

第4回疾患モデルシンポジウム

がん研究のモデル動物

2011年11月11日（金曜日） 13:30~18:00

吉田富三記念講堂（財団法人がん研究会がん研究所1F）

企画・運営担当：

中釜 齊（国立がん研究センター 研究所）

中村卓郎（がん研究会がん研究所 発がん研究部）

菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部）

主催：日本実験動物学会 疾患モデル委員会

共催：日本トキシコロジー学会

後援：日本分子生物学会

プログラム

- 13:15 – 13:30 受付開始・開場
- 13:30 – 13:35 開会の挨拶 (菅野 純)
- 【基礎編】 座長 菅野 純
(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部)
- 13:35 – 14:15 中釜 斉 (国立がん研究センター 研究所)
発がん動物モデルの in vitro での再構築
- 14:15 – 14:55 中村 卓郎 (がん研究会がん研究所 発がん研究部)
融合遺伝子の導入による肉腫モデルの確立
- 14:55 – 15:35 石坂 幸人 (国立国際医療研究センター 研究所)
内在性レトロトランスポゾンの発がんにおける役割
- 15:35 – 16:15 山田 泰広 (京都大学 iPS 細胞研究所)
細胞初期化技術を用いたがんのエピジェネティクス研究
- 16:15 – 16:35 休憩
- 【応用編】 座長 中村 卓郎
(がん研究会がん研究所 発がん研究部)
- 16:35 – 17:15 Beate Heissig (東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター)
Plasmin inhibition reduces lymphoid tumor growth in mice by suppressing matrix metalloproteinase-9 dependent myeloid cell recruitment
- 17:15 – 17:55 近藤 科江 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)
がん微小環境因子を利用した生体光イメージングモデルマウスの構築
- 17:55 – 18:00 閉会の挨拶 (中村 卓郎)

抄 錄
基 礎 編

発がん動物モデルの *in vitro* での再構築

中釜 齊

国立がん研究センター 研究所

がんは、環境中の様々な発がん要因への曝露により誘発・固定されるジェネティックあるいはエピジェネティックな変化が、細胞内に多段階的に蓄積することにより発生する。最近の Omics 研究の急速な進展により、がんで高頻度に変異や発現変化が認められる遺伝子が次々に明らかにされてきた。全ゲノム・全エクソン解析の成果からは、一つのがん種で認められる遺伝子変異の数は数百から数千以上にもおよぶことが分かり、がんの持つ多様性の一端について遺伝子変異の観点からも捉えることができるようになった。最近では、がん化過程における様々な microRNA の発現変化と、それらの microRNA のがんの発生・進展過程への関与も数多く指摘されている。しかし、これらの遺伝子変異や発現変化の認められる遺伝子の中で、実際のがんの発生・進展過程に直接関与する所謂ドライバー変異がどれであるのかを証明することは必ずしも容易ではない。例えば、遺伝子改変マウスや遺伝子改変細胞を用いた *in vivo* での解析により、発がん過程への直接的な関与を実証することが求められる。遺伝子改変マウスが胎性致死の場合や、他の臓器での症状がより早期に出現することで、目的とする臓器での表現型を観察する前にマウスが致死する場合も少なくない。通常、このような事態では、臓器特異的あるいは誘導可能な遺伝子改変動物の作成が求められ、或いは、他の遺伝子改変動物との複合作用による影響に関する個体レベルでの証明が要求されることにより、解析に多くの時間と労力を要することになる。ヒト発がんへの関与が示唆されている様々な環境中の発がん要因に関しても、これらの発がん要因への曝露により誘発される遺伝子変化が、がん発生のプロセスでどのような役割を担っているのかを証明することは決して容易ではない。通常の発がん実験に用いられるラットの遺伝学的解析も未だ極めて困難な状況にあり、発がん過程における遺伝子変化の個体レベルでの分子生物学的な解析は極めて困難な状況にある。こうした問題の一つの解決法として、最近我々は Sato らの方法 (Nature 459 : 262 - 265, 2009) を応用して、マウス腸管細胞を用いた大腸発がんを *in vitro* で再現可能な実験系の開発に成功したので報告する。

生後 1 カ月以内のマウスから腸管 crypt を単離して特定の因子とマトリゲルを用いた 3 次元培養後、single cell の状態で、種々のがん化関連遺伝子を組み込んだレンチウイルスを感染させる。これにより、複数のがん抑制遺伝子を標的とした shRNA や、活性化したがん遺伝子の cDNA を細胞内に導入することが可能となった。これらの遺伝子操作を行った腸管上皮 (crypt) 細胞を、更に 3 次元培養し、ヌードマウス皮下に移植して造腫瘍性を 3~6 週間追跡する。例えば、APC と p53 に対する shRNA を同時に導入したマウス小腸細胞では、3 次元培養の段階においても Wnt 経路の活

性化を意味する球形の構造に変化し、ヌードマウス皮下でも腺癌様の組織型を呈する悪性腫瘍を形成することが示された。これらの腫瘍は、間質の増生、血管新生などの所見に加えて、 β -catenin の核内への蓄積も呈するなど、ヒト大腸がんのもつ細胞学的な特性をよく再現していることが分かった。現在これらの実験系を用いて、種々のがん化関連遺伝子の組み合わせと腫瘍形成能との関係を解析している。これまでの成果について報告するとともに、*in vitro* での発がん過程の再構築システムの発がん研究における意義と可能性について考察する。

参考文献

1. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. 2007. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(39):15472-7.
2. Izumiya M, Okamoto K, Tsuchiya N, Nakagama H. 2010. Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. *Carcinogenesis* **31**(8):1354-9.
3. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. 2011. Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res* **71**(13):4628-39.

融合遺伝子の導入による肉腫モデルの確立

中村 卓郎

公益財団法人がん研究会 がん研究所 発がん研究部

間葉系結合組織から発生する骨軟部肉腫には、原因遺伝子として融合遺伝子を有する群が存在する。Ewing 肉腫、粘液状脂肪肉腫、滑膜肉腫、胞巣状横紋筋肉腫等がこの群に含まれるが、特徴的な臨床病理的・生物学的性格を有し、その発生には不明な点が多い。融合遺伝子の多くはキメラ型転写因子をコードし、細胞の増殖促進作用や分化抑制効果を示すが、*in vivo* における機能の評価は動物モデルが未整備のため充分に行われていない。

Ewing 肉腫は、小児・若年者の長管骨に好発する悪性腫瘍で、小円形細胞が旺盛な増殖を示し、しばしば遠隔臓器に転移する。分子異常として EWS-FLI1 を初めとする EWS-ETS 型転写因子の形成が特徴的である一方で、発生母地となる細胞は未だ特定されていない。また、EWS-FLI1 を導入したトランスジェニックマウスやノックインマウスでの病態の再現はこれまで困難であった。我々は、Ews と Fli1 遺伝子座の間において、Cre/loxP によるリコンビネーションを介して *in vivo* で染色体転座を誘導するマウスモデルを構築した。Cre リコンビナーゼの全身臓器における発現で Ews-Fli1 転座とキメラ転写産物は得られたが、腫瘍発生には至らなかった。そこで、発生母地細胞を予測しキメラ遺伝子を *ex vivo* 実験系で選択的に導入する新たなモデルを作製した。

マウス胎児長管骨から分離した前駆細胞に EWS-FLI1 または EWS-ERG をレトロウイルスベクターを用いて導入しヌードマウス皮下に移植した。移植マウスは前例が Ewing 肉腫様の小円形細胞肉腫を発生した。腫瘍は移植可能であり、尾静脈注射により肺転移も認められた。導入された前駆細胞では EWS-FLI1 による遺伝子発現変化がより分化した細胞と異なり、細胞のエピジェネティックな状態の重要性が示唆された。また、本モデルは、遺伝子発現プロファイルの側面からもヒトの Ewing 肉腫と類似性を示した。

融合遺伝子を用いた肉腫モデルの適用や有用性、腫瘍発生機構の理解につながる情報について発表する。

内在性レトロトランスポソンの発がんにおける関与

奥平 准之¹、後藤 元人²、岡村 匡史²、石坂 幸人¹

(独) 国立国際医療研究センター¹ 難治性疾患研究部、² ヒト型動物開発研究室

内在性レトロエレメントの一つである Long interspersed nucleotide element-1 遺伝子(以下 L1)はヒトゲノムの約 17%を構成し、一細胞中に 50 万コピー以上存在する。L1 の 80-100 コピーは機能性を保持しており、その異常な動き(レトロトランスポジション、L1-RTP)によって例えば、血友病や慢性肉芽腫症などの先天性異常の突発例が発症する。L1 の動きは、遺伝子欠損、重複、染色体転座など様々なゲノム不安定性が誘導することから、癌化への関与も考えられている。これまでに乳癌や大腸癌で *Myc* や *APC* 遺伝子に挿入された例が報告されるとともに、ごく最近、膵臓癌を初めとする様々な腫瘍において pericentric region への L1 挿入が見いだされた。しかし、L1-RTP の誘導因子やその癌化における具体的な役割については明らかになっていない。

私たちは、難病発症における L1 の作用を理解するためのシステムとして、ヒト L1 を導入したマウス(hL1-EGFP マウス)を作成した。樹立したマウスでは胎生期の L1 の動きは低く抑えられているのに対して、成体マウスは環境因子に鋭敏に反応し、標的臓器で L1-RTP が誘導される。これまでに発癌に関連した実験として、DMBA/TPA 二段階皮膚発癌(DMBA, 7, 12-dimethyl benz[*a*]anthracene; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate)と加熱食品中に存在するヘテロサイクリックアミン(HCA)の投与実験を行った。その結果、DMBA/TPA 誘発皮膚腫瘍では解析した 15 個の腫瘍組織の内、13 個に L1-RTP 誘導を見出すとともに、腫瘍で検出された L1-RTP は TPA による腫瘍プロモーションの過程で生じたことが分かった。また TPA による L1-RTP は ERK や EGFR 依存的であり、TPA による腫瘍プロモーター作用の発現に必要とされる細胞内シグナルに依存した。一方、HCA である 2-amino-1-methyl-6-phenyl imidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) をピコモルレベルで週三回、6週間投与すると、乳腺組織で L1-RTP が誘導された。そして、PhIP 誘発 L1-RTP には芳香族炭素化合物受容体とエストロゲン受容体 α の両者が必要であること、さらに L1-RTP は非アセトキシ体 PhIP でも誘導されることを明らかにした。PhIP はヒト母乳中に pM レベルで存在し、rodent-model で再現性良く乳癌を誘発することから、ヒト乳癌発症におけるリスク因子として考えられている。しかし、特に低濃度の PhIP がどのような機序で癌化に関与するのにかに関する明確な答えは得られていない。本発表では、これまでに得られているデータを紹介しながら、癌化における L1-RTP の役割を議論したい。また hL1-EGFP マウスを用いたナノ粒子の投与実験データについても紹介し、L1-RTP が様々な難病の発症理解に向けた新たな「切り口」となり得る可能性を紹介する。

細胞初期化技術を用いたがんのエピジェネティクス研究

山田 泰広

京都大学 iPS 細胞研究所

分化した体細胞に 4 つの異なる転写因子を導入することで、胚性幹細胞 (ES 細胞) とほぼ同等の細胞、すなわち induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) の樹立が可能となった。iPS 細胞は無限に増殖させることが可能であり、かつ全ての体細胞に分化するという特徴から、再生医療のソースとして大きな期待を集めている。一方でマウス iPS 細胞から作製されたキメラマウスには腫瘍形成が頻繁に見られ、iPS 細胞を用いた安全な再生医療の実現のためには、iPS 細胞由来の腫瘍発生を制御する必要がある。iPS 細胞からの腫瘍発生にはゲノム異常とともに、エピゲノム制御異常が関与していることが予想されるが、その詳細な発がんメカニズムについては未だ明らかとなっていない。我々は、細胞初期化と発がんの接点を明らかにするために、薬剤依存性に山中 4 因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, Myc) を誘導可能なマウス (Reprogrammable マウス) を作製した。成体マウス体細胞に初期化因子を強制発現させると、様々な臓器に異型増殖性病変が生じることが分かった。異型増殖性病変は初期化因子発現停止後に速やかに消失した。しかしながら、一部の異型細胞は初期化因子発現停止後も増殖を続けることが明らかとなった。本発表では、reprogrammable マウスの異型増殖性病変の解析から明らかとなりつつある、エピゲノム制御異常を背景とした、細胞リプログラミングと腫瘍発生の接点を議論したい。

参考文献

1. Yamada Y, Aoki H, Kunisada T, Hara A. 2010. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. *Cell Stem Cell* **6**(1):10-5.
2. Hochedlinger K*, Yamada Y*, Beard C, Jaenisch R. 2005. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* **121**(3):465-77. *These authors are equally contributed to this work.
3. Yamada Y, Jackson-Grusby L, Linhart H, Meissner A, Eden A, Lin H, Jaenisch R. 2005. Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(38):13580-5.

抄 録
応 用 編

Plasmin inhibition reduces lymphoid tumor growth in mice by suppressing matrix metalloproteinase-9 dependent myeloid cell recruitment

Beate Heissig, Makoto Ishihara, Koichi Hattori

Frontier Research Initiative, The Institute of Medical Science,
The University of Tokyo

Lymphomas are a heterogeneous group of malignancies of the lymphoid system that account for approximately 75,000 new tumor cases every year. Activation of the fibrinolytic system during lymphoma progression is a well-documented clinical phenomenon. But the mechanism by which the fibrinolytic system can influence lymphoma progression has been elusive. Aside from fibrinolysis, plasmin (Plm) can activate several matrix metalloproteinases (MMPs) *in vitro* and *in vivo*, thereby e.g. modulating hematopoiesis. Others and we could show that plasminogen (Plg)/ Plm can control normal and malignant neoangiogenesis, in part by altering the activity of MMP-9, a protease linked to the pathogenesis of various malignancies.

Our most recent study provides the evidence that blockade of Plg reduces T cell lymphoma growth by inhibiting MMP-9-dependent recruitment of CD11b⁺F4/80⁺ myeloid cells locally within the lymphoma tissue. Genetic plasminogen deficiency and drug-mediated Plm blockade delayed T cell lymphoma growth and diminished MMP-9 dependent CD11b⁺F4/80⁺ myeloid cell infiltration into lymphoma tissues. A neutralizing antibody against CD11b inhibited T cell lymphoma growth *in vivo*, which indicates that CD11b⁺ myeloid cells play a role in T cell lymphoma growth. Plg deficiency in T cell lymphoma bearing mice resulted in reduced plasma levels of the growth factors vascular endothelial growth-A (VEGF-A) and Kit ligand (KitL), both of which are known to enhance myeloid cell proliferation.

Collectively, the data presented in this study demonstrate a previously undescribed role of Plm in lymphoproliferative disorders and provide strong evidence that specific blockade of Plg represents a promising approach for the regulation of T cell lymphoma growth.

Publications

1. Heissig B, Lund LR, Akiyama H, Ohki M, Morita Y, Romer J, Nakauchi H, Okumura K, Ogawa H, Werb Z, Dano K, Hattori K. 2007. The plasminogen fibrinolytic pathway is required for hematopoietic regeneration. *Cell Stem Cell* 1(6):658-70.
2. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K. 2010. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood* 115(21):4302-12.
3. Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Gritli I, Rosenkvist J, Koizumi M, Okaji Y, Yamamoto R, Yagita H, Okumura K, Nishikori M, Wanaka K, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. 2011. Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b(+)/F4/80(+) myeloid cell recruitment. *Leukemia*. in press,

がん微小環境因子を利用した生体光イメージングモデルマウスの構築

近藤 科江、門之園 哲哉、口丸 高弘

東京工業大学大学院生命理工学研究科・生体分子機能工学専攻

最近の生体光イメージング技術や機器の進歩は日進月歩で、組織透過性が悪い光でも、マウスのような小動物では深部の情報を非侵襲的に得ることができるようになった。光を使った生体イメージングは、経済性に優れ、動物にも優しい手法であり、簡便性、安全性、迅速性、多様性の面で、他のモダリティよりも優位な点も多い。これまで、蛍光顕微鏡等を用いて培養細胞観察で得られた情報が、生体レベルで得られるようになってきた。基礎医学研究は、細胞レベルから個体レベルへとシフトしてきている。同一個体の深部の情報を非侵襲的に繰り返し得る事ができることから、疾患状態や治療過程の経時的観察が可能になり、使用する動物数の削減・得られる情報の精度向上・作業の軽減など多く利点をもたらす、創薬研究にも欠かせない手法になりつつある。従って、治療対象となる疾患部位が光イメージングで可視化することができる病態イメージングマウスは、生体レベルでの発症機序を知る上でも、治療薬や治療方法を開発する上でも重要である。我々は、がんの悪性化や治療不良に深くかかわっている低酸素誘導因子 HIF-1 の転写活性を可視化できるトランスジェニックマウスを構築して、がんの生体レベルでの発症機序の解明や治療薬開発のための病態イメージングモデルマウスの開発を試みている。HIF-1 活性は胎児や新生児においては全身に発現し、発生・成長過程に深く関与しているが、慢性的な規模の大きい活性化は成人の正常組織ではおこらず、虚血性疾患やがん・慢性炎症疾患状態と深く関わっている。従って、慢性的な HIF-1 活性を感度良くイメージングできれば、疾患部位の早期発見に繋がると期待できる。現時点では、発生初期のがんを検知する事はできていないが、今後光イメージング機器の進歩に伴い、より感度良く観察できるようになれば、がんの発生初期からの観察が可能になり、生体レベルでのがん化機構の解明に繋がると期待される。

参考文献

1. Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Ushiki T, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. 2010. In vivo imaging of HIF-active tumors by an oxygen-dependent degradation protein probe with an interchangeable labeling system. *PLoS One* 5(12):e15736.
2. Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. 2009. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Sci* 100(8):1366-73.

3. Kizaka-Kondoh S, Itasaka S, Zeng L, Tanaka S, Zhao T, Takahashi Y, Shibuya K, Hirota K, Semenza GL, Hiraoka M. 2009. Selective killing of hypoxia-inducible factor-1-active cells improves survival in a mouse model of invasive and metastatic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **15**(10):3433-41.
4. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. 2005. Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals. *Mol Imaging* **4**(3):182-93.