155 が含まれていた。また発現低下した miRNA の中に「がん抑制遺伝子」として報告されている miR-7、miR-145 などが含まれていた。これらのマイクロアレイ結果は RT-PCR 解析によって確認した。

マイクロアレイ解析により炎症反応非依存的に胃がん組織で発現誘導または抑制される miRNA も特定したが、本研究では炎症依存的に胃がん組織で発現低下する miR-7 に着目して実験を進めた。

正常組織における miR-7 発現実験：正常胃上皮初代培養細胞を継代培養して維持すると、細胞分化が誘導されて Muc5AC や Muc6 などの分化マーカー遺伝子の発現が誘導される。この細胞実験系を用いた解析により、miR-7 発現は未分化上皮細胞では低く、分化にともなって誘導されることが明らかとなった。また、未分化な上皮で構成される胎仔期の胃組織では miR-7 発現は低く、主に分化した上皮細胞で構成される成熟マウスの胃組織で miR-7 発現が高かった。すなわち、miR-7 発現は上皮細胞の分化誘導に関与し、その発現抑制が未分化状態維持に関与する可能性が考えられた。

ヒト胃がん組織の miR-7 発現解析および miR-7 による腫瘍原性解析：28 例の外科切除胃がん組織および正常組織由来 RNA を用いた比較解析の結果、約 70% の胃がん組織で miR-7 の発現低下が認められた。同じ組織の RNA を用いて IL-1β および TNF-α の発現量を RT-PCR にて定量して miR-7 発現量と比較した結果、IL-1β および TNF-α 発現の高い胃がん組織で miR-7 発現量が少ない、逆相関関係が認められた。この結果から、炎症反応の強度が miR-7 の発現抑制に関与している可能性が考えられた。

miR-7 の前駆体である premiR-7 を導入した AZ521 および Kato-III 胃がん細胞では、細胞増殖率が有意に低下した。また、軟寒天中でのコロニー形成数もそれぞれの細胞で約 50% 程度まで減少し、腫瘍原性の低下が認められた。したがって、miR-7 は胃がん発生において「がん抑制遺伝子」として作用すると考えられた。

炎症による miR-7 発現抑制機序の解析実験：miR-7 発現によりルシフェラーゼ発現が抑制されるレポーターベクターを Kato-III 細胞に導入し、活性化マクロファージの CM で刺激すると有意にルシフェラーゼ活性が上昇した。この結果は、活性化マクロファージ由来因子が miR-7 発現を抑制することを示している。一方、TNF-α、IL-1β、IL-6 などの炎症性サイトカインでレポーター導入 Kato-III 細胞を刺激しても、ルシフェラーゼ活性は変化しなかった。そこで、限外濾過により分画した CM を用いて同様の実験を行なった結果、3KDa 以下の低分子量の分画でルシフェラーゼ活性が上昇した。すなわち、活性化マクロファージが分泌した 3KDa 以

下の分子が、胃癌細胞での miR-7 発現を抑制することが明らかとなった。

個体レベルでの炎症依存的 miR-7 発現抑制の確認：*H. felis* を感染させた野生型マウス胃粘膜ではマクロファージ浸潤をともなう胃炎が発生した。*H. felis* 感染で誘導された胃炎組織では非感染マウス胃粘膜に較べて miR-7 発現が約 50%まで減少した。また、*Gan* マウスを無菌化飼育すると PGE₂ 依存的炎症反応の誘導が抑制される。炎症が抑制された無菌化 *Gan* マウスの胃粘膜では、対照群の *Gan* マウスに較べて miR-7 発現が 5 倍以上に上昇した。この実験により、炎症反応が胃粘膜の miR-7 発現の低下を誘導することが、個体レベルでも確認された。

新規 miR-7 標的遺伝子の探索：miR-7 はヒト EGFR 遺伝子 mRNA を標的とすることが報告されているが、マウスの EGFR 遺伝子 mRNA には miR-7 標的配列がない。そこで、ヒトとマウス共通の miR-7 標的遺伝子の中から、*K19-C2mE* マウス、*Gan* マウス双方の胃組織で発現誘導される遺伝子を探索した。その結果、*Lphn2*、*Basp1*、および *Mafg* の 3 遺伝子がヒト・マウスともに 3' -UTR に miR-7 標的配列があり、炎症依存的に胃癌組織で発現上昇することが明らかとなった。また、胃癌細胞に premiR-7 を導入するとこれら 3 遺伝子の発現が低下することから、*Lphn2*、*Basp1*、*Mafg* は miR-7 標的遺伝子であることが確認された。さらに、ヒト胃癌組織における発現を解析した結果、これら 3 遺伝子の発現レベルはどれも miR-7 発現量と逆相関していた。したがって、これらは炎症反応依存的に miR-7 が発現低下したことにより、胃癌組織で発現誘導されたと考えられた。

D. 考察

「がん遺伝子」として発がん促進に作用することが示唆されている miR-21 や miR-155 の発現が、NF- κ B や Stat3 などの炎症反応で活性化される転写因子により誘導されることが報告されている。したがって、炎症はがん遺伝子として作用する miRNA 発現誘導により発がんを促進する可能性が考えられた。本研究でも、miR-21 と miR-155 が炎症反応依存的に胃癌組織で発現誘導されることが確認された。一方で本研究では、「がん抑制遺伝子」として作用する miRNA の発現が炎症反応により抑制されることも明らかにした。炎症による miRNA 発現抑制機序は明らかにされていないが、以上の結果から、炎症反応は「がん遺伝子」として作用する miRNA の発現を誘導するのと同時に、

「がん抑制遺伝子」として機能する miRNA 発現を抑制することで発がんに関与していると考えられた。

本研究では miR-7 と炎症反応の関係について焦点を絞って解析を行ない、(1) 胃粘膜での miR-7 発現が炎症反応依存的にマクロファージ由来因子により抑制されること、(2) miR-7 は分化にともなって誘導され、その発現低下は未分化性維持に重要である可能性があること、および (3) miR-7 発現誘導により胃癌細胞の増殖能や腫瘍原性が抑制されることなどを示した。網羅的発現解析から示されるように、炎症反応により複数のがん関連 miRNA の発現が変化しており、それぞれが発がんに関与していると考えられる。その中でも miR-7 単独の発現誘導実験によってがん細胞の腫瘍原性が抑制されるので、miR-7 発現低下は発がん過程で重要な役割を果たしていると考えられる。miR-7 発現が上皮細胞の分化誘導に関わっている可能性があるため、がん細胞における miR-7 発現抑制はがん幹細胞の未分化性維持にも関与する可能性が考えられる。分化誘導と miR-7 との関連については、今後の重要な研究課題である。

本研究では、マクロファージ由来の低分子 (<3KDa) が miR-7 発現を抑制することを明らかにした。これまでに低分子による miRNA の発現制御についての報告はなく、今後の実験によりマクロファージ由来責任分子が同定されれば、miR-7 発現低下の阻害を標的とした新しい胃癌予防・治療薬の標的候補となる可能性が期待される。

また、本研究により炎症反応依存的に胃癌組織で発現誘導する、新規 miR-7 標的遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中で *Lphn2* と *Basp1* の機能については論文報告が少なく、発がんとの関連についても不明である。また、*Mafg* は small Maf ファミリーに属する因子で、酸化ストレスに対する応答反応に重要な転写因子なので、がん細胞の生存に関与している可能性が考えられる。これらの遺伝子産物の胃癌発生における作用については、今後の検討課題である。

E. 結論

PGE₂ 経路依存的に胃炎を発生する *K19-C2mE* マウス、および Wnt シグナルと PGE₂ 経路の相互作用により胃癌を発生する *Gan* マウスを用いた解析により、「がん遺伝子」および「がん抑制遺伝子」として作用する miRNA が、それぞれ炎症反応依存的に胃癌組織で発現誘導および発現抑制され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関与している可能性が示され、また miR-7 の発現誘導が胃癌細胞の増殖性および腫瘍原性を抑制することから、miR-7 は胃癌発生に関与するがん抑制性 miRNA と考えられた。さらに、炎症反応で活性化したマクロファージが産生する分子が胃癌細胞で miR-7 の発現を抑制し、それにより胃癌細胞では Lphn2, Basp1, Mafg などの miR-7 標的遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった。これらの遺伝子産物による胃癌発生への関与については今後の検討課題である。以上の結果により、炎症依存的な miR-7 発現抑制を制御することは、将来的に胃癌発生の予防または治療薬開発の新規開発戦略として重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. Oshima, H., and Oshima, M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 47: 97-106 (2012)
3. 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)
4. Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, 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, E., and Saya, H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of xc⁻ and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 19: 387-400 (2011)
5. 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 metaplasia by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell*, 19: 125-137 (2011)

2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. Oshima M: Inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. 2nd Internal Symposium on Carcinogenic Spiral, 京都 (2012年1月)

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

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既に明らかにしていた。JNK/mTORC1経路により調節され、腫瘍の成長に関与する分子を同定するため、ヒト大腸がん細胞にJNK活性化剤のAnisomycinやJNK阻害薬SP600125、JNK1/2に対するshRNAを投与した際のcyclin Eの発現変化、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を投与した際の発現変化を調べた。その結果、Apcに変異を持つ腸管腫瘍細胞では、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、さらにJNKは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制御していることが分かった。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が強く示唆された。

A. 研究目的

Apc^{Δ716} 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 Smoothened 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 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。

B. 研究方法

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。

（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

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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).

2. 学会発表

1. 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 東京都 (2011年6月)

2. 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 名古屋市 (2011年10月)

3. 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 名古屋市 (2011年10月)

4. 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 名古屋市 (2011年10月)

5. 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 名古屋市 (2011年10月)

6. 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)

7. 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 札幌市 (2011年12月)

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。

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

DSS誘発大腸炎発症時におけるApc遺伝子の機能解析

分担研究者 庫本高志
京都大学医学研究科 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、DSS 誘発大腸炎に高感受性を示す。今年度は、APC タンパク質 C 末端領域が持つ、大腸炎症時の機能について検討した。免疫染色の結果、大腸炎症領域では APC タンパク質は血管内皮細胞に強い発現を示した。また病理学的解析、初代培養細胞を用いた解析の結果から、KAD ラットの大腸炎症が持続する要因として、血管内皮細胞の管形成異常に基づく血管新生の遅延が考えられた。本研究は、APC タンパク質が発がんだけでなく、血管内皮細胞の管形成を通じて大腸炎修復機構という新たな生体内における機能を有することを示唆している。

A. 研究目的

Kyoto *Apc* Delta (KAD) ラット (F344-*Apc*^{mlk_{Kyo}}) 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) を持ち、C 末 321 アミノ酸を欠く APC タンパク質を発現している。KAD ラットは、デキストラン硫酸塩 (DSS) の飲水投与によって誘発される大腸炎に対し、対照系統の F344 ラットに比べ下痢や血便といった大腸炎症状が増悪かつ持続した。このことから、APC タンパク質 C 末端領域が、大腸炎発症機構に関与することが示唆された。

一般に炎症の治癒過程には、上皮細胞の再生、間葉系細胞・血管細胞の進展、免疫系細胞の浸潤といった様々な細胞の働きが関与しているとされている。しかし、APC タンパク質の機能と大腸炎症との関連性については、これまで知られていない。

そこで今年度は、大腸炎症領域における APC 発現細胞の同定と KAD ラット由来初代細胞の炎症関連特性を明らかにすることで、APC タンパク質 C 末端領域が持つ生体内、特に大腸炎症時の機能について検討した。

B. 研究方法

5 週齢の雄 KAD ラットと F344 ラット各 16 頭を用いた。このうち無処置群として各 4 頭を用いた。残り各 12 頭に、2% DSS を 1 週間飲水投与した。DSS 投与直後に各 4 頭、1 週後に各 4 頭、3 週後に各 4 頭から大腸を採取した。取り出した大腸は、管腔内を PBS で洗浄し、長軸に沿って切開後、固定した。固定後大腸組織について

抗 APC 抗体を用いて免疫染色を実施し、APC 発現細胞を同定した。また抗 CD31 抗体を用いて血管内皮細胞を免疫染色し、血管数を測定した。さらに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、評価した。

次に 8 週齢雄 F344 および KAD ラット胸部大動脈を採取し、マトリゲルを用いた初代培養法により初代血管内皮細胞を準備した。この細胞を用いて、Wash アッセイにより細胞接着能を、Wound、マトリゲルを用いた Tube Formation アッセイにより管形成能を、BrdU 取り込みアッセイにより細胞増殖能を、Healing アッセイにより細胞移動能をそれぞれ測定した。

(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」に基づき施した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

通常 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。Apc 遺伝子変異動物はこれまで発がんの病態解析モデルとして用いられてきた。本研究結果は APC タンパク質が発がんだけでなく、血管内皮細胞の管形成を通じて大腸炎修復機構という新たな生体内における機能を有することを示唆している。

E. 結論

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できることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the Edaradd gene.

Kuramoto T, Yokoe M, Hashimoto R, Hiai H, Serikawa T.

BMC Genet . 2011;12(1):91.

2. 学会発表

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、厩本 高志 第 58 回日本実験動物学会、平成 23 年 5 月 25 日～27 日、東京

Establishment of chemotherapeutic in vivo test for colon cancer using Kyoto Apc Delta rat 吉見一人、田中卓二、厩本高志 第 70 回日本癌学会、平成 23 年 10 月 3 日～5 日、名古屋市

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