

## 大腸前癌病変を構成する細胞の起源に関する研究

研究分担者 久野壽也 岐阜大学大学院医学研究科腫瘍病理学 准教授

### 研究要旨

大腸上皮幹細胞である *Lgr5* 発現細胞の lineage tracing system を用いて、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスの大腸腫瘍において *Lgr5* 発現細胞が幹細胞として機能する可能性を探った。その結果、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスの大腸 microadenoma、macroscopic tumor において *Lgr5* 発現細胞が腫瘍組織の供給源となり幹細胞として機能する可能性が示唆された。また、azoxymethane 誘発マウス大腸腫瘍モデルを用いて二次胆汁酸の一つである deoxycholate 摂取による発癌促進リスクを評価し、distal colon において発癌プロモーション作用を示すことを明らかにした。

### A. 研究目的

化学発癌物質は体内に取り込まれた後、主に肝臓で代謝され、最終発癌物質となって標的臓器の遺伝子に修飾を加える。基底部に存在する大腸上皮幹細胞以外は transient な存在であることを考えると、遺伝子修飾の標的は組織幹細胞であると推察される。今回、*Lgr5* 発現細胞の lineage tracing system を *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスに導入して、*Lgr5* 発現細胞が大腸腫瘍の幹細胞として機能する可能性を探った。また、化学物質リスク研究の観点から、azoxymethane 誘発マウス大腸前癌病変に対し、二次胆汁酸である deoxycholate の修飾作用を検討した。

### B. 研究方法

(実験 1) *Lgr5-GFP-IRES-creERT2* knock-in; *Rosa26-LacZ* reporter mice と *Apc*<sup>Min/+</sup> mice を交配し、tamoxifen 投与により *Lgr5* 発現細胞に -galactosidase を発現する *Apc*<sup>Min/+</sup> mice を作製した。30 週齢時に 2 mg の tamoxifen を 3 日間腹腔内投与し *Lgr5* 発現細胞に標識を行った。Tamoxifen 投与終了から 1 週間後に犠牲死させ、大腸を摘出し、病理組織標本作製した。粘膜内病変に X-gal 染色、HE 染色を行い、染色性と染色パターンを評価した。

(実験 2) 8 週齢の雄性 C57BL6 マウスに対し azoxymethane (10 mg/kg 体重) を 1 回/週、4 週腹腔内投与し、終了 1 週間後からそれぞれ 0.04, 0.2, 0.5% の濃度で deoxycholate を混餌投与した。実験開始後 24 週で大腸を摘出し、en face に病理組織標本作成して網羅的に大腸前癌病変を評価した。また、deoxycholate 摂取により盲腸に腫瘍発生の報告があることから盲腸病変の病理標本作製し、ki-67, -catenin の免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

実験は実験動物を対象にしたものであり、動物の取り扱いに関しては生命倫理に配慮し、岐阜大学動物実験指針に沿って行った。また、レポーターマウスを用いた実験は岐阜大学組み換え DNA 実験委員会に申請承認後に行った。

### C. 研究結果

(実験 1) マウス大腸 microadenoma 及び macroscopic tumor の一部に *LacZ* 発現細胞の出現が見られた。*LacZ* 発現細胞はいずれの病変においても腫瘍全体を占めることはなく、巣状に出現していた。

(実験 2) 0.04, 0.2, 0.5% 摂取群の大腸あたりの microadenoma 数、adenocarcinoma 数はそれぞれ  $1.7 \pm 1.5$ ,  $0$ ;  $3.0 \pm 2.5$ ,  $0.2 \pm 0.4$ ;  $6.1 \pm 1.5$ ,  $0.9 \pm 1.1$  であり、AOM 単独群の  $0.7 \pm 0.7$ ,  $0$  と比較していずれも 0.5% 摂取群において有意に増加していた ( $p < 0.01$ ,  $0.05$ )。また、deoxycholate 摂取により、盲腸に隆起性病変の発生が見られたが、いずれの病変も表層部に ki-67 陽性細胞は見られず、-catenin の胞体内蓄積や核内移行もないことから腫瘍ではなく反応性病変であると考えられた。

### D. 考察

実験 1 の結果から、大腸 microadenoma の段階において、*Lgr5* 発現細胞が存在し、細胞の供給源として機能していることが明らかになった。今回の実験ではすべての腫瘍細胞が *LacZ* 陽性を示す病変は見られず、*Lgr5* 発現細胞に *Apc* の LOH が起こって腫瘍が形成されるとする直接の証左は得られなかった。

実験 2 の結果からは deoxycholate が大腸腫瘍性病変のプロモーターとして作用することが示された。また、盲腸病変に関しては、潰瘍を伴うことから再生腺管が不整形となり腫瘍様に見えるものの、ki-67, -catenin の染色態度からは大腸腫瘍とはいえず、反応性変化と考えられた。

### E. 結論

マウス大腸前癌病変及び大腸腫瘍中に幹細胞として機能する可能性がある細胞を確認した。また、実験期間 24 週で deoxycholate の混餌投与は AOM 誘発大腸前癌病変、大腸腺癌の発生を促進することが明らかとなった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A, Mori H, Terasaki M, Matsuda S, Tanaka T. Organo-magnesium suppress inflammation-associated

- colon carcinogenesis in male Crj:CD-1 mice. Carcinogenesis. 34:361-9. 2013
2. Binh NH, Satoh K, Kobayashi K, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Hara A. Galectin-3 in preneoplastic lesions of glioma. J Neurooncol. 111:123-32. 2013
3. Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. J Biophysical Chemistry. 3: 2012
4. Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T, Hara A, Hirose Y. Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. Carcinogenesis. 33: 702-707. 2012
5. Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M, Kuno T. Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of  $\beta$ -cryptoxanthin and hesperidin. J Biomed Biotechnol. 2012: 516981. 2012
6. Takamatsu M, Aoki H, Hirose Y, Kobayashi K, Tomita H, Kuno T, Koumura H, Hara A. Teratoma showing the features of retinal structure: A case of sacrococcygeal teratoma. Oncology Letters. 3: 1023-26. 2012

## 2. 学会発表

1. 4-nitroquinoline 1-oxide induced pulmonary tumorigenesis in TSOD mice. 久野壽也、田中卓二、廣瀬善信、原明；第28回毒性病理学会学術集会，平成24年2月，東京
2. Fenofibrateの4NQO誘発肥満、高脂血症マウス肺増殖性病変に及ぼす影響；久野壽也、田中卓二、廣瀬善信、平田暁大、原明；がん予防学会 in 岐阜 2012，平成24年6月，岐阜
3. A PPAR $\alpha$  agonist, fenofibrate suppress 4NQO-induced pulmonary proliferative lesions in obese and hyperlipidemic mice. Kuno T, Tanaka T, Takamatsu M, Hatano Y, Tomita H, Hirose Y, Hirata A, Hara A; 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 2012, Sapporo

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 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。