

環境因子による発がん機序に関する遺伝子のKOラット作製を行い、新たな発がんメカニズムを解明する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchino, K., Takeshita, F., Takahashi, RU., Kosaka, N., Fujiwara, K., Naruoka, H., Sonoke, S., Yano, J., Sasaki, H., Nozawa, S., Yoshiike, M., Kitajima, K., Chikaraishi, T., Ochiya, T. Therapeutic effects of microRNA-582-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression. *Mol Ther.*, 21: 610-619 (2013)
- 2) Fujita, T., Yanagihara, K., Takeshita, F., Aoyagi, K., Nishimura, T., Takigahira, M., Chiwaki, F., Fukagawa, T., Katai, H., Ochiya, T., Sakamoto, H., Konno, H., Yoshida, T., Sasaki, H. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice. *Cancer Sci.*, 104: 214-222 (2013)
- 3) Fujita, Y., Takeshita, F., Kuwano, K., Ochiya, T. RNAi Therapeutic Platform for Lung Diseases. *Pharmaceuticals*, 6: 223-225 (2013)
- 4) Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M.,

- Ochiya, T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci. Rep.*, 3: 1197 (2013)
- 5) Kosaka, N., Takeshita, F., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Katsuda, T., Ono, M., Ochiya, T.: Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "Exocure" is another choice for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65: 376-382 (2013)
 - 6) Takeshita, F., Takahashi, RU., Onodera, J., Ochiya, T. In vivo imaging of oligonucleotide delivery. *Methods Mol. Biol.*, 872: 243-253 (2012)

(連携研究者の川又による発表)

- 7) Hong, J., He, H., Bui, P., Ryba-White, B., Rumi, M.A., Soares, M.J., Dutta, D., Paul, S., Kawamata, M., Ochiya, T., Ying, Q.L., Rajanahalli, P. and Weiss, M.L.: A focused microarray for screening rat embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev.*, 22:431-443(2013)
- 8) Kawamata, M. and Ochiya, T.: Two distinct knockout approaches highlight a critical role for p53 in rat development. *Sci. Rep.*, 2:945(2012)

2. 学会発表

- 1) 竹下文隆、山本雄介、吉岡祐亮、箕浦

加穂、高橋陵宇、田谷敏貴、小坂展慶、落谷孝広. ゲノムコピー数変化を指標としたヒト乳がん細胞株の薬剤耐性獲得に関与する microRNA の探索. 第 4 回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012 年 8 月)

2) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、園家暁、佐々木秀郎、力石辰也、落谷孝広. 浸潤性膀胱がんに対する新規核酸医薬の開発. 第 4 回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012 年 8 月)

3) 萩原啓太郎、小坂展慶、吉岡祐亮、竹下文隆、落谷孝広. 天然化合物による microRNA 発現制御機構の解明. 第 4 回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012 年 8 月)

4) 勝田毅、土屋玲子、小坂展慶、吉岡祐亮、高垣健太郎、隠岐勝幸、竹下文隆、酒井康行、黒田雅彦、落谷孝広. ヒト脂肪由来間葉系幹細胞による機能的ネプレライシンを備えたエクソソームの分泌とアルツハイマー病への応用. 第 4 回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012 年 8 月)

5) 藤田雄、竹下文隆、高橋陵宇、内野慧太、小坂展慶、水谷隆之、桑野和善、落谷孝広. 経気道投与 siRNA を用いた肺がんに対する新規核酸医薬の開発. 第 4 回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012 年 8 月)

6) 小坂展慶、吉岡祐亮、萩原啓太郎、竹下文隆、落谷孝広. 分泌型マイクロ RNA を介した正常細胞と癌細胞の細胞競合. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

7) 落谷孝広、高橋陵宇、小野麻紀子、竹

下文隆. リボフォリン 2 を標的としたがん幹細胞のマイクロマネージメント. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

8) 小野麻紀子、竹下文隆、高橋陵宇、落谷孝広. 癌幹細胞の休眠状態は、間葉系幹細胞に依存する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

9) 清野慧至、竹下文隆、浅利晃、落谷孝広. 癌細胞に及ぼす外因性ヒアルロン酸の生物学的特性. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

10) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、園家暁、佐々木秀郎、力石辰也、落谷孝広. microRNA-582-5p/3p による膀胱がんの増殖および転移の抑制. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

11) 福永早央里、石原えりか、佐々木康介、竹下文隆、嶋本顕、落谷孝広、田原栄俊. 老化関連 microRNA による膵がんの増殖抑制. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

12) 萩原啓太郎、小坂展慶、吉岡祐亮、高橋陵宇、竹下文隆、落谷孝広. 乳がんにおいてスチルベン類は Ago2 依存的にがん抑制性マイクロ RNA の働きを促進する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、(2012 年 9 月)

13) 藤原智洋、小坂展慶、高橋陵宇、吉岡祐亮、萩原啓太郎、竹下文隆、落谷孝広. microRNA 機能阻害によるがん幹細胞制御を目的とした骨肉種に対する新規治療戦

略. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市
(2012 年 9 月)

14) 高橋陵宇、竹下文隆、小野麻紀子、落
谷孝広. 乳がんにおけるがん幹細胞形
質を制御する microRNA の同定とその機能
解析. 第 71 回日本癌学会学術総会、札
幌市 (2012 年 9 月)

15) 三浦奈美、本田一文、野呂林太郎、竹
下文隆、渡辺隆文、渡部幸央、落谷孝広、
山田哲司 肺がん細胞における
Actinin-4 の機能解析 第 71 回日本癌学
会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

16) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、小坂
展慶、藤原佳絵、成岡春奈、園家暁、矢
野純一、佐々木秀郎、野沢資亜利、吉池
美紀、北島和樹、力石辰也、落谷孝広.
microRNA-582-5p および 3p 鎖の両鎖機能
性による膀胱がん細胞の増殖、浸潤抑制
効果 第 35 回日本分子生物学会年会 福
岡市 (2012 年 12 月)

17) K. Uchino, F. Takeshita, N. Kosaka,
RU. Takahashi, T. Ochiya Therapeutics
application of microRNA-582-5p and -3p

in the treatment of invasive bladder
cancer Keystone Symposia: Non-Coding
RNAs in Development and Cancer、バン
クーバー、カナダ (2013 年 1 月)

(連携研究者の川又、落谷らによる発表)

18) 川又理樹、落谷孝広. ラットでの P53
欠損は胚性幹細胞を悪性化させ胎児の発
生障害を誘導する. 第 71 回日本癌学会
学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

19) Kawamata, M. and Ochiya, T. TWO
DISTINCT KNOCKOUT MODELS REVEALED AN
ESSENTIAL ROLE OF P53 GENE IN RAT
EMBRYOGENESIS ISSCR annual meeting,
Yokohama (2012 年 6 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

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

新潟大学医歯学総合研究科 客員研究員

研究要旨 ヒト T-ALL モデルであるマウス胸腺リンパ腫とマウス腸管腫瘍を対象に、放射線発がんの標的細胞を明らかにすることを目標とした。この時、組織特異的な Bcl11b 片アレル消失を導入するモデルを利用した。胸腺細胞での片アレル消失は放射線照射後の細胞周期進行の停止を減弱させることが確認された。一方、腸管の Lgr5 発現幹細胞でのみ Bcl11b 片アレル消失するマウスでは、放射線照射後の細胞増殖停止の減弱と損傷からの早期回復が観察された。これらの Bcl11b 片アレル消失の影響には減弱という共通性がみられ、この増殖調節の異常は DNA 損傷の蓄積頻度の増加を示唆し、これが発がん修飾機構の一つと考えられた。また、T-ALL で報告された BCL11B 変異の影響を検討した。p53 分解を行う HDM2 への BCL11B による転写抑制効果は、変異により減弱したが、この減弱は p53 が欠損しているで見られなかった。この結果は、p53 変異のない T-ALL では BCL11B 変異は p53 変異の代替えとして役割を担う可能性が示唆された。BCL11B のがん抑制遺伝子としての役割、発がん母細胞、放射線傷害の蓄積性を担う細胞種に関する知見は、放射線暴露健康リスクへの評価の基盤を与える。

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、発がん母体細胞とその性質を明らかにすることは、発がん機構、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様の性質を獲得すると考えられる。本研究では、Bcl11bKO/+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、種々の細胞種で発現するが、胸腺細胞や腸管の上皮細胞はその中に含まれる。具体的な目標は、胸腺リンパ腫では胸腺内のどの分化段階にある細胞が標的となるか、その標的細胞の特性を明らかにする。また、腸管腫瘍では腸管クリプト内の幹細胞・TA (transit amplify) 細胞の中で、放射線発がんの標的細胞は何かを明らかにする。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

Bcl11bflox/+マウスは通常の方法で作製した(新潟大学脳研究所、崎村研との共同研究)。使用した他のマウスは、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 下の実験動物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°C、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 FACScan (Becton-Dickinson 社) を用いて FACS 分析を行い、データの解析は Flow-Jo 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。

細胞周期の測定では、100 μg の BrdU (10mg/ml) をマウスの腹腔内へ投与し 1 時間後に 1Gy の 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。1-2×10⁶ 個のマウス胸腺細胞を、固定、浸透化し、37°C で 60 分間 DNaseI (300 μg/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

HDM2 (ヒト MDM2) 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は昨年度作製したものを利用した。同様に、p21 プロモータープラスミドも通常の方法で作製した。BCL11B (ヒト Bcl11b) 発現変異プラスミドは、すでに作製している BCL11B 発現変異プラスミドを元に、市販の変異導入キットを用いた。最終的にはそれぞれのプラスミド DNA の塩基配列を決定し、目的に合致していることを確認した。HCT116 細胞 (p53+ または p53-) に、プロモータープラスミドと BCL11B 発現プラスミドをトランスフェクションし、その細胞抽出液をデュアルルシフェラーゼアッセイ法で測定した。

B-4 腸管の解析

8 週齢のマウスに 12Gy の γ 線照射を行い、16 時間および 96 時間後に腸管を取り出し、固定した。組織染色は HE 染色法および市販の抗 Bcl11b 抗体、抗 GFP 抗体などを用いた組織免疫法を行った。

C. 研究結果

C-1 Bcl11b 片アレル消失による放射線影響の修飾：

ヒト T 細胞リンパ芽球性急性白血病 (T-ALL) で BCL11B 変異が報告されている (De Keersmaecker et al., 2010;

Gutierrez et al., 2011)。しかし、変異がもたらす影響については未解析である。昨年度は、Lck-Cre;Bcl11bflox/+および CD4-Cre;Bcl11bflox/+マウスを用い、 γ 線照射後での前リンパ腫細胞の出現を検討した。Bcl11b 片アレル消失が DN2 分化段階から生じる前者でのみ、出現が観察されたことから、DN2 分化段階から DP 段階までにある細胞、恐らくは増殖期にある ISP 細胞が発がん母体細胞となることを報告した。また、Bcl11b 片アレル消失は、この ISP 細胞の照射後細胞周期の進行停止を減弱させる働きをもつことを示した。しかし、この効果は胸腺細胞そのものの性質 (内因的) か、他の細胞による二次的な影響なのかは明らかでなかった。

C-1-1 Lck-Cre;Bcl11bflox/+マウス胸腺細胞での放射線影響：

そこで、Lck-Cre;Bcl11bflox/+マウスを用いて、細胞周期への照射影響を再度検討した。BrdU 投与後 5 時間、 γ 線照射後 4 時間の ISP 細胞では、BrdU+FSC-L 分画 (S 期の細胞) の細胞数は低下し、BrdU+FSC-S (G1 期細胞) 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、障害を意味する。興味深いことには、この細胞周期進行の停止が、Bcl11b+/+胸腺より Lck-Cre;Bcl11bflox/+胸腺の方でより弱かった。このことは、胸腺細胞での Bcl11b の片アレル消失が、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。すなわち、内因性であることがわかった。

C-1-2 Bcl11b/BCL11B の標的遺伝子としての p21 に対する発現抑制作用の解析：
Bcl11bKO/+マウスに p53KO/+遺伝子型を導入すると、胸腺リンパ腫を自然発症するが、Bcl11bKO/+マウスでは発症しない。これは、Bcl11b が p53 と協調して細胞のがん化に働くことを示唆する。昨年度の結果では、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、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を明らかにした。今年度は、p21 遺伝子の転写への影響を検討した。HDM2 遺伝子の転写は約 20%にまで抑制されるのに対し、p21 遺伝子では約 50%程度であり、抑制効果は低かった。また、p21 遺伝子転写開始点上流 2 か所に p53 応答エレメントが存在するが、両者の p53 応答エレメントの有無によって BCL11B による p21 発現の発現抑制効果には影響がなかった。これらのことから Bcl11b/BCL11B による p21 に対する発現抑制効果は、HDM2 に比べ弱く、また異なる機構が示唆された。

C-1-3 ヒト T 細胞急性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) で見出された BCL11B 変異の HDM2 に対する発現抑制作用の解析：

近年、ヒト T 細胞リンパ芽球性急性白血病 (T-ALL) で主に亜鉛フィンガードメイン

に位置する BCL11B 変異が報告されている (De Keersmaecker et al., 2010; Gutierrez et al., 2011)。そこで、これらの BCL11B 変異が HDM2 転写抑制にどのように作用するか、また p53 発現との関連性について検討した。ヒト T-ALL で報告された 8 種類の点変異 BCL11B 発現ベクター(変異は 2~3 番目の Zn フィンガードメインに位置する)を作製し、HDM2 および p21 のプロモーター領域に対してレポーターアッセイを行った。その結果、HCT116 細胞では HDM2-P2 プロモーター活性に対して BCL11B 変異のうち、特に Zn フィンガードメインのヒスチジンの変異(H445Y と H473Q)は抑制効果が野生型の約 50%に減弱した。また、p53 欠損 HCT116 細胞では変異による機能阻害を認めず、p53 の有無で影響が見られることがわかった。一方、p21 に対しては、BCL11B による転写活性の抑制は p53 の有無によって変わらず、p53 非依存性であることがわかった。また、BCL11B 変異による転写活性抑制の減弱が HDM2 に対する効果に比べて少ないこともわかった。これらの結果から、BCL11B に生じた点突然変異は、その標的遺伝子によって異なる抑制結果をもたらすことが分かった。この違いと T-ALL 発症との関連は興味深い、今後の解析が必要である。

C-2 Bcl11b の片アレル消失および両アレル消失がもたらす腸管クリプト細胞への

影響：

マウスに 12Gy の γ 線を照射すると、腸管上皮細胞の増殖停止と細胞の上部への移動が停止するが、Bcl11b の片アレル消失したマウスではこの増殖停止を減弱することが判明している。しかし、この Bcl11b の働きが腸管細胞特異的か、他の細胞（例えば、免疫細胞）の変化による二次的な結果かどうかは不明であった。そこで、Lgr5 を発現する細胞（腸管幹細胞）で特異的に Bcl11b を消失させる Lgr5-Cre; Bcl11bflox/flox または Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスを作製し、検討してきた。昨年度の予備的な結果を踏まえ、今年度はマウスの頭数を増やし、Bcl11b 活性の減弱、消失が与える、腸管クリプト細胞への影響および放射線照射の影響を検討した。

C-2-1. 照射後の Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスの解析：

Bcl11bKO/+ および Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスは、腸管で形態や増殖性に変化はみられない。一方、Bcl11bKO/+マウスは、12Gy の γ 線を照射し 16 時間後（形態的な変化がまだみられない時期）に腸管を観察すると、細胞増殖停止の減弱が観察される。この性質の変化が Lgr5 陽性細胞で Bcl11b 片アレル消失したことに起因するのか、を同様の条件下で調べた。すなわち、40HT 投与 (Cre を発現誘導する) 2 週間後の Lgr5-Cre;

Bcl11bflox/+マウスに 12Gy の γ 線を照射し 16 時間後の変化を観察した。その結果、Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスでも同様の細胞増殖停止の減弱が観察された。

次に、照射後の損傷回復時、すなわち 12Gy の γ 線を照射し 16 時間後の変化への影響を調べた。Bcl11bKO/+マウスと Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスはどちらも野生型マウスに比べ、より強い再生像を示した。これらの結果は、Lgr5 陽性細胞での Bcl11b の片アレル消失は、照射後の増殖、再生をより増大させることを示す。すなわち、細胞増殖の抑制に Bcl11b は寄与し、その機能低下は腸管幹細胞に増殖性を与えることを示唆する。

C-2-2. Bcl11b を両アレル消失したマウスの腸管の非照射時の解析：

Lgr5-Cre; Bcl11bflox/KO マウスを作製し、40HT 投与により Bcl11b の両アレルを消失した腸管への影響を調べた。Cre 発現を GFP 染色でモニターすると、35%-45%のクリプト底部で Cre 発現が確認された。これは先行研究と一致する。しかし、このクリプトの約半数でしか Bcl11b 発現の消失が観察されなかった。一方、Lgr5-Cre; LacZ-on マウスでは GFP 染色と LacZ 染色が同程度であった。これは、Bcl11b 発現を消失したクリプトが減少し、クリプトの維持能低下を引き起こしていることを示唆する。この結果から、Bcl11b 消失の幹細胞は存続能が低下すると考え

られる。

C-2-3. Bcl11b を両アレル消失したマウスの腸管の照射後の解析：

Lgr5-Cre; Bcl11bflox/KO マウスに 40HT 投与後 12Gy 照射し、96 時間後のクリプト再生時での変化を観察した。Lgr5 発現をモニターする GFP 発現は 1-3%と激減していた。これは Lgr5 陽性幹細胞の再生が少ないことを意味する。一方、Bcl11b 発現消失のクリプトは 20-30%のクリプトで観察され、非照射時の割合と変わらなかった。これは照射後の再生時では、Bcl11b 消失幹細胞は Bcl11b 発現細胞と比べ、クリプト形成に強く寄与することを示唆する。したがって、非照射時、すなわちクリプト・ホメオスタシス（維持）の時期とは、反対の影響を与えると考えられる。

C-2-4. Bcl11bS826G/KO マウスの解析：

Bcl11b-S826G は亜鉛フィンガードメインの 826 番目のセリンがグリシンに置換したアレルであり、機能低下をもたらすことがわかっている。Bcl11bS826G/KO マウスを作製し、3 週齢での腸管を観察した。クリプトサイズは有意に小さく、クリプト低形成をもたらすと考えられた。

D. 考察

D-1 ヒト T 細胞リンパ芽球性急性白血病 (T-ALL) での BCL11B 変異の意義：

T-ALL で BCL11B 変異や BCL11B 片アレル消失が報告されているが、これらの変異が

もたらす影響について解析した。まず、マウスの胸腺 T 細胞系列の細胞に特異的に Bcl11b 片アレル消失を起こさせると、増殖能をもつ ISP 細胞は放射線照射後の細胞周期進行停止を減弱することがわかった。この結果は、Bcl11b 片アレル消失がもたらす影響は、胸腺細胞そのものの性質 (内因的) の変化によることを示す。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。

次に、ヒト T-ALL で報告された 8 種類の点変異の、HDM2 および p21 のプロモーター活性に与える影響を、p53 活性の有無の条件下で調べた。変異は転写抑制活性を減弱させるが、その効果に HDM2 と p21 で違いが観察された。第一に、変異の影響は前者で大きく、後者は小さい。第二は、HDM2 プロモーターでは、p53 が欠損していると影響が見られなくなったが、p21 に対してはどちらでも影響がみられた。BCL11B 消失は HDM2 の転写抑制を解除し、その結果 p53 の分解を促進する (昨年度の報告)。すなわち、BCL11B 消失は p53 機能消失と同じ役割を担う。ヒト T-ALL での p53 変異は約 30%であり、残りの 70%には変異がみられない。p53 変異をもたない T-ALL では、BCL11B 変異がその代替えとして役割を担う可能性が示唆される。

D-2 Bcl11b 片アレル、両アレル消失の腸

管細胞への影響

Bcl11bK0/+マウスは腸管腫瘍形成を促進するが、その機構を明らかにする一つのヒントが得られた。すなわち、Bcl11b K0/+マウスの腸管では、形態、増殖性に変化はみられないが、12Gyの γ 線を照射すると、細胞増殖停止（細胞周期停止の減弱を反映する）が観察される。今回の結果は、Lgr5発現陽性細胞でのみBcl11b片アレル消失する、Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスでも同様にこの減弱が観察された。このことは、Lgr5発現陽性細胞（腸管幹細胞の有力候補であり、発がんの母細胞と考えられている）で、Bcl11bが量的に半減することが、発がんに貢献することを示している。

前述したように、Bcl11bの片アレルを消失した胸腺細胞でも細胞周期停止の減弱が観察されている。1Gy（または3Gy）の γ 線を照射すると、細胞周期停止の減弱が観察され、胸腺細胞特異的にBcl11bの片アレル消失させる系（Lck-Cre; Bcl11bflox/+）でも、減弱が観察されている。

次に、Bcl11bの片アレルではなく、両アレルが消失するLgr5-Cre;Bcl11bflox/K0マウスを作製し、実験した。腸管腫瘍形成という点では両アレル欠損はみられず（ハプロ不全型のがん抑制遺伝子であるため）、Bcl11bの完全消失は腫瘍形成にはむしろ負に働くと

考えられている。Bcl11b発現を消失したクリプトは維持能低下を引き起こし、Bcl11b発現消失幹細胞は存続能が低下したという結果が得られた。この低下は腫瘍形成に負に働くという予想と一致する。一方、このマウス系に照射を行うと、腸管幹細胞の増殖に関し、逆の影響を示した。すなわち、Bcl11b消失は再生時のクリプト形成に強く寄与することを示唆した。この影響と発がんとの関連性については、不明である。

E. 結論

(1) ヒトT-ALLでBCL11B変異と片アレル消失が観察されるが、これらの変異の及ぼす影響を調べた。片アレル消失は放射線照射後の細胞周期進行の停止を減弱することがfloxマウスを用いて確認された。一方、変異の影響は、p53分解を行うHDM2の転写を培養系で測定した。変異はHDM2転写抑制効果を減弱させたが、この減弱はp53が欠損していると見られなかった。従って、p53変異のないT-ALLではBCL11B変異がその代替えとしての役割を担う可能性を示唆する。(2) 腸管のLgr5発現陽性細胞でのみBcl11b片アレル消失する、Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスで、放射線照射後の腸管細胞で増殖停止の減弱と早期回復が観察された。この減弱はDNA損傷の蓄積頻度の増加を示唆し、これが発がん修飾機構の一つと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, Kominami R. Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes in mice conditionally losing one Bcl11b allele. *Cancer Sci.* in press (2013)
- 2) Tanaka H, Naito T, Muroi S, Seo W, Chihara R, Miyamoto C, Kominami R, Taniuchi I. Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose CD4+ helper-lineage fate in the thymus. *EMBO J.* 32: 1183-1194 (2013)
- 3) Okumura K, Sato M, Saito M, Miura I, Wakana S, Mao JH, Miyasaka Y, Kominami R, Wakabayashi Y. Independent genetic control of early and late stages of chemically induced skin tumors in a cross of a Japanese wild-derived inbred mouse strain, MSM/Ms. *Carcinogenesis* 33: 2260-2268 (2012)
- 4) Go R, Takizawa K, Hirose S, Katsuragi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R.

Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a Bcl11b tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. *Leuk Res.* 36: 1035-1040 (2012)

2. 学会発表

- 1) 葛城 美德、郷 梨江香、木南 凌、放射線照射後の腸上皮における Bcl11b の働き. 第 55 回大会、日本放射線影響学会、仙台市 (2012 年 9 月)
- 2) 木南 凌、郷 梨江香. Radiation target cells in thymic lymphom 第 71 回大会、日本癌学会総会、札幌市 (2012 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

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 内臓脂肪より分泌されるアディポサイトカインは大腸発がんにおいて重要な役割を担う。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、mTOR/S6K/S6pathway の関与が示唆された。マウス発癌モデルではメトホルミンが AMPK 活性化を介しポリープ抑制作用を示すことが明らかとなった。ヒトにおいては、大腸がんのサロゲートマーカーである ACF が、メトホルミン1カ月間投与で有意に減少した。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、現在そのための臨床試験を実施中である。

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。本研究ではメトホルミンによる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。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、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。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。

D. 考察

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る。現在、ポリペクトミーによりクリーンコロソ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。

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る。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) Ohkubo H, Takahashi H, Yamada E, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Taguri M, Nakajima A: Natural history of human aberrant crypt foci and correlation with risk factors for colorectal cancer. *Oncol Rep*, 27(5): 1475-1480, 2012.
- 2) Higurashi T, Takahashi H, Endo H, Hosono K, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Uchiyama T, Hata Y, Fujisawa N, Uchiyama S, Ezuka A, Nagase H, Kessoku T, Matsushashi N, Nakayama S, Inayama Y, Morita S, Nakajima A: Metformin efficacy and safety for colorectal polyps: a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer*, 12(1):

118, 2012.

3) Higurashi T, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Iida H, Uchiyama T, Ezuka A, Uchiyama S, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Maeda S, Morita S, Natsumeda Y, Nagase H, Nakajima A: Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer*, 12(1): 413, 2012.

4) Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Kato S, Sakai E, Hosono K, Yoneda M, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, Nakajima A: Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence. *Dig Endosc*, 24(5):353-357, 2012.

5) Hosono K, Yamada E, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, Nakajima A: Increased tumor necrosis factor receptor 1 expression in human colorectal adenomas. *World J Gastroenterol*, 18(38): 5360-5368, 2012.

6) Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Sakai E, Hosono K, Nagashima Y, Nakajima A: IL-6 plays crucial roles in sporadic colorectal cancer through the cytokine networks including CXCL7 PP. *J Cancer Ther*, 3(6): 874-879, 2012.

7) Takahashi H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Nakajima A:

Relationship of human rectal aberrant crypt foci and formation of colorectal polyp: One-year following up after polypectomy. *World J Gastrointest Endosc*, 4(12): 561-564, 2012.

2. 学会発表

1) Sakai E, Takahashi H, Yamada E, Higurashi T, Ohkubo H, Hosono K, Endo H, Kato S, Nakajima A, Cui C, Takamatsu R, Yoshimi N: The histopathological characteristics of mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. アメリカ癌学会年会 2012, 米国シカゴ, 2012, 4.

2) 日暮琢磨, 遠藤宏樹, 中島淳: 大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル: 動物モデルを用いた検討. 第98回日本消化器病学会総会、東京, 2012, 4月.

3) 酒井英嗣, 遠藤宏樹, 中島淳, 山田英司, 日暮琢磨, 大久保秀則, 高橋宏和: 低用量 resveratrol は大腸腫瘍の initiation に影響を与えないが, STAT3 経路を介して大腸腫瘍の progression を抑制する. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012, 9月.

4) 日暮琢磨, 遠藤宏樹, 酒井英嗣, 大久保秀則, 山田英司, 高橋宏和, 中島淳: 大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル: Cre/flox 動物モデルを用いた検討. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012, 9月.

5) Nakajima A: Colon epithelial

proliferation and carcinogenesis in diet induced obesity. The 3rd Asian-pacific topic conference, Tokyo, 2012, 11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

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 COX-2 発現誘導および下流で合成される PGE2 によるシグナルは、消化器がんの発生に重要である。COX-2/PGE2 経路の誘導と Wnt シグナル活性化の相互作用により胃がんを自然発生するマウスモデル、Gan マウスと、COX-2/PGE2 経路に起因した胃炎を発生する K19-C2mE マウスの組織を用いて、microRNA の網羅的な発現解析を行った。その結果、腫瘍組織で発現変化する microRNA の中で、21 個は炎症反応依存的に発現誘導され、29 個は炎症依存的に発現抑制されることが明らかとなった。発現抑制される microRNA の中で、miR-7 発現はヒト胃がんでも発現低下が認められ、miR-7 導入により胃がん細胞の腫瘍原性が抑制されたことから、その発現抑制が胃がん発生に作用したと考えられた。一方で、がん抑制性作用が報告されている miR-143/145 も炎症依存的に発現抑制されたが、腫瘍上皮細胞ではなく間質細胞での発現変化が認められた。今後、間質細胞における microRNA 発現変化による発がん促進機能について研究を進めるとともに、細胞成分を分離した網羅的 microRNA 発現解析の重要性が明らかとなった。

A. 研究目的

消化器がん発生過程では、腫瘍発生とともに間質に炎症性微小環境が構築され、さまざまなメカニズムにより腫瘍細胞の増殖や生存の亢進に關与している。環境因子に誘導されると考えられる COX-2/PGE2 経路は多くのがん組織で活性化されており、炎症性微小環形成に重要な役割を果たしている。COX-2 活性阻害は、実験動物における発がんを顕著に抑制したが、ヒトに対して心臓に対する副作用が認められたため、がんの化学予防薬と

しての開発は進んでいない。したがって、COX-2/PGE2 依存的に構築される炎症性微小環境による発がん促進機構の分子レベルでの解明が重要である。本研究では、COX-2/PGE2 経路依存的に胃がんを自然発生するマウスモデル (Gan マウス) を用いて、炎症反応依存的な遺伝子および microRNA の発現変化を網羅的に解析し、発がん促進に重要な分子を特定する。昨年度より、microRNA の発現変化に着目した解析を進めており、とくに炎症依存的に発現低下するがん抑制性 microRNA の特

定および腫瘍原性における役割と新規標的遺伝子の探索を行う。

B. 研究方法

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 (Gan マウス) と、COX-2/PGE2 依存的に胃炎を発生するマウス (K19-C2mE マウス) の胃がんおよび胃炎組織、そして野生型マウスの正常胃組織から RNA を調製し、マウス miRNA マイクロアレイ (Agilent) を用いて microRNA の網羅的発現解析を行った。胃がん、胃炎において野生型マウスに比較して 2 倍以上および 0.5 倍以下に変化する microRNA を抽出して解析を行った。動物実験は金沢大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

発現低下する microRNA から miR-7 と miR-143/145 を選択し、RT-PCR により各種組織における発現解析を行った。ヒト胃がん組織由来 RNA を用いた解析は、金沢大学倫理委員会の承認およびインフォームドコンセントを得て採取された組織から抽出された RNA 標本を用いて、金沢大学がん進展制御研究所源教授との共同研究により行った。また、miR-143/145 に関しては、レーザーマイクロダイセクションにより細胞成分特異的に RNA を調製して発現解析を実施した。

miR-7 導入による腫瘍原性試験は導入胃がん細胞株の軟寒天コロニー形成試験

にて実施した。新規標的遺伝子解析は、炎症反応依存的に発現誘導する遺伝子群の中から、miR-7 の標的配列を有する遺伝子を抽出し、ヒト胃がん細胞に miR-7 を導入して発現変化を解析することで特定した。

C. 研究結果

マイクロアレイ解析により Gan マウス胃がん組織では、50 個の microRNA が発現誘導され (>2.0 倍)、43 個が発現抑制されていた (<0.5 倍)。その中で、21 個および 29 個の microRNA は K19-C2mE マウスの胃炎組織でも同様の発現変化を示したことから、これらの変化は炎症反応依存的であると考えられた。miR21 と miR-155 は、すでにがん遺伝子としての機能が報告された microRNA だが、これらが炎症反応依存的に誘導されていることが、本研究により示された。また、miR-7、miR-143/145 (miR-143 と miR-145 は同一のプロモーターから転写される) はがん抑制性の機能が報告されているが、これらも炎症依存的に発現抑制されている可能性が示された。

本研究では発現抑制された microRNA について、がん抑制性機能についての解析を進めた。miR-7 は約 70% のヒト胃がん組織で発現抑制が認められており、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現と miR-7 発現のレベルは逆相関していた。したがって、炎症反応の強度に依存

的に発現抑制されていると考えられた。さらに、miR-7を株化胃癌細胞に導入すると軟寒天中のコロニー形成が抑制され、胃癌においてもmiR-7ががん抑制性に作用していると考えられた。

Ganマウス胃癌組織とK19-C2mEマウスの胃炎組織で共通に発現誘導している遺伝子群の中から、miR-7標的配列を持つ遺伝子をコンピューター解析により抽出し、miR-7を導入した胃癌細胞にて解析した結果、転写因子MafG発現が有意にmiR-7依存的に発現抑制され、新規miR-7遺伝子と考えられた。

一方、miR-143/145の発現をReal-time RT-PCR解析した結果、正常マウス胃組織に比較して、胃炎組織、胃癌組織での顕著な発現抑制が認められ、マイクロアレイの解析結果を確認した。さらに、共同研究により、異なる胃癌モデルであるgp130遺伝子変異マウス腫瘍組織を用いた解析実施した結果、Ganマウスと同様にmiR143/145の発現は顕著に低下していた。発現抑制の分子機序を明らかにするため、pri-miR143/145、pre-miR143/145に特異的なPCRプライマーを作製し、それぞれの発現をマウス胃および胃炎組織で解析したところ、pri-miR、pre-miRともに発現レベルが低下していた。したがって、がん組織においてはmicroRNAのプロセッシングの抑制ではなく、miR-143/145の転写が抑制されたために発現低下したことが明らかとなった。

胃癌細胞株を用いた発現解析でも発現レベルが低かった。一方で、レーザーマイクロダイセクションを使って、正常マウス胃上皮細胞、およびGanマウス胃腫瘍細胞だけを単離採取して、Real-time RT-PCRを行うと、miR-143/145の発現変化は認められなかった。さらに、平滑筋細胞を含む腫瘍組織間質細胞をレーザーマイクロダイセクションにより採取して発現解析した結果、正常組織、がん組織ともに上皮細胞に比較して10倍以上に高い発現を認め、miR-143/145の発現変化は腫瘍細胞ではなく、間質細胞における変化であると考えられた。現在、免疫染色等によりさらに細胞成分を区別した組織採取を行って、Real-time RT-PCRによる発現解析を進めている。

D. 考察

胃癌および胃炎マウスモデルを用いた発現解析により、腫瘍組織で発現変化するmicroRNAの中から、炎症依存的に変化するmiRNAを抽出することに成功した。がんに関連するmicroRNAについて多くの研究報告があるが、炎症性微小環境に依存した発現制御についての報告は少なく、本研究成果は当該研究領域に重要な情報を提供する。興味深いことに、がん遺伝子としての機能が報告されるmiR-21やmiR-155が炎症依存的に発現誘導されており、一方で、がん抑制性の機能が報告

されている miR-7 は炎症依存的に発現抑制されていた。炎症反応がどのようにして、microRNA の発現誘導と抑制を同時に誘導しているのかは今後の重要な研究課題である。

また本研究では、miR-7 についての詳細な解析を行ない、miR-7 が胃癌発生にも関与するがん抑制性 microRNA であることを証明した。新規 miR-7 標的として特定した MafG については、今後の解析により発がんへの関与を解析する。

本研究で着目した miR-143/145 は、すでにがん組織での発現抑制が報告されており、がん抑制性 microRNA の可能性が指摘されている。本研究では、がん組織において miR-143/145 発現が炎症反応依存的に抑制されることを明らかにしたが、想定されていたような腫瘍細胞での発現低下ではなかった。この結果は、これまでのがん細胞を対象とした miR-143/145 研究に注意を喚起するだけでなく、間質における microRNA 発現抑制が発がん促進に関与する可能性について、上皮-間質相互作用の観点からの研究が必要となる。同時に、上皮細胞、線維芽細胞、免疫細胞など、細胞成分を分けて採取した細胞群ごとの microRNA 発現解析をすることで、発がんに関与する microRNA の役割を空間的な相互作用の観点から解析する重要性があらためて認識された。

E. 結論

胃癌および胃炎モデルマウスの組織を用いて、microRNA 発現の網羅的解析を行なった。その結果、腫瘍組織で炎症反応依存的に発現誘導および発現抑制される microRNA を特定した。この中で、炎症により発現抑制される miR-7 は、ヒト胃癌組織でも発現低下しており、株化胃癌細胞の腫瘍原性を抑制することから、がん抑制性 microRNA と考えられた。一方で、炎症依存的に発現抑制される miR-143/145 は、腫瘍上皮細胞ではなく間質細胞で発現変化していることが明らかとなり、上皮-間質相互作用が関与する発がん促進機構の可能性が考えられた。また、同時に細胞成分特異的な microRNA 発現解析の重要性も示され、今後の課題となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kong D, Piao YS, 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*, 31: 3949-3960 (2012)
- 2) Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, McLeod L, McCormach W, Hughes N, Dev A, Sievert W, Ooi CH, Ishikawa TO, Oshima H, Bhathal PS, Parker A, Oshima M, Tan P, and Jenkins B. STAT3-driven

upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell*, 22: 466-478 (2012)

3) Oshima H and Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 47: 97-106 (2012)

4) Oshima H and Oshima M. The role of PGE2-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol*, 35: 139-150 (2013)

2. 学会発表

1) Oshima H, Ishikawa T, and Oshima M. The role of TNF- α in PGE2-induced tumorigenesis in gastric cancer mouse model. 第103回アメリカ癌学会学術総会, 米国・シカゴ (2012年4月)

2) 大島正伸 胃がんにおける炎症の誘導と活性化の役割 第49回日本臨床分子医学会学術総会、京都 (2012年4月)

3) Oshima M. Gastric cancer model by Wnt activation and inflammation. 第10回 Stem Cell Research Symposium、淡路島 (2012年6月)

4) Oshima M. SPEM and early changes in gastric cancer. 第5回シンガポール胃がんコンソーシアム学術総会 (SGCC)、シ

ンガポール (2012年7月)

5) Oshima M. Recent progress in tumor microenvironment. 第16回日本がん免疫学会総会、札幌 (2012年7月)

6) Oshima M. The role of inflammatory responses in gastric cancer development. 第71回日本癌学会学術総会 (JCA-Mauvernay 受賞講演)、札幌 (2012年9月)

7) Oshima M. Infection and inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. 第71回日本癌学会学術総会、札幌 (2012年9月)

8) Oshima M. Inflammatory responses that accelerate gastric tumorigenesis. 2012年韓国分子細胞生物学会学術総会、韓国・ソウル (2012年10月)

9) Oshima M. Prostaglandin E2-associated inflammation and bacterial infection in gastric tumorigenesis. 第3回発がんスパイラル国際シンポジウム・金沢がん生物国際シンポジウム、金沢 (2013年1月)

10) 大島 正伸 マウスモデルを用いた消化器がん発生における生体反応の研究 平成24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 (2013年2月)

11) Oshima M, Tomo-o Ishikawa, and Oshima H. The role of inflammatory responses in promotion of gastric tumorigenesis. 第2回 JSGE 国際トピッ