

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 名古屋市立大学医学部実験病態病理学 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、同細胞が大腸化学発癌物質のターゲットである可能性を探った。その結果、*Lgr5* 発現細胞がアゾキシメタンの標的細胞となっている可能性が示唆される microadenoma を確認した。また、アゾキシメタン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デオキシコール酸摂取による発癌促進リスクを評価した。遠位大腸は発癌プロモーション作用のみ観察されたが、近位ではプロモーション作用に加え、イニシエーション作用を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

大腸上皮幹細胞は陰窩の底部に存在し、長期にわたって腺管を構成する上皮細胞を供給し続けることから、化学物質の主たる標的のひとつであることが推察される。今回、lineage tracing system を用いて、*Lgr5* 発現細胞が化学発癌物質の標的となる可能性を探った。また、化学物質の発癌性リスク評価の観点から、大腸の部位によって腫瘍発生に及ぼす影響が異なる可能性のある二次胆汁酸、デオキシコール酸の修飾作用をアゾキシメタン(AOM)誘発マウス大腸腫瘍モデルで検討した。

B. 研究方法

(実験1) タモキシフェン(TAM)投与により *Lgr5* 発現細胞に β -galactosidase を発現する *Lgr5-GFP-IRES-creERT2* knock-in; *Rosa26-LacZ* reporter mice に対し、AOM および TAM をそれぞれ皮下と腹腔内へ同時投与した。前癌病変の発生を促進するため、投与1週間後より1.5%のデキストラン硫酸ナトリウムを1週間飲水投与した。実験開始5週間後に犠牲死させ、大腸を摘出し、病理組織標本を作製した。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 AOM (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%の濃度でデオキシコール酸を混餌投与した。混餌開始後2週間で一部マウスの大腸粘膜を採取し、NF- κ B 関連遺伝子の発現解析を行った。実験開始後24週で残るマウスの大腸を摘出し、中遠位大腸は粘膜面に対し en face の病理組織標本を作成して網羅的に大腸前癌病変を評価した。盲腸隆起性病変は粘膜面に垂直な病理標本を作製し、ki-67, β -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) *LacZ* を発現するマウス大腸 microadenoma の出現を確認した。*LacZ* は microadenoma を構成するすべての細胞に発現していた。

(実験2) 0.04, 0.2, 0.5% 摂取群の腫瘍性病変発生率(処置マウス中の罹患マウスの割合)、大腸あたり microadenoma 数、adenocarcinoma 数はそれぞれ80%, 1.7 ± 1.5 , 0; 70%, 1.8 ± 2.1 , 0.1 ± 0.3 ; 100%, 6.2 ± 1.4 , 0.7 ± 1.1 であり、AOM 単独群の60%, 0.7 ± 0.7 , 0 と比較して microadenoma 数、adenocarcinoma 数が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、デオキシコール酸摂取により、盲腸に隆起性病変の発生が見られ、いずれの病変も β -catenin の胞体内蓄積や核内移行も観察されなかったが、ki-67 陽性細胞が高位にまで見られ、構造異型から腺腫、腺癌に分類される病変との結論に至った。盲腸隆起性病変は0.2, 0.5% 摂取群にのみ見られ、デオキシコール酸単独でも腫瘍の発生が見られたが、AOM の投与により腫瘍は有意に増加した

($P < 0.05$)。デオキシコール酸摂取により遠位大腸粘膜の NF- κ B 関連遺伝子に変化が見られたが有意ではなかった。

D. 考察

実験1の結果から、AOM は *Lgr5* 発現細胞を標的細胞のひとつにしており、大腸 microadenoma の幾つかは AOM によるイニシエーションを受けた *Lgr5* 発現細胞がモノクローナルな増殖を来した病変であると推察された。実験2の結果からはデオキシコール酸が中遠位大腸では腫瘍性病変のプロモーターとして、近位大腸ではイニシエーターおよびプロモーターとして作用することが示された。

E. 結論

AOM 誘発マウス大腸前癌病変に幹細胞由来と考えられる microadenoma を確認した。また、デオキシコール酸の混餌投与は AOM 誘発大腸前癌病変および大腸腺癌の発生を促進するとともに、単独でも近位大腸に腫瘍性病変を形成することが明らかとなった。

F . 健康危険情報

該当なし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Ninomiya F, Yokohira M, Kishi S, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Kuno T, Imaida K. Gender-dependent effects of gonadectomy on lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female and male A/J mice. *Oncol Rep.* 30:2632-8. 2013
2. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, Saito K, Hara A. IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice. *J Immunol.* 191:3057-64. 2013
3. Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A, Mori H, Terasaki M, Matsuda S, Tanaka T. Organoamagnesium suppress inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj:CD-1 mice. *Carcinogenesis.* 34:361-9. 2013
4. 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

2 . 学会発表

1. 炎症関連 TSOD マウス大腸発癌に対する ACE 阻害薬 enalapril の修飾効果. 久野壽也、田中卓二、三輪貴生、小川博史、遠藤奨、後藤滉平、原明；第 20 回日本がん予防学会 平成 25 年 7 月，東京
2. Deoxycholic acid, secondary bile acid promotes AOM-induced colorectal carcinogenesis in distal colon of mice but not proximal colon. Kuno T, Tanaka T, Takamatsu M, Hatano Y, Tomita H, Hirose Y, Hirata A, Hara A; The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 2013, Yokohama
3. マウス大腸発癌に及ぼすデオキシコール酸の影響. 久野壽也、田中卓二、内木綾、佐藤慎哉、鈴木周吾、高橋智；第 30 回日本毒性病理学会総会 平成 26 年 1 月，徳島

H . 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。