

に關係する経路としてPI3K経路に着目することとした。この経路はリン酸化により制御される分子が多いことから、同経路の蛋白およそ30種類について網羅的にWestern Blotを行い、上記6系統についてp-Aktの活性化レベルと発がん感受性が最も高く相関することを見いだした。発がん感受性が最も高かったBUF系統を用いて、高脂肪食およびPhIPの投与が大腸粘膜に与える影響を調べたところ、PhIPの投与によりAktの持続的活性化が誘導される一方で、高脂肪食がその活性化を抑制することを新たに見いだした。PhIPと高脂肪食はともにPARPとcaspase3のcleaved formの生成を抑制し、アポトーシスを阻害する作用があると考えられたが、cleaved formの生成のみを抑制する場合と遺伝子発現そのものを抑制している場合があった。すなわち、PhIPと高脂肪食はアポトーシス抑制に関して遺伝子ごとに異なる制御機構を有していることが明らかになった。さらに、PhIPによるAktの活性化はGSK-3 $\beta$ の不活性化を誘導しているにも関わらず、予想に反して $\beta$ カテニンの蓄積を誘導していないこと、また、高脂肪食は著明に $\beta$ カテニンの蓄積を誘導することを見いだした。

(2) 大腸異形成の簡易診断法の確立(ラット): ラットAOM誘発大腸発がん系において、通常のACF検出法に染色時間の延長と脱色過程の追加など若干の改変を加え、粘膜脱色後も濃染されているFociを検出した。Fociを構成するcryptの大きさと開口部の狭さを元に、濃染するcryptをc-type (大crypt大開口部), d-type (小crypt小開口部), cd-type (大crypt小開口部)の3種類に分類した。これらの鑑別は容易であり目視でも可能だったが、定量的な大きさの測定による分類結果とも完全に一致した。腺管の開口部の形状が圧排されているd-typeとcd-typeのcryptを有するFociをdysplasia-associated ACF (dACF) と再定義し、通常のACF (classical ACF=cACF) との関係を同じ標本で調べたところ、cACFは個体あた

り約200で、そのうち約100がdACFとしても検出された。dACFとして新たに検出されたFociも10程度あった。上述のcrypt分類を用いてdACFを整理し直すと、cACF<sup>-ve</sup>dACFはd-typeのみで構成され、cACF<sup>+ve</sup>dACFはcd+cが大多数だが、c+dやcd単独のものは少数例存在し、cd+dは全く認められなかった。また、各cryptをタイプ別に集計したところ、cd-typeについてはその数の大小に関わらずc-typeと共存していたのに対し、d-typeについては3個以上の場合にはd-type単独としてしか存在しなかった。これらの結果からcd-typeとd-typeは全く別の由来と性質を有しており、発がん過程で相互排他的に進展していくことが強く示唆された。cACF<sup>-ve</sup>dACFとcACF<sup>+ve</sup>dACFを組織学的に比較した場合、前者において、より高度な異形成、beta-cateninの蓄積やMucinの染色性の欠失の頻度が高かった。これらの結果より、cACF<sup>-ve</sup>dACFはcACF<sup>+ve</sup>dACFよりも進行した早期病変であることが示された。また、dACFの94%が組織学的に異形成と診断された。次に、3匹のAOM処理ラット大腸を用いて、同一病変に対する異なる染色を順次施行して比較したところ、MDFとflatACFはともにcACF<sup>-ve</sup>dACFのごく一部を形成することを見いだした。一方、組織学的に異形成と診断された病変が粘膜上ではどのように診断されていたかを調べたところ、90%の病変がdACFとして検出されるのに対し、MDFとflatACFは高度な異形成に限っても半分程度の検出率に留まっていた。

(3) ファーマコゲノミクスによる変異原物質の大腸発がん性予測(ラット): 変異原性を有するHeterocyclic amine (HCA) 6種類について、過去の長期間継続投与による評価では、PhIPを含めた3種類が大腸発がん性を有し、MeA $\alpha$ Cを含む3種類については非大腸発がん性とされてきた。今回新たに、HCA投与2週間、高脂肪食負荷4週後に大腸に誘導されたACF数を計測したところ、長期評価では発がん性な

しとされたMeIQxについてのみ大腸発がん性が示唆される結果を得た。

他の方法でも同様の結果が得られるか確認するために、ファーマコゲノミクス的手法でも検討を行った。F344ラットに3回経口投与後16時間で大腸腺管を採取してRNA抽出を行った。miRNAプロファイリングではクラスター解析でも主成分分析でも発がん性の有無に対応する2群に分かれたことから、miRNAが大腸発がん性に関与することが示唆された。2群に分類する上で貢献度の高い遺伝子をRandom Forest解析で絞り込み、これをMeIQxに適用したところ発がん性が示唆された。そこで、より発がん効率の高い高脂肪食下間欠投与方法を用いてMeIQxの長期発がん性を改めて評価し直したところ、大腸発がんが認められmiRNAプロファイリングに基づく発がん性予測が正しいことが確認された。qPCRにおいても、用いた遺伝子の内訳はマイクロアレイの場合とは若干異なるが、miRNA数遺伝子の発現signatureをもとに発がん性を正しく予測することが可能であり、化合物投与に対するmiRNA初期応答が長期的な発がん性と密接に関連することが確認された。

(4)細胞レベルでの大腸発がんモデルの確立(マウス):マウス正常腸管よりcryptを採取し、酵素処理によりsingle cellにした後にマトリゲルを用いた3次元初代培養を行った。継代の際にレンチウイルスを用いた遺伝子導入を効率よく95%程度の細胞に行う条件を確立し、大腸がん抑制遺伝子APCに対するshRNAを導入したところ、試した5種すべてのshRNAベクターにおいてorganoidの増殖がみられなくなった。一方、メカニズムは不明だが、これらのベクターを混ぜて一緒に導入したところ、再現性よくorganoidが増殖し、Apcも実際にノックダウンされていることが確認された。また、形態が風船状となったが、これはApc変異マウス腸管ポリープ由来細胞などWnt経路が活性化していることが強く示唆されるものの、偶発的に生じる場合が

あることを経験していたため、organoidをさらに詳細に解析した。組織解析ではbeta-cateninの蓄積、極性の消失、分化した細胞の脱落の消失などを認め、Wnt経路の標的遺伝子Axin2の発現上昇も確認されたことからWnt経路が確かに活性化していることが確認された。これらの細胞をヌードマウス皮下に移植したところ、約7割に腺管構造を有する腫瘍を形成した。Ki-67が70%程度と高く、beta-cateninの蓄積も顕著だったが、Goblet細胞やPaneth細胞への分化傾向も見られた。shAPCに加えてshPTENやshp53の同時導入、Kras活性化

(LSL-KrasG12Dマウス由来細胞へのCre遺伝子導入)などをshAPCと組み合わせた場合、shAPC単独導入に比べて腫瘍形成率は100%となり、腫瘍径も有意に増大した。shAPCなしではこれらのベクターは腫瘍形成を誘導しないことから、個体レベルでの解析同様、APC不活性化によりtumor initiationが完了し、他のがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化によりtumor progressionが達成されていると考えられた。実際、これらの結果は先行する遺伝子改変マウスを用いた解析とほぼ同様のものである。これらの腫瘍は再移植可能であり、組織型、大きさともに同様の腫瘍形成が再現されること、浮遊培養でのspheroid形成能の獲得やCD133/CD44など癌幹細胞マーカーの上昇なども確認され、in vitroにおいてtumor-initiating cellが誘導されていると考えられた。

#### D. 考察

肥満は大腸がんのリスク因子だが、両者の関係は発がんイニシエーション成立後における肥満による発がん進展の促進作用として従来捉えられてきた。これに対し、本研究では食餌由来変異原物質PhIPによる大腸発がん感受性と、脂肪蓄積による肥満傾向が共通の遺伝的基盤を持つことを示した。さらに、大腸粘膜におけるAktの活性化レベルがその指標になり得ること、PhIPの投与によりAktの持続的

活性化が誘導される一方で、高脂肪食がその活性化を抑制することを新たに見いだした。PhIPと高脂肪食はともにPARPとcaspase3のcleaved formの生成を抑制し、アポトーシスを阻害する作用があると考えられたが、cleaved formの生成のみを抑制する場合と遺伝子発現そのものを抑制している場合があり、遺伝子によって異なる機構により制御を受けていることを明らかにした。さらに、PhIPによるAktの活性化はGSK-3 $\beta$ の不活性化を誘導しているにも関わらず、予想に反して $\beta$ カテニンの蓄積を誘導していないこと、また、高脂肪食は著明に $\beta$ カテニンの蓄積を誘導することを見いだした。これらの興味深い観察はこれまで未報告であり、またその分子機構も全く未解明であることから、本研究で得られた知見を元に解析を継続することで、今後大腸発がん和肥満の関連に関して新たな一面が明らかになる可能性がある。

過去の大腸化学発がん研究においては、マーカーとしての利便性から初期病変である Aberrant Crypt Foci (ACF) の数を長期発がん性の指標とすることが一般的だったが、dysplasia を伴わない多くの ACF はがん化しないため ACF 数を発がん性の予測に用いることの正当性を疑問視する声も根強かった。一方で、dysplasia の診断には煩雑な組織切片の作成が必須であり、また ACF 以外の進行した前がん病変は数が極端に少ないことから、いまだに両者ともその使用が一般的ではない。今回 ACF 染色後に脱色過程を追加し、さらに crypt の開口部の形状が狭小化しているもののみを抽出することで、組織学的検査を行わなくても dysplasia が簡便かつ実質的に検出可能 (特異性 94%、感受性 90%) であることを示し、数も充分あることからマーカーとして実用性が高いと考えられた。我々は本病変を dysplasia-associated ACF (dACF) と命名し、今後この領域における世界標準とすべくマウスやヒトでの類似病変の確認を現在進めている。dACF は真の前がん病変としての意義を有しながら、実用的には

ACF と同等の発がん性の早期マーカーとしても有用であることから、大腸発がん初期病変として今後 ACF に代わる標準となる可能性を有すると考えられた。

miRNA は近年発がんへの関与やがんの診断マーカーとして注目を集めているが、本研究では、化合物の大腸発がん性予測に投与後早期に誘導される miRNA プロファイルが有用であることを示し、miRNA が発がん過程の最も早期の段階にも関与している可能性を強く示唆した。変異原物質の発がん性は臓器毎に大きく異なることが知られているが、miRNA も臓器特異性が高い発現パターンを示すことから、該当臓器を用いて解析することで有意な結果が得られた可能性がある。また、本研究で得られた結果をもとにすると、大腸発がん性が未知の新規の化合物についても短期間の実験で長期発がん性を予測することが可能となると考えられ、環境因子のリスク評価の観点からも有用性が高いと考えられる。

大腸発がん分子機構としては「多段階発がんモデル」が広く受け入れられており、大腸粘膜での遺伝子異常の蓄積が発がん過程を段階的に進展させていくと考えられている。一方、間質細胞や炎症・肥満などの環境要因も、個体レベルでの発がん過程の進展に多大な影響を及ぼすことが知られているが、発がんに不可欠かどうかは検証する手法がなかったこともあり、これまで不明だった。今回マウス腸管 3 次元初代培養細胞に対する高効率の遺伝子導入法を確立し、全くの正常上皮細胞 (C57BL6/J 由来) のみからでも APC 遺伝子のノックダウンだけで 70% の頻度で腺管構造を有する腫瘍が誘導されることを確認した。また、他の遺伝子異常の追加により腫瘍形成率が 100% になり、腫瘍径の増大や組織型の悪性化が見られるなど、遺伝子改変動物における個体レベルの解析と同様な結果が得られ、発がん過程の段階的な進展が再現可能であることを示した。腸管の微少環境に非依存的条件下においても大腸発がん過程を簡便に再現可能な細胞レベルの大腸

発がんモデルになると考えられた。

#### E. 結論

ラット大腸発がんモデルを用いて、遺伝要因と環境要因の相互作用に影響を与える遺伝要因が存在することを明らかにした。また、早期病変の新規かつ簡便な同定法や化学物質の大腸発がん性予測法を確立した。マウス細胞レベル大腸発がんモデルを確立し、個体レベルの発がんモデルを補完・代替する新規手法として有用と考えられた。これらの知見や手法を用いて統合的に発がん過程を解析することで、その分子機構の詳細を解明する過程が加速することが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ochiai M, Hippo Y\*, Izumiya M, Watanabe M, Nakagama H. Newly Defined Aberrant Crypt Foci as a Marker for Dysplasia in the Rat Colon. *Cancer Sci.* in press (\* corresponding author)
- 2) Igarashi M, Hippo Y\*, Ochiai M, Fukuda H, Nakagama H. AKT is critically involved in cooperation between obesity and the dietary carcinogen amino-1-methyl-6-phenylimidazo, [4,5-*b*] (PhIP) toward colon carcinogenesis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 443(3):852-7. 2014 (\* corresponding author)
- 3) Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, Hippo Y. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(27):11127-32. 2013
- 4) Fujimori H, Mukai H, Murakami Y, Hemberger M, Hippo Y, Masutani M. The

H19 induction triggers trophoblast lineage commitment in mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 436(2):313-8. 2013

##### 2. 学会発表

- 1) Kaoru Orihashi, Kunishige Onuma, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi Nakagama and Yoshitaka Hippo. STAT3 Activation Underlies Transformation of Primary Intestinal Epithelial Cells by APC Suppression. 第72回日本癌学会総会(横浜)2013年10月
- 2) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi Nakagama and Yoshitaka Hippo. Genetic Reconstitution of Kras-driven Tumorigenesis in Primary Pancreatic Ductal Cells and Cholangiocytes. 第72回日本癌学会総会(横浜)2013年10月
- 3) Masako Ochiai, Masatoshi Watanabe, Hitoshi Nakagama and Yoshitaka Hippo. Aberrant Crypt Foci-based Seamless Grading of the Early Lesions in Rat Colon Carcinogenesis. 第72回日本癌学会総会(横浜)2013年10月(口演)
- 4) Yoshitaka Hippo, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Toshio Imai, and Hitoshi Nakagama. Lentivirus-based Generation of Adenocarcinoma from Primary Murine Lung Cells. 第72回日本癌学会総会(横浜)2013年10月(口演)

#### 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

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 DNA損傷修復応答、クロマチン、エピジェネティック制御に関わる因子の異常からがん化に至る過程を幹細胞を中心とした実験系で明らかにするとともに翻訳後修飾反応のポリADP-リボシル化を標的とするPARP阻害剤の早期からの制がんへの応用法を検討する。実験系として三次元培養が可能な、spheroid形成能を有するマウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株や幹細胞形質を有する細胞培養系を用いた。がん幹細胞集団はspheroid形成条件下では薬剤やガンマ線に抵抗性を示すが、PARP阻害剤の併用はDNA修復とエピジェネティック制御阻害という複数の機構から増感効果を示し、有効である可能性が示唆された。マウスES細胞の子宮移植系での胚細胞腫瘍発生系において、PARP機能阻害は腫瘍の転移や浸潤性に関わりうるtrophoblast系譜への分化の亢進を起こした。これはDNMT3等の発現低下を伴うエピジェネティック制御の異常により惹起されていることが示唆された。

A. 研究目的

がんの本態解明から制がんへの応用を見据えた研究の展開に対する必要とされている。本研究においては昨年度に引き続き、DNA 損傷修復応答、クロマチン、エピジェネティック制御に関わる因子の異常からがん化に至る過程を幹細胞を中心とした実験系で明らかにするとともに翻訳後修飾反応のポリADP-リボシル化を標的とするPARP阻害剤の早期からの制がんへの応用法を検討する。実験系として三次元培養が可能な、spheroid形成能を有するマウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株(Onuma et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013)や幹細胞形質を有する細胞培養系を用いる。がん化に至る過程の解析を踏まえて臨床試験が行われつつあるPARP阻害剤による早期からの制がんへの応用法を検討する。

B. 研究方法

1) APC、PTEN遺伝子を不活化したマウス腸管等の幹細胞由来の腫瘍細胞などの実験系で

ゲノム不安定性を検討し、抗がん剤作用評価系でPARP阻害剤や他のDNAを標的とする抗がん剤に対する感受性を比較し、感受性を規定する機構を検討する。

2) 幹細胞形質を有する細胞株の移植実験系においてPARP機能阻害によるがん化への影響を検討する。

(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) マウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株におけるDNA損傷応答能と薬剤感受性

Spheroid形成能を有するマウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株におけるDNA損傷修復応答能を検討した。APC、PTEN遺伝子が不活化された複数株を検討した中で、ゲノム不安定性度が高いと考えられる無処理状態で二本鎖DNA切断マーカである

るgH2AX レベルの高い細胞株と低い株の二株を主に解析に用いた。

Spheroid形成条件下ではγ線やシスプラチン、PARP阻害剤AZD2281単剤に対する感受性は極めて低く、薬剤やγ線に抵抗性の環境が形成されていた。一方、γ線に対してPARP阻害剤は二株とも低濃度から増感効果を示した。がん細胞株を用いた実験から、PARP阻害剤はDNA修復の阻害と共にエピジェネティック制御に関与し、DNMT3bの発現抑制を介して、γ線照射後のDNA損傷応答能を低下させる機序が考えられた。マウス腸管幹細胞においてガンマ線照射後、DNMT3bの発現誘導が観察されたが、PARP阻害剤処理により、この誘導レベルが低下傾向を示した。このことが、PARP阻害剤による放射線増感に関与する可能性が示唆された。

ヒト肺がん細胞株A549においてPARP阻害剤処理によりDNA methyltransferase 3b (DNMT3b)のプロモーターに対しpoly(ADP-ribose)の集積が抑制されることがDNMT3bの発現低下を誘導することが示唆された。A549においてDNMT3bの発現低下はプロモーターがメチル化されていたがん抑制遺伝子FHIT遺伝子の発現回復を惹起し、増殖が抑制された。

2) マウスES細胞の胚細胞腫瘍発生系の解析 マウスES細胞の子宮移植系での胚細胞腫瘍発生系において、PARP機能阻害は腫瘍の浸潤性に関わりうるtrophoblast系譜への分化の亢進を起こした。これはDNMT3等の発現低下を伴うエピジェネティック制御の異常により惹起されていることが示唆された。

#### D. 考察

##### 1) マウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株におけるDNA損傷応答能と薬剤感受性

今回用いたAPC, PTEN遺伝子が不活化された複数株の中で、ゲノム不安定性度が高いと考えられる無処理状態で二本鎖DNA切断マーカーであるγH2AX レベルの高い細胞株と低い株の二株を主に解析に用いた。今後、異なる遺伝子変異や経路異常を有する株でも抗がん剤やガンマ線照射に対する感受性を検討する必要がある。がん幹細胞マーカー陽性のがんでは抗がん剤や放射線に対する感受性が低下していることが報告されている。本研究より、このような

がん細胞に対してPARP阻害剤と放射線の併用が有効であることが示唆された。PARP阻害剤はDNA切断修復の阻害が主な機構と報告されているが、がんで発現の亢進が報告されているDNMT3bなどのエピジェネティック制御異常を作用点としうることを示された。

2) マウスES細胞の胚細胞腫瘍発生系の解析 PARPの機能阻害は胚細胞腫瘍形成過程でエピジェネティック制御の異常を誘発することでtrophoblast系譜を誘導するが、生じたtrophoblast系譜細胞が間接的に転移や浸潤性に貢献しうるが見いだされた。従って、胚細胞腫瘍に対してPARP阻害剤を制がん目的で使用することはtrophoblast系譜の誘導を起こす可能性があり、今後も慎重に検討する必要がある。

#### E. 結論

がん幹細胞集団はspheroid形成条件下では薬剤やガンマ線に抵抗性を示すが、PARP阻害剤はDNA修復とエピジェネティック制御阻害という複数の機構から放射線増感効果を示し、有効である可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fujimori H, Mukai H, Murakami Y, Hemberger M, Hippo Y, Masutani M. The *H19* induction triggers trophoblast lineage commitment in mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(2):313-8.
2. Nozaki T, Fujimori H, Wang J, Suzuki H, Imai H, Watanabe M, Ohura K, Masutani M. Parp-1 deficiency in ES cells promotes invasive and metastatic lesions accompanying induction of trophoblast giant cells during tumorigenesis in uterine environment. *Pathol Int*, 2013, 63(8):408-14.
3. Masutani M, Fujimori H. Poly(ADP-ribosylation) in carcinogenesis. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(6):1202-16.

##### 2. 学会発表

1. 藤森浩彰、向井大晃、村上康文、益

谷美都子 PARP 阻害剤処理は Dnmt3a/b の発現低下を誘導し、DNA メチル化や遺伝子発現パターン形成を変化させる。第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013 年 10 月) (E-3010, プログラム号, (巻号なし) p228, 2013)

2. 藤森浩彰、向井大晃、益谷美都子 PARP-1 は DNMT3 の発現を維持する新規調節因子である。第 28 回発がん病理研究会、那覇市 (2013 年 8 月) ((巻号なし), 2013)

3. 益谷美都子、平井 崇久、藤森浩彰、斎藤総一郎、西尾禎二、岡安 隆一、藤森亮、笹井 啓資 PARP 阻害剤による生物学的放射線増感作用 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013 年 10 月) (S22-5, プログラム号, (巻号なし) p73, 2013)

4. Junhui Wang, Akira Motegi, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki, Mitsuko Masutani Parp-1 suppresses the end-resection of blocked termini of double strand DNA breaks and protects

from deletion mutation. The 22nd Asia Pacific Cancer Conference, Tianjin, China (Oct., 2013)

( vol. 10 Suppl.1, p60, November 2013)

5. Hiroaki Fujimori, Hideki Ogino, Hiroaki Mukai, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani Parp-1 has a novel role as Dnmt3 regulator and PARP inhibitor acts as a epigenetic drug recovering silenced expression of tumor-suppressor genes. PARP2013, Quebec city (Sep., 2013) (プログラム, (巻号なし) p93, 2013)

#### 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

ラット ES 細胞の樹立およびノックアウトラットの作製

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発がんモデルラットの作製を行うため、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4種類の分化阻害剤 (YPAC) を用いた安定的培養法の確立によりジーンターゲティングによる相同組み換えおよびキメララットを介して p53 遺伝子ノックアウト (KO) ラットの作製に成功した。マウスとは異なるがん種の発生以外に、KO 雌ラットが致死性を示すなど、ラット特有の表現型が認められた。発生した腫瘍から YPAC により性質を維持した細胞株の樹立に成功した。ラット個体と YPAC による培養法を用いることで、新たな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つの分化阻害剤 (YPAC) により ES 細胞の樹立をめざし、次に p53 遺伝子 KO ラットの作製を試み、マウスの場合と異なるがんの発生に対する影響および、ラットで発生した腫瘍から細胞を培養し、YPAC による影響を検討する。

B. 研究方法

Zinc Finger Nuclease (ZFN) 法により p53 遺伝子をホモ欠損 ES を作成し、野生型受精卵に移植しキメラを作成し、組織別の影響を解析する。p53 遺伝子 KO ラットにおいて自然発症した腫瘍組織の一部を培養条件に移し、ES 細胞の樹立に用いた YPAC の添加により、腫瘍細胞の株化、免疫不全マウスを用いた造腫瘍性、分化マーカーを用いた元の腫瘍細胞の性質の維持が可能かを検討する。動物の操作は、すべて国立がんセンター研究所動物倫理委員会の定める規則に基づいて行う。

C. 研究結果

p53 遺伝子 KO ラットのホモ欠損個体の雌は胎生致死であったので、ZFN 法により

ES 細胞の時点で p53 遺伝子をホモ欠損させ野生型受精卵に移植しキメラを作成すると、胎生致死となりホモ欠損 ES 細胞由来の組織は染色体不安定性を示し発生へ影響することが示唆された。p53 遺伝子 KO ラットのオスでは、精巣がん、骨肉腫が発生し、細胞株の樹立を試みたところ、YPAC の存在下のみ樹立に成功し、骨肉腫はヌードマウスに同所性に移植した際、肺へ転移を示した。また、p53 遺伝子 KO メスラットでは乳がんが発生し、がん組織から樹立した細胞株は、YPAC の添加により扁平上皮や脂腺への化生を示し、YPAC を用いることで、がん組織から元の性質を維持したまま株化できる可能性が示唆された。

D. 考察

p53 遺伝子ホモ欠損 ES 細胞を野生型受精卵に移植し作成したキメラにおいても、胎生致死となりホモ欠損 ES 細胞由来の組織は染色体不安定性を示したことから、p53 が発生時には全ての組織で重要であり、死産の要因になりうることを示唆された。また、ZFN 法によって、ヘテロ同士の掛け合わせによらないホモ個体の作出が可能となり、キメラであるため、組織ごとの標的遺伝子の影響が検討可能なことが確認された。p53KO 遺伝子ラットは効率にがんを発症し、YPAC を用いることで元のがん細胞の性質を維持したまま培養が可能であることが示唆された。YPAC は



ROCK、MEK、TgF-beta、GSK に対する 4 種類  
の阻害剤であり、これらの因子が幹細胞  
性のみならず、がん細胞の性質の維持に  
関与することが示唆された。

#### E. 結論

YPAC を用いたラット ES 細胞の樹立およ  
び ZFN 法の応用は、マウスとは異なる表  
現型を示すラットにおける遺伝子の機能  
解析に強力なツールとなることが示唆さ  
れた。また、p53 遺伝子 KO ラットは環  
境中の発生、発がん性への影響を及ぼす物  
質に対する感受性が亢進していると予想  
され、スクリーニングへの応用が期待さ  
れる。また、p53 遺伝子 KO ラットで自然  
発症したがんから、YPAC による細胞の株  
化が可能になったことから、がん患者か  
ら摘出したがん組織由来の、元の性質を  
保持した細胞株の樹立に応用できると予  
想される。これらの癌細胞株の樹立は、  
より多様ながん細胞を使用しての抗癌剤  
のスクリーニングや、がん細胞の増殖・  
分化、さらにはがん幹細胞の維持などの  
機序解明に貢献することが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujita, Y., Takeshita, F., Mizutani, T., Ohgi, T., Kuwano, K., Ochiya, T. A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer. *Sci. Rep.*, 3: 3325 (2013).
- 2) Takahashi, RU., Takeshita, F., Honma, K., Ono, M., Kato, K., Ochiya, T. Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3  $\beta$ . *Sci. Rep.*, 3: 2474 (2013).
- 3) Uchino, K., Ochiya, T., Takeshita, F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 43: 596-607 (2013).

- 4) Katsuda, T., Kosaka, N., Takeshita, F., Ochiya, T. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13: 1637-1653 (2013).
- 5) Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Ochiya, T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem.*, 288:10849-10859 (2013).
- 6) 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).

#### 2. 学会発表

- 1) 竹下文隆、落谷孝広 miRNA とエクソソームのがん診断への応用 第 34 回日本臨床薬理学会学術総会、東京 (2013 年 12 月)
- 2) Takeshita, F., Ono, M., Takahashi, RU., Tsuda, H., Ochiya, T. Identification of Long Non-Coding RNAs Associated with Recurrence of Breast Cancer 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013 年 10 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

大腸腫瘍の化学予防

分担研究者 中島 淳  
横浜市立大学 肝胆膵消化器病学 教授

研究要旨 大腸癌の罹患率/死亡率は世界で上昇しており有効な予防対策が急務である。近年イワシなどの青魚に多く含まれる $\omega$ 3系不飽和脂肪酸( $\omega$ 3PUFA)によりヒト大腸ポリープが縮小した報告や動物モデルでの抗大腸腫瘍作用の報告が散見されるが、その機序は明らかでなく、化学予防薬としては確立していない。近年 $\omega$ 3PUFAの受容体としてG蛋白共役受容体120(GPR120)が発見され注目されているが消化器領域における役割は不明である。本研究では大腸癌化学予防について $\omega$ 3PUFAのひとつであるエイコサペンタエン酸(EPA)とGPR120欠損マウスを用いてEPAによる化学予防の機序解明を目指す。またEPAの大腸腫瘍化学予防効果をヒトで検証する臨床試験を実施し、化学予防方法の確立を目指すものである。

A. 研究目的

大腸癌は定期健診や内視鏡検査の普及により早期発見の機会も増えているが死亡率は依然として高く、対策が必要である。現在欧米を中心に、経口薬を内服することで癌を積極的に予防しようとする試みが行われており、化学予防と呼ばれている。エイコサペンタエン酸(EPA)は、近年家族性腺腫症患者の大腸腺腫を減少・縮小させたという報告(1)やマウス大腸腫瘍モデルにおいても腫瘍を抑制したという報告があり(2)、大腸腫瘍の化学予防薬としての可能性を有しているといえる。近年EPAを含む $\omega$ 3系不飽和脂肪酸の受容体としてG蛋白共役受容体120(GPR120)が発見され注目されている。我々はこのEPA/GPR120経路に注目し、EPAの大腸腫瘍化学予防効果をGPR120欠損マウスを用いて明らかにする。またヒトにおいてはEPAを用いた化学予防効果を、大腸腫瘍治療後の患者を対象に実施する。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたり、横浜市立大学倫理委員会の承認を得ている。具体的な対応は1) 本試験はヘルシンキ宣言及び本病院倫理委員会の趣旨に基づいて実施する、2) 被験者へのインフォームド・コンセント、3) 被験者のプライバシーの保護のほか、外来受診の間診時に試験への参加と問診

票の記入等につき同意を得たのち、予期される効果および危険性、当該疾患に対する他の治療法の有無およびその内容、試験参加に同意しない場合でも不利益を受けないこと、試験参加に同意した場合でも随時これを撤回できることを説明する。投与薬剤や内視鏡検査にかかわる危険性の回避は日常診療における手順に従う。

C. 研究結果

これまで我々はAMPK活性化薬であるメトホルミンを用いてマウス大腸発がんモデルに対する抗腫瘍効果・メカニズムを解明し報告してきた。今年度はこれらの知見をもとにヒトを対象とした大腸腺腫切除後の再発抑制効果を検証する臨床試験を実施した。現在目標である150例の組み入れを終了しフォローアップ中である。結果はH26年9月以降に報告する予定である。

一方、多価不飽和脂肪酸のひとつであるエイコサペンタエン酸(EPA)は、マウス発癌モデルにおいて抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、ヒトにおける効果はいまだ不明な点が多い。今回、我々はヒト散発性腫瘍の代替指標であるAberrant Crypt Foci (ACF)をエンドポイントとした臨床試験を実施した。大腸腺腫切除予定の30名を対象に下部消化管内視鏡検査でACFを測定した。その後EPA群、プラセボ群に無作為割り付けを行い、EPA群はEPA2.7gを、プラセボ群はオレイン酸2.7gを毎日

内服し、1 か月後に ACF 数を再検した。1 か月間の EPA 投与で ACF 数は有意に低下し、散発性大腸腫瘍の化学予防に十分臨床応用可能と思われた。

#### D. 考察

EPA の抗大腸腫瘍効果の機序は不明な点が多いが、G 蛋白共役受容体 120 (GPR120) を介したシグナル経路が大腸腫瘍抑制に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。今後 GPR120 欠損マウスを用いた発癌実験により、効果判定および作用機序解明を行う予定である。EPA は脂質異常症治療薬として臨床応用されており、安全性が確立しているため、大腸腫瘍抑制への適応拡大が十分見込まれる。

#### E. 結論

1 か月間の EPA 投与で ACF 数は有意に低下し、散発性大腸腫瘍の化学予防に十分臨床応用可能と思われた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nonaka T, Sekino Y, Iida H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Higurashi T, Hosono K, Endo H, Koide T, Takahashi H, Fujita K, Yoneda M, Goto A, Kusakabe A, Kobayashi N, Gotoh E, Maeda S, Nakajima A, Nosaka C, Inamori M. Early Effect of Single-dose Sitagliptin Administration on Gastric Emptying: Crossover Study Using the (13)C Breath Test. *J Neurogastroenterol Motil.* 2013 Apr;19(2):227-32.

Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A, Hotta K. NUDT3 rs206936 is associated with body mass index in obese Japanese women. *Endocr*

*J.* 2013;60(8):991-1000.

Kurita Y, Koide T, Watanabe S, Ogawa T, Sekino Y, Iida H, Nonaka T, Kusakabe A, Gotoh E, Maeda S, Nakajima A, Inamori M. Postpyloric decompression tube placement through a gastrostomy for malignant bowel obstruction. *BMC Res Notes.* 2013 Jun 3;6:217.

Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Shinohara Y, Kato S, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Maeda S, Saito S, Wada K, Nakajima A. Soluble CD14 Levels Reflect Liver Inflammation in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One.* 2013 Jun 7;8(6):e65211.

Ezuka A, Kawana K, Nagase H, Takahashi H, Nakajima A. Improvement of pneumatosis cystoides intestinalis after steroid tapering in a patient with bronchial asthma: a case report. *J Med Case Rep.* 2013 Jun 26;7(1):163.

Iida H, Ohkubo H, Inamori M, Nakajima A, Sato H. Epidemiology and clinical experience of chronic intestinal pseudo-obstruction in Japan: a nationwide epidemiologic survey. *J Epidemiol.* 2013;23(4):288-94.

Kato S, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Kubota K, Kobayashi N, Hosono K, Watanabe S, Sekino Y, Sato T, Sasaki K, Nakaigawa N, Kubota Y, Inayama Y, Endo I, Ohno S, Maeda S, Nakajima A. aPKC $\lambda/\iota$  is a beneficial prognostic marker for pancreatic neoplasms. *Pancreatology.* 2013 Jul-Aug;13(4):360-8.

Watanabe S, Sato T, Kato S, Hosono K, Kobayashi N, Nakajima A, Kubota K. Positioning of nasobiliary tube using magnet-loaded catheters. *Endoscopy.* 2013;45(10):835-7.

Tomeno W, Yoneda M, Imajo K, Ogawa Y, Kessoku T, Saito S, Eguchi Y, Nakajima A. Emerging drugs for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2013;18(3):279-90

Hirata K, Wada K, Murata Y, Nakajima A, Yamashiro T, Kamisaki Y. Critical role of leukotriene B4 receptor signaling in mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Lipids Health Dis*. 2013;12(1):122.

Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Imajo K, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Kanemasa K, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2013 Aug 22

## 2. 学会発表

藤井徹朗, 高橋宏和, 山田英司, 大久保秀則, 日暮琢磨, 酒井英嗣, 遠藤宏樹, 中島淳: 大腸ポリープの再発における生活習慣関連リスク因子の検討. 第3回肥満と消化器疾患研究会 一般演題 (1), 鹿児島, 2013, 3.

日暮琢磨, 中島淳 拡大内視鏡による ACF 観察と AMPK/mTOR pathway に注目した大腸腫瘍化学予防 第85回日本消化器内視鏡学会総会 パネルディスカッション 1 (内視鏡を用いた分子病理学的診断) 5月10日

Takuma Higurashi, Kunihiro Hosono, Eiji Yamada, Hidenori Ohkubo, Eiji Sakai, Hiroshi Iida, Hiroki Endo, Hirokazu Takahashi, Atsushi Nakajima. Low Dose Metformin Suppress Colorectal ACF and Normal Mucosal Proliferation by Activate AMPK, but Little Effect

Adenoma and CIS. DDW AGA Poster Session Basic May 18, 2013 Orlando, FL

日暮 琢磨、遠藤 宏樹、中島 淳 レプチンは腫瘍に発現するレセプターを介して大腸腫瘍の増殖を促進する 2013年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2013) シンポジウム 5 (消化吸収学会・消化器病学会・肝臓学会合同) 消化器疾患と栄養代謝ネットワーク-基礎から臨床まで-平成25年10月9日 東京

日暮 琢磨、中島 淳 エイコサペントエン酸 (EPA) は大腸上皮の増殖を抑制し ACF を減少させる: 二重盲検無作為対照試験 2013年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2013) パネルディスカッション3 (消化吸収学会・消化器病学会合同) 機能性食品や補助食品の消化器疾患における役割 平成25年10月9日 東京

Higurashi T, Uchiyama S, Yamada E, Sakai E, Ohkubo H, Endo H, Takahashi H, Nakajima A: Eicosa-pentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. 21<sup>st</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW), poster sessions, Berlin, 2013. 10.

Sakai E, Uchiyama S, Yamada E, Higurashi T, Ohkubo H, Endo H, Takahashi H, Nakajima A, Matsushashi N, Kaneda A: The characteristics of genetic and epigenetic alterations in laterally spreading colorectal tumors. 21<sup>st</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW), poster sessions, Berlin, 2013. 10.

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明

分担研究者 大島 正伸  
金沢大学がん進展制御研究所 教授

研究要旨 慢性炎症反応は発がん促進に作用すると考えられているが、その分子機構は未だ不明である。COX-2/PGE<sub>2</sub>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 Gan マウスの腫瘍組織から腫瘍上皮細胞を単離して採取し、microRNA の網羅的発現解析を行ない、先に実施した胃炎組織を用いた結果との比較解析を実施した結果、炎症反応依存的に腫瘍細胞内で発現誘導する microRNA 18 個を特定した。これまでに発がん促進作用が知られている miR-155 や miR-21 も含まれており、これらの microRNA は炎症性微小環境依存的に発現誘導する可能性が考えられた。また、最も強い発現誘導を示した miR-135b はヒト胃がん組織でも高く発現誘導していた。さらに胃がん細胞における発現誘導実験および発現阻害実験は、それぞれ増殖や遊走、および腫瘍原性の亢進と抑制に作用した。以上の結果により、炎症依存的に誘導される miR-135b には胃がん発生促進作用があり、将来的にその発現制御による胃がん発生の予防または治療効果が期待された。

A. 研究目的

マクロファージ浸潤とその活性化を中心とする慢性炎症反応は、がんの微小環境を形成し、発がん促進に重要と考えられている。消化器がんにおいては、COX-2 発現誘導とそれによる PGE<sub>2</sub> 合成が、発がん重要な炎症性微小環境形成に関与する事が明らかにされているが、その分子機構は未だ不明な点が多い。本研究では、COX-2/PGE<sub>2</sub> 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、炎症性微小環境の影響によりがん細胞で発現変化する microRNA を特定し、胃がん発生を促進する候補 microRNA の機能解析を行う。microRNA は、特定の標的遺伝子の発現を制御することで、発がん促進と発がん抑制の双方に作用する事が知られているが、微小環境による発現制御については、未だ不明な点が多い。これまでに、胃がん発生を抑制する miR-7 を同定したが、本研究では発がん促進に作用する、新規 microRNA の特定と機能解析を目的とする。

B. 研究方法

Wnt シグナル活性化と COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路誘導依存的な炎症反応の相互作用により胃がんを発生する Gan マウスの胃がん組織と、野生型マウスの正常胃粘膜組織それぞれから凍結切片を作成し、レーザーマイクロダイセクションにより上皮細胞だけを採取して、microRNA のマイクロアレイ解析を行った。この方法により、以前より問題となった微小環境に浸潤する炎症細胞で発現変化する microRNA の影響を除外した。得られた結果を、先に実施した COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路依存的に胃炎を発生する K19-C2mE マウスの胃炎組織と、野生型マウスの正常胃粘膜組織を用いた microRNA のマイクロアレイ解析結果と比較解析し、炎症反応依存的に腫瘍細胞で発現変化する microRNA を特定した。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。

得られた結果を、公表されているヒト胃がん組織における microRNA 発現解析結果と比較して、共通して発現誘導する microRNA を特定した。発現誘導する microRNA 群の中から miR-135b を選択し、RT-PCR によりマウス腫瘍組織における発

現解析を real-time RT-PCR によって行った。miR-135b 発現誘導および miR-135b 発現阻害実験を胃癌細胞を用いて行い、細胞増殖率、細胞遊走、および軟寒天コロニー形成試験による腫瘍原性への影響を解析した。

### C. 研究結果

Gan マウス胃癌組織、K19-C2mE マウス胃炎組織、および野生型マウス正常粘膜組織を用いた microRNA のマイクロアレイ解析では、miR-143、miR-145 の強い発現抑制が認められたが、この発現変化は、腫瘍上皮細胞だけでなく粘膜下組織の混入による影響であることがこれまでの解析で判明した。そこで、本研究においては、Gan マウス胃癌組織と野生型マウス正常胃粘膜組織の未固定凍結切片を作成し、レーザーマイクロダイセクションシステムにより、腫瘍上皮細胞および正常上皮細胞を採取して、それらの組織を用いたマイクロアレイ解析を新たに実施した。その結果、腫瘍上皮細胞で 3 倍以上に発現上昇する microRNA 57 個、および 3 倍以下に発現低下する microRNA 40 個を抽出した。これらの microRNA 発現変化が炎症反応に依存しているか明らかにするため、すでに実施した K19-C2mE マウス胃炎組織と野生型マウス正常胃組織を用いたマイクロアレイ解析結果との比較解析を行ない、炎症反応依存的に腫瘍細胞で発現誘導される microRNA の特定を行った。その結果、腫瘍細胞で発現誘導する microRNA 57 個の中で、18 個が K19-C2mE マウスの胃炎組織でも発現誘導されており、これらが炎症反応依存的に腫瘍細胞で発現誘導する microRNA として特定された。このリストには、miR-155 や miR-21 など、すでに発がん促進に作用する事が報告されている microRNA が含まれており、炎症反応はこれらの microRNA 発現誘導により、発がんを促進する可能性が考えられた。炎症依存的に誘導する microRNA の中でも miR-135b は最も強い誘導を示しており、データベースのヒト胃癌組織における microRNA 発現結果との比較解析では、ヒト胃癌組織でも有意に発現上昇している事が明らかとなった。さらに、

APC 遺伝子欠損により腸管に自然発生する *Apc*<sup>716</sup> マウスの腫瘍組織を用いた real-time RT-PCR 解析を行った結果、正常腸粘膜上皮細胞と比較して、腸管腫瘍細胞で、miR-135b は有意に発現上昇しており、消化管腫瘍発生において何らかの役割を果たす可能性が考えられた。

miR-135b の発がんにおける機能解析のため、強制発現実験を AGS、KatoIII の胃癌細胞を用いて実施した。その結果、miR-135b 発現にともない増殖率が有意に上昇した。また、miR-135b 特異的阻害剤の導入により、細胞増殖率の低下が認められた。さらに、同様の細胞を使ってトランスウェルによる細胞遊走実験を行った結果、miR-135b の発現誘導により細胞遊走が亢進し、発現阻害により遊走効率は低下した。興味深い事に、マウスの大腸がん細胞 colon26 に miR-135b を導入してコラーゲンゲル中で 3 次元培養した結果、細胞形態が線維芽細胞様に変化して、がん細胞の浸潤能も亢進した。また、miR-135b の導入により、胃癌細胞株の軟寒天中コロニー形成能は上昇し、発現阻害によりコロニー形成は有意に抑制された。

以上の解析結果により、炎症反応依存的に腫瘍細胞で発現誘導する miR-135b は、腫瘍細胞の増殖能や遊走能を亢進し、さらに形態変化により浸潤能を誘導することにより、腫瘍原性を亢進していると考えられた。

### D. 考察

胃癌モデルマウスおよび胃炎モデルマウスを用いた本研究により、炎症反応依存的に腫瘍細胞で発現誘導する miRNA の同定に成功した。これまでにすでに報告のある、発がん促進作用のある miR-155 や miR-21 が含まれ、これらの発現も炎症性微小環境に制御されている可能性が考えられた。すなわち、炎症反応の制御により、これらの microRNA 発現誘導も制御されることで発現抑制効果が得られると考えられた。本研究で着目した miR-135b は、ヒト胃癌組織でも強く発現誘導されており、炎症依存的に胃癌細胞で誘導される microRNA として初めての発見に

なる。強制発現により胃がん細胞の増殖や遊走が亢進し、腫瘍原性も亢進することから、miR-135b 発現は胃がん発生促進に作用すると考えられる。miR-135b の発現制御は NF- $\kappa$ B や Stat3 などの転写因子が誘導する事が報告されており、胃がん細胞における発現誘導もこれらの炎症因子によると考えられた。炎症依存的な発現機構についての解析は今後の課題として重要である。

miR-135b の標的因子には APC 遺伝子をはじめ、発がんに関与する遺伝子群が報告されている。約 50%以上の胃がん組織で Wnt シグナルの活性化が認められているが、大腸がんのように APC や  $\beta$ -catenin 遺伝子の変異が多くは認められない。すなわち、胃がんにおける Wnt 活性化には miR-135b の発現誘導が重要に関与している可能性も考えられた。

本研究では、miR-135b の発現誘導により細胞形態を変化させて浸潤能が亢進する可能性を示す予備的な結果も得られた。したがって、miR-135b の発現誘導により、がん細胞が EMT を起こして転移する過程においても miR-135b が関与する可能性が考えられたが、EMT に関しては今後の詳細な分子機構の研究が必要である。

以上の結果により炎症依存的に腫瘍細胞で発現誘導する miR-135b の阻害は、がん細胞の増殖や遊走による腫瘍原性を抑制することで、胃がんの予防または治療につながる事が期待される。

#### E. 結論

Wnt シグナル活性化と COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路誘導に依存した炎症反応の相互作用により、胃がんを自然発生する Gan マウスと、COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路誘導により胃炎を発症する K19-C2mE マウスを用いた、網羅的な比較解析を行ない、炎症反応依存的に腫瘍上皮細胞で発現誘導する miRNA を特定した。発現誘導する miRNA 群には、miR-155 や miR-21 などの発がん促進に作用する microRNA が含まれ、これらが炎症性微小環境の影響により発現誘導する事が明らかとなった。また、最も強い発現誘導を示した miR-135b はヒト胃がん組織でも強く発現していた。さらに、胃がん細胞へ

の miR-135b の発現誘導および発現阻害は、それぞれ胃がん細胞の増殖や腫瘍原性を亢進あるいは抑制した。以上の結果により、炎症性微小環境依存的に発現誘導する miR-135b は、胃がん発生促進に作用すると考えられ、その発現抑制は胃がんの予防あるいは治療に効果が期待された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Oshima, H., and Oshima, M. The role of PGE<sub>2</sub>-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol*, 35: 139-150 (2013).

Oshima, H., Ishikawa, T., Yoshida, GJ., Naoi, K., Maeda, Y., Naka, K., Ju, X., Yamada, Y., Minamoto, T., Mukaida, N., Saya, H., and Oshima, M. TNF- $\alpha$ /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene*, *in press* (2013).

Ju, X., Ishikawa, T., Naka, K., Ito, K., Ito, Y., and Oshima, M. Context-dependent activation of Wnt signaling by tumor suppressor RUNX3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci*, 105: 418-424 (2014).

Fujita, H., Hamazaki, Y., Noda, Y., Oshima, M., and Minato, N. Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis. *PLoS one*, 8: e78961 (2013).

Wada, T., Ishimoto, T., Seishima, R., Tsuchihashi, K., Yoshikawa, M., Oshima, H., Oshima, M., Masuko, T., Wright, NA., Furuhashi, S., Hirashima, K., Baba, H., Kitagawa, Y., Saya, H., and Nagano, O. Functional role of CD44v-xCT system in the development of spasmodic. *Cancer Sci*, 104: 1323-1329 (2013).

##### 2. 学会発表

Oshima, M. The role of inflammation in

gastrointestinal tumor development and malignant progression. 第72回日本癌学会学術総会、横浜 (2013年10月)

Oshima, M. inflammatory responses and novel mechanisms for gastric cancer development. Soul national Univ CRI Cancer Symposium、韓国・済州島 (2013年5月)

Oshima, M. inflammation-associated malignant progression in model gastrointestinal tumors .6<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Consortium.、シンガポール (2013年7月)

Oshima, M. inflammatory responses in gastrointestinal cancer development and malignant progression. AACR International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research、米国・ワシントン (2013年10月)

Oshima, M. Targeting chronic

inflammation in gastrointestinal tumorigenesis. Annual Meeting of Korea Cancer Prevention Society、韓国・ソウル (2013年12月)

Oshima, M., and Oshima, H. The role of iCOX-2/PGE<sub>2</sub>-inducws inflammation in gastric cancer development. 4<sup>th</sup> JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Gastric Cancer Research、千葉 (2013年12月)

Oshima M. Chronic inflammatory responses in gastric tumor development and progression .4<sup>th</sup> international symposium on Carcinogenic Spiral、札幌 (2014年2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

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、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、cyclin E、osteopontin、proliferin という3つの分子が 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を既に明らかにしていた。また、mTORC1 経路は悪性の腸管腺がんの形成にも重要な役割を果たすこと、そして mTOR キナーゼ阻害薬は mTORC1 選択的阻害薬よりも腫瘍形成抑制効果が強いことを示す予備的データを得ていた。本年度の研究により、mTOR キナーゼ阻害薬は *cis-Apc/Smad4* 複合変異マウスに発症する腸がんの成長を強く抑制するが、浸潤能自体は抑制しないことが明らかとなった。また、mTOR キナーゼ阻害薬によりフィードバック機構を介して EGFR/PI3K/Akt 経路が活性化されることが mTOR キナーゼ阻害薬に対する耐性に寄与している可能性が示唆された。今後、このフィードバック機構の解明、mTOR キナーゼ阻害薬と EGFR 阻害薬との併用効果等について更に研究を進めたい。

A. 研究目的

*Apc*<sup>Δ716</sup> マウスは大腸がん初期病変である腺腫性ポリープを発症するモデルであり、我々はその腫瘍形成に mTOR complex1 (mTORC1) と Smoothed が重要な役割を担うことを示してきた。本研究は、腸管腫瘍における mTORC1 経路活性化機序、及び Smoothed による Wnt シグナル活性化機序を明らかにし、大腸がん発生初期段階を制御する分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

*cis-Apc/Smad4* 複合変異マウスに mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 を経口投与し、腫瘍組織における Akt、Erk、p38MAPK 等の活性化状態を調べた。また、mouse-phospho-RTK Array Kit を用いて、受容体型チロシンキナーゼの活性化状態を網羅的に解析した。

(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研究所動物実験規程に基づいて行った。

C. 研究結果

*cis-Apc/Smad4* マウスに mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 を投与したところ、mTORC1 経路は mTORC1 選択的阻害薬 RAD001 に比べて更に強く抑制され、mTORC2 経路も抑制された。短期間の AZD8055 投与により腺がん形成は著しく抑制されたが、浸潤の深さ自体は抑制されなかった。AZD8055 投与下においても *cis-Apc/Smad4* マウスの腸がんでは Akt の T308 のリン酸化が亢進し、Akt 経路は活性化されていた。受容体型チロシンキナーゼのリン酸化状態を網羅的に解析したところ、EGFR の強い活性化が認められた。大腸がん細胞株 CaR-1 を用いて *in vitro* での解析を行ったところ、AZD8055 により EGFR/PI3K/AKT 経路が活性化されたが、EGFR 阻害薬 erlotinib により AKT の活性化は抑制された。

D. 考察

mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 は良性腺腫のみならず腸がんの形成も抑制するが、形成された腸がんの浸潤自体は阻害せず、

昨年度の予備的実験で観察された浸潤の抑制は腫瘍の成長が抑制されたことによる二次的な効果による可能性が示唆された。AZD8055 投与下の *cis-Apc/Smad4* マウスの腸がんで EGFR/PI3K/AKT 経路が強く活性化されていたこと、大腸がん細胞に AZD8055 を加えるとやはり EGFR/PI3K/AKT 経路が活性化され、その活性化は erlotinib により阻害されたことから、未知の機序によるフィードバック効果により EGFR/PI3K/AKT 経路が活性化されることが浸潤部位における mTOR キナーゼ阻害薬耐性に寄与する可能性が示唆された。

#### E. 結論

昨年度までに、*Apc* マウスの微小腺腫が成長するためには 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 Raptor を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。また、mTORC1 経路は悪性の腸管腺がんの形成、浸潤能にも重要な役割を果たすこと、そして mTOR キナーゼ阻害薬は mTORC1 選択的阻害薬よりも腫瘍形成抑制効果が強いこと示す予備的データを得ていたが、本年度の研究により、mTOR キナーゼ阻害薬は浸潤自体を直接には抑制しないことが明らかとなった。また、mTOR キナーゼ阻害薬による未知のフィードバック機構を介して EGFR/PI3K/Akt 経路が活性化されることが耐性に寄与している可能性が示唆された。今後、このフィードバック経路の解明、そして mTOR キナーゼ阻害薬と EGFR 阻害薬との併用効果について更に

研究を進めたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし。

##### 2. 学会発表

藤下晃章、武藤誠、青木正博 mTOR キナーゼ阻害薬は大腸がんモデルマウスの腺がん形成を強力に抑制する 第36回日本分子生物学会、神戸市 (2013年12月)

青木正博、藤下晃章、武藤誠 CDX 転写因子の標的分子 PLEKHG1 の発現低下は大腸腫瘍形成を促進する 第72回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013年10月)

藤下晃章、武藤誠、青木正博 mTOR キナーゼ阻害薬は大腸がんマウスモデルの大腸腺がん形成を抑制する 第72回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013年10月)

佐久間圭一朗、神奈木玲児、青木正博 大腸がん細胞においてシアリルルイス糖鎖の発現と EMT は関連する 第65回日本細胞生物学会大会、名古屋市 (2013年6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

KADラットを用いた抗炎症剤の検定試験系の開発

分担研究者 庫本高志  
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 准教授

研究要旨 AOM/DSS 誘発 KAD ラット大腸発癌モデルは、すべての個体に大腸腫瘍を誘発できるため、評価試験系としての利用が期待されている。今回、抗炎症剤の評価試験系としての確立を目的として、セレコキシブと緑茶カテキン（EGCG）による大腸がん抑制効果を検討した。500ppm セレコキシブ混餌食により、大腸腺癌の発生率は有意に低下した。また、1 頭当たりの異形成、腺腫、腺癌、総腫瘍数はいずれも有意に低下した。0.1% EGCG 水の投与によって、異形成、腺腫、腺癌の発生率は有意に低下した。また、1 頭当たりの異形成、腺腫、腺癌、総腫瘍数はいずれも優位に低下した。以上、既存薬剤の抗腫瘍効果が確認できたことから、AOM/DSS 誘発 KAD ラットモデルが新規の抗炎症剤の開発においても、利用できることが示唆された。

A. 研究目的

KAD (Kyoto Apc Delta) ラットは Apc 遺伝子にナンセンス変異 (S2523X) を持ち、C 末領域を欠く APC タンパク質を発現している。KAD ラットに、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いて大腸がんを誘発すると、大腸がんが比較的短期間 (15 週) に、確実に (100%)、しかも複数個 (約 10 個/頭) 得られる (Cancer Science, 2009)。そのため、そのため、AOM/DSS 誘発 KAD ラット大腸発癌モデルは、抗癌剤や抗炎症剤の評価試験系としての利用が期待されている。これまで、抗がん剤の評価試験系を開発した (BMC Cancer, 2012)。平成 25 年度は、抗炎症剤、がん抑制剤の評価試験系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

代表的な抗炎症剤であるセレコキシブを用いて、抗炎症剤の評価モデルを確立した。セレコキシブ非投与群、投与群 (500ppm) を設定し、AOM と DSS により大腸がんを誘発した。セレコキシブは、実験開始時から 14 週間、混餌投与した。また、緑茶の成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) を用いて同様に、発がん実験を行った。1%EGCG 溶液を DSS 投与

終了後、13 週間飲水投与した。

(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」、「国立大学法人岐阜大学動物実験取扱規程」に基づき実施した。

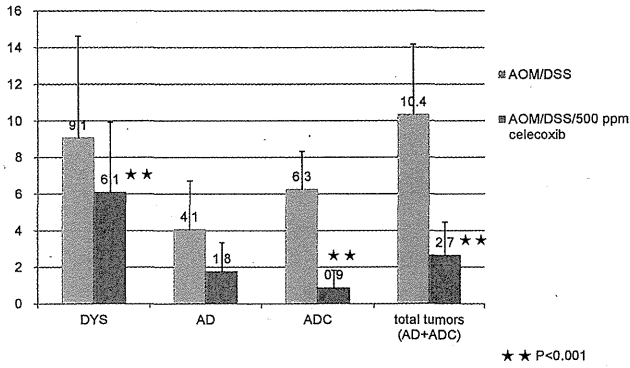
C. 研究結果

セレコキシブ投与群では、異形成、腺腫、腺癌の発生率は、それぞれ、100%、78%、56%であった。腺癌の発生率は有意に抑制された。また、1 頭当たりの病変は、異形成、腺癌において、有意に抑制された (図 1)。

EGCG 投与群では、大腸異形成、腺腫、腺癌のいずれにおいても、その発生数が有意に抑制された (図 2)。また、EGCG は抗酸化作用があるとされている。血中の活性酸素代謝物 (ROM)、抗酸化力 (BAP) を測定したところ、1% EGCG 投与群で有意に抗酸化力指標 (BAP/ROM) が上昇していることが判明した。

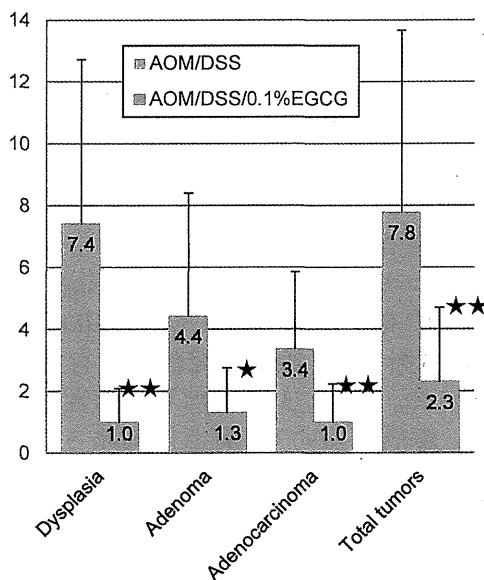
D. 考察

本研究では、すでに大腸腫瘍の発生に対する抑制効果が知られているセレコキシブ、EGCG を用いて、KAD ラットの AOM/DSS



大腸発がん誘発系での、大腸腫瘍の抑制効果を検討した。その結果、いずれの薬剤においても大腸腫瘍の抑制効果が確認され、KAD ラットの AOM/DSS 大腸発がん誘発系が既存の大腸発がん誘発系と同様、抗炎症剤やがん抑制物質の評価試験に利用できることを示した。

これまでの、抗炎症剤やがん抑制物質の評価試験は、F344 ラットなどの正常ラットに大腸がんを誘発したバイオアッセイ



系を用いていた。これらの系では、実験期間が30週程度と長く、大腸腫瘍の発生頻度も数10%程度であり、評価の効率の改善が求められていた。Apc 遺伝子に変異をもつ KAD ラットを用いることで、実験期間の短縮と発生頻度の改善がなされ、抗炎症剤やがん抑制物質の評価試験の効率化がなされた。KAD ラットを用いた AOM/DSS 大腸腫瘍誘発系を用いることで、新規の抗がん剤、抗炎症剤、がん抑制物質の評価試験が迅速に進むことが期待さ

れる。

## E. 結論

AOM/DSS 誘発 KAD ラット大腸発癌モデルは、抗炎症剤やがん予防物質の効果的な検定試験系として利用できることが示された。

本試験系を利用することで、新たな抗炎症剤やがん予防物質が発見され、炎症関連大腸癌化学予防の実践が促進されると期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yoshimi K, Tanaka T, Serikawa T, Kuramoto T. Tumor suppressor APC protein is essential in mucosal repair from colonic inflammation through angiogenesis. Am J Path 2013 Apr;182(4):1263-74

### 2. 学会発表

吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志 大腸癌抑制タンパク質 APC と大腸炎関連タンパク質 DLG5 との相互作用 第60回日本実験動物学会総会、平成25年5月、つくば国際会議場

杉江成幸、田中卓二、吉見一人、庫本高志 KAD ラットは 4-NQO 誘発舌発がんを高感受性である 第72回日本癌学会学術総会、平成25年10月、パシフィコ横浜

## 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