

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 4月 4日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800025

研究課題名（和文）マウス消化器がんモデルを用いた悪性化・転移機構の探索

研究課題名（英文）Research of the mechanisms of progression and metastasis using mouse gastrointestinal cancer models

研究代表者

石川 智夫（ISHIKAWA TOMO-O）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70322162

研究成果の概要（和文）：消化器がんの死亡原因となる悪性化、転移のメカニズムを解析するために、マウスの腫瘍形成モデルを用いた新しい実験系の構築を試みた。その結果、胃腫瘍、腸腫瘍を発生する遺伝子改変マウス、化学発がんモデルマウスよりの腫瘍細胞の単離、経代培養を行った。また、これらの細胞への遺伝子導入、発現も可能となり、悪性化・転移を示す形質の変化を誘導する新たな因子の同定につながる結果を得た。

研究成果の概要（英文）：To analyze the mechanisms of gastrointestinal cancer progression and metastasis which result in many patient death, tumor cells from mouse genetic models were used to establish a new *in vitro* system. Tumor cells were isolated from genetic and chemical mouse models for gastric and intestinal tumor formation, cultured and passaged. Transfection of expression vector was also possible in these cells. This system can be utilized for the identification of candidate genes which relate to cancer progression and metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,260,000 | 378,000 | 1,638,000 |
| 2011年度 | 1,160,000 | 348,000 | 1,508,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,420,000 | 726,000 | 3,146,000 |

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：がん、マウスモデル、炎症、転移

## 1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡は、原発巣の腫瘍のみによるものは少なく、約 90%は転移した腫瘍が原因と考えられている。消化器がんにおいても、死亡の原因となるのは大部分が転移性のがんであり、転移のメカニズムを解析し、その要望、診断、治療法を確立することは、最も重要な課題である。

この課題に取り組むために、我々は病状を反映する動物モデルの作出が重要であると考えている。現在、がん組織や細胞の移植によってではなく、遺伝学的に作出されたマウスモデルの腫瘍は、良性のものからある程度の浸潤性をもったものまでにとどまっている。提唱されている腫瘍発生のモデルである多段階発がん、あるいはがん幹細胞の概念に照らしてみると、これらのモデルで高頻度に悪性化転移性をもった腫瘍を誘導するためには、遺伝的変異あるいは細胞集団の組成を変えるような因子を加えることが必要であり、またそのような状況を作り出すことによってより悪性化、転移性をもった腫瘍を誘導するモデルを作製することが可能であるとも考えられる。腫瘍細胞の悪性化、転移を誘導する機構は、大きく2つに分けられる。ひとつは腫瘍細胞自身の内在的な変化であり、もうひとつは腫瘍細胞がおかれた微小環境の変化である。例えば、細胞の内在的な変化として上皮間葉移行(EMT)がある。EMTは細胞分化転換のプログラムであるが、冗費施主用細胞が浸潤、転移をするときに獲得する機構であり、また、がん幹細胞としての性質、悪性化の誘導、細胞老化の抑制にも働いていることが示されている。腫瘍細胞の微小環境の変化としては、がんと炎症の関係があげられる。細胞によって誘導される全身的な変化があげられる。マウスに移植したひと悪性腫瘍由来の細胞は、宿主の骨髄性細胞に影響を

与え、その形質の変化した骨髄性細胞が別の悪性度の低い腫瘍細胞を悪性化する”instigation”のモデルが提唱されている。しかしながら、これらの概念をもとにしたマウスの内在性悪性腫瘍モデルは現在のところ作られていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに作出された消化器がんのモデルマウスを用いて、その腫瘍がさらに悪性化するようなメカニズム、因子の探索を目的として行った。そのために、マウス消化器上皮細胞の培養系を用い、マウス内在性腫瘍を悪性化させる因子の探索を行えるモデルを構築する。その結果より、マウスの遺伝子改変による内在性腫瘍悪性化モデルの確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 消化器腫瘍形成モデル

本研究では、炎症を伴う胃粘膜腫瘍を発生する *K19-Wnt1/C2mE* トランスジェニックマウス (*Gan* マウス)、大腸ポリープ症のモデルである *Apc<sup>Δ716</sup>* ノックアウトマウス、炎症性大腸腺腫の化学発がんモデルである Azoxymethane (AOM) と Dextran Sodium Sulfate (DSS) を投与したマウスを使用した。

### (2) マウス腫瘍由来の細胞培養と遺伝子導入

上記モデルマウスより採取した腫瘍より、腺構造を分離し培養を行った。経代が可能な培養条件を確立した後、遺伝子導入法の検討を行った。GFP を発現するベクターを用い、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、レンチウイルスベクターの使用を検討した。

### (3) EMT の誘導

培養下の腫瘍細胞の EMT を誘導するために、既知の EMT を誘導することが知られている因子の強制発現を行った。そのためにこれら因子を発現するベクターを構築し、細胞への導入を行った。

### (4) 腫瘍形成、悪性化に関与する新規因子の探索

*Gan* マウスは Wnt シグナルの亢進と COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路の活性化により炎症を伴う胃癌を発生する。このときの遺伝子発現変化をマイクロアレイをにより解析した結果から、炎症依存的に発現が変化する遺伝子を得た。これらの中から、*Lgr5* 遺伝子を発現している胃上皮幹細胞で発現が高い遺伝子を選び、siRNA を用いてノックダウンした際の腫瘍原性への影響を、ヒト胃癌細胞のソフトアガーコロニー形成能を用いて調べた。

## 4. 研究成果

*Gan* マウスの胃腫瘍、*Apc*<sup>d716</sup> ノックアウトマウスの小腸の腫瘍、よりその上皮細胞を単離し、*in vitro* での培養を試みた。近年報告された培養条件をもとにした検討の結果、これらの腫瘍細胞の 3 次元培養系における長期にわたる経代培養、ならびに凍結保存が可能となった。次にこれらの細胞への遺伝子導入法を GFP を発現するベクターを用いて検討した。その結果、リポフェクション法、レンチウイルスベクターの使用により GFP を発現する細胞を得ることができた。レンチウイルスベクターを用いて導入したい電子は染色体上に挿入されるので、GFP 発現を指標として細胞を選別し、経代していくことが可能である。

一方、AOM/DSS 投与とその後の長期の飼育により浸潤が見られるような悪性化した大

腸腫瘍を得ることができた。これらの腫瘍から単離した上皮細胞の 3 次元培養においては、*Apc*<sup>d716</sup> ノックアウトマウスとは異なる形態のコロニー形成が見られた。このことから、3 次元培養における形態が腫瘍の悪性化と関連していることが示唆された。

腫瘍細胞の悪性化、転移を誘導する内在的な機構として EMT に着目し、これまでに EMT を誘導することが示されている遺伝子を GFP と共に発現するベクターを構築した。このベクターを胃、および腸腫瘍より培養した上皮細胞に導入したが、これらの細胞では EMT を示すような顕著な形質変化は見られなかった。

そこで、胃腫瘍形成、悪性化に関わる因子を新たに探索することを試みた。腫瘍の悪性化、進展は細胞の脱分化と関係していることが知られているが、微小環境が分化度に与える影響に着いてはこれまでに解明されていない。そこで、炎症を伴う腫瘍形成を行う *Gan* マウスにおいて、炎症依存的に発現が変化する未分化性に関わる遺伝子をマイクロアレイ解析より選別した。これらの遺伝子の腫瘍原性への関与するものをヒト胃癌細胞を用いた実験より同定した。これらの遺伝子の発現、ノックダウンが、本研究により確立したマウス由来の腫瘍上皮細胞にどのような影響を与えるか、今後検討していく予定である。

本研究により得られた腫瘍細胞を用いた系は、マウスを用いた *in vivo* の実験と培養細胞株を用いた実験の間に位置づけられ、今後の腫瘍悪性化、転移に関与する新たな因子を探索する研究に重要な役割を占めていくものである。今後はこの系を用いて新しい因子を同定し、次世代のマウスモデルの構築につなげていきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

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*, 2012, in press. 査読有 doi:10.1038/onc.2011.558.

②, Ishikawa, T., Oshima, M. and Herschman, H.R. Cox-2 deletion in myeloid and endothelial cells, but not in epithelial cells, exacerbates murine colitis. *Carcinogenesis*, 2011, 32 417-426. 査読有 doi:10.1093/carcin/bgq268

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 E(2) receptor EP4 pathway during gastric tumorigenesis. *Cancer Sci.*, 2011, 102 713-719. 査読有 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01847.x

④, Oshima, H., Hioki, K., Popivannova, B.K., Oguma, K., Van Rooijen, N., Ishikawa, T. and Oshima, M. Prostaglandin E<sub>2</sub> signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology*, 2011, 140 596-607. 査読有

doi:10.1053/j.gastro.2010.11.007

[学会発表] (計3件)

①, Ishikawa, T. and Oshima, M. Effects of inflammation on the epithelial differentiation and tumorigenesis. 16<sup>th</sup> Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2011.12.9 北海道大学 (北海道)

②, Ishikawa, T. and Oshima, M., Effects of inflammation on the epithelial differentiation and tumorigenesis. 70<sup>th</sup> Annual Meeting for Japanese cancer 2011.10.3, 名古屋国際会議場 (愛知県)

③, Ishikawa, T. and Oshima, M. Tumor formation without Cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in mouse model of colitis-associated cancer. 69<sup>th</sup> Annual Meeting for Japanese Cancer Association. 2010.9.22, 大阪国際会議場 (大阪府)

[その他]

ホームページ等

<http://genetics.w3.kanazawa-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 智夫 (ISHIKAWA TOMO-O)  
金沢大学・がん進展制御研究所・助教  
研究者番号: 70322162

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし