慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ADAM10による腸管腫瘍形成機構の解明
Sub Title	Mechanism of intestinal tumor formation through ADAM10
Author	股野, 麻未(Matano, Mami)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	我々は, ADAM10 floxマウスとvillin-CreERマウスを交配させ, 上皮特異的なADAM10ノックアウトマウスを作製した。タモキシフェンによるノックアウト誘導により, 腸管上皮の著名な胚細胞の数の上昇と幹細胞の減少を観察しえた。ADAM10ノックアウト上皮は幹細胞機能分化および分化亢進のため, 継時的な消失を示した。ADAM10はNotchリガンドの細胞内ドメインの切断によるシグナル活性化に関与しており, 本ノックアウトマウスではNotchシグナル活性の低下を認めたことから, Notchシグナル制御異常が幹細胞消失を誘導したと考えられた。 Our research group generated an epithelium specific ADAM10 knock-out mice through crossing ADAM10 flox mouse with villin-CreER mice. Tamoxifen induced knock out resulted in increased goblet cells and decreased intestinal stem cells. This can be explained by increased stem cell differentiation. ADAM10 is involved in Notch signal activation through degradation of the intracellular domain. Indeed, ADAM10 knock-out intestinal epithelium inactivated Notch signal, resulting in loss of intestinal stem cells.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2014 ~ 2015 課題番号 : 26860528 研究分野 : 消化器内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26860528seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　６　月　　６　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2014～2015
課題番号：　２６８６０５２８

研究課題名（和文）ADAM10による腸管腫瘍形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of intestinal tumor formation through ADAM10

研究代表者
股野　麻未（Matano, Mami）

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：２０４３９８８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は，ADAM10 floxマウスとvillin-CreERマウスを交配させ，上皮特異的なADAM10ノックアウトマウスを作製した．タモキシフェンによるノックアウト誘導により，腸管上皮の著名な胚細胞の数の上昇と幹細胞の減少を観察しえた．ADAM10ノックアウト上皮は幹細胞機能分化および分化亢進のため，継時的な消失を示した．ADAM10はNotchリガンドの細胞内ドメインの切断によるシグナル活性化に関与しており，本ノックアウトマウスではNotchシグナル活性の低下を認めたことから，Notchシグナル制御異常が幹細胞消失を誘導したと考えられた．

研究成果の概要（英文）：Our research group generated an epithelium specific ADAM10 knock-out mice through crossing ADAM10 flox mouse with villin-CreER mice. Tamoxifen induced knock out resulted in increased goblet cells and decreased intestinal stem cells. This can be explained by increased stem cell differentiation.
ADAM10 is involved in Notch signal activation through degradation of the intracellular domain. Indeed, ADAM10 knock-out intestinal epithelium inactivated Notch signal, resulting in loss of intestinal stem cells.

研究分野：　消化器内科学

キーワード：　下部消化管学

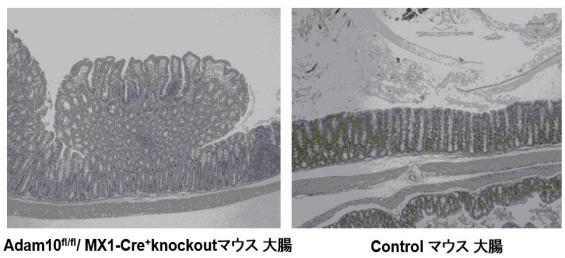
１．研究開始当初の背景

ADAM（A Disintegrin And Metalloproteinase Domain-containing protein）ファミリーは，炎症性サイトカインをはじめ，各種増殖因子やサイトカインの前駆体タンパク質等を切断して活性型因子を放出するプロテアーゼとして働く． ADAM ファミリーの一つである ADAM10 は細胞表面に発現し，接着分子や細胞外ドメインの切断に関与している．HEXGJNLGXXHD 配列を認識モチーフとし，Notch 細胞外ドメイン，HB-EGF，TNF-αや E-cadherin 標的分子とすることが報告されている．

ADAM10 ファミリーは大腸癌において多くの変異が認められているが（Woold LD et al. Science 2007），それらが腫瘍抑制遺伝子と働いているかどうか，その機能については不明な点が多い．

２．研究の目的

これまでの研究により，インターフェロンαにより誘導される Mx-1 プロモーターを利用した MX1-Cre は，pIpC 投与による血中インターフェロンα上昇に伴い，血球系細胞，腸管上皮細胞や線維芽細胞において loxP 配列の組み換えを引き起こすことが知られている．我々の研究グループは $Adam10^{fl/fl}$/MX1-Cre^{+} knockout（KO）マウスにおいて，骨髄増殖性疾患を認めることを報告しているが（Yoda M et al. Blood 2011），同時に腸管に腫瘍形成を認めることを見出した（図 1，未発表データ）．ADAM ファミリーによる腸管腫瘍形成機構は不明であり，本研究では未発表データに基づき，分子遺伝学的および細胞生物学的手法を用いて ADAM10 の腸管上皮幹細胞に対する機能的役割を解明することを目的とした．



$Adam10^{fl/fl}$/ MX1-Cre^{+}knockoutマウス 大腸　　Control マウス 大腸

図 1．$Adam10^{fl/fl}$/ MX1-Cre^{+} knockout マウスの腸腫瘍形成

３．研究の方法

（1）$Adam10^{fl/fl}$/MX1-Cre^{+} knockout マウスポリープを用いた機能解析

$Adam10^{fl/fl}$/MX1-Cre^{+} knockout マウスポリープの免疫染色評価に加え，ポリープより樹立したオルガノイドを用いて，分子生物学的および細胞生物学的解析を行う．

（2）腸管上皮特異的な $Adam10^{fl/fl}$ knockout マウスの作製

ADAM10 遺伝子の前後に loxP 配列を挿入した $Adam10^{fl/fl}$ マウスを用意し，腸管上皮細胞特異的に Cre を発現する villin-Cre^{+}マウスと交配を行う．それにより組織特異的，時期特異的な ADAM10 の knockout を行うことのできる $Adam10^{fl/fl}$ /villin-Cre^{+} マウスを作製する（図 2）．

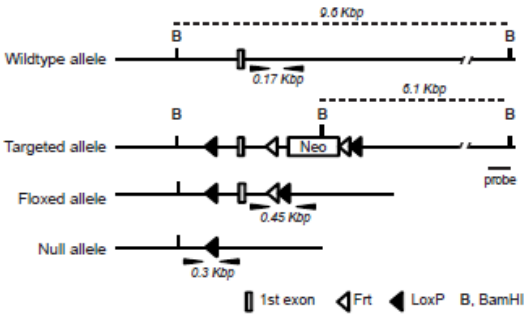
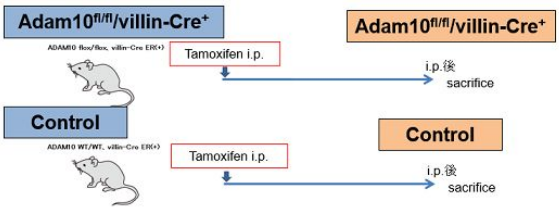


図 2.Generation of $Adam10^{fl/fl}$ mice

（3）$Adam10^{fl/fl}$ /villin-Cre^{+} マウスを用いた ADAM10 の腫瘍形成機構の解明

Cre-loxP システムを用いた Conditional knockout マウスではタモキシフェンを腹腔内投与することで標的遺伝子の組織特異的，時期特異的な knockout が可能となる．$Adam10^{fl/fl}$ /villin-Cre^{+} マウスを用いて腸管上皮細胞特異的，線維芽細胞特異的に ADAM10 を knockout するラインに分けて，腸ポリープ形成を認めるか観察し，腸ポリープ発生の原因となる細胞を特定する．



（4）ADAM10 阻害薬 GI254023X の治療効果の検証

ADAM10 阻害薬である GI254023X をヒト大腸がんより樹立した大腸がんオルガノイドに投与を行い，その治療効果の検討を行う．

４．研究成果

我々は，ADAM10 flox マウスと villin-CreER マウスを交配させ，上皮特異的な ADAM10 ノックアウトマウスを作製した。タモキシフェンによる ADAM10 ノックアウト誘導により，腸管上皮の著明な杯細胞の数の上昇と幹細胞の減少を観察しえた．本形質は MX1-Cre^{+} knockout マウスでは認められなかった．ADAM10 ノックアウト上皮は幹細胞機能分化および分化亢進のため，継時的な消失を示した。同様な形質はオルガノイドによる腸管上皮幹細胞培養でも確認できた．ADAM10 は Notch リガンドの細胞内ドメインの切断によるシグナル活性化に関与しており，本ノックアウトマウスでは Notch シグナル活性の低下を認めたことから，Notch シグナル制御異常が幹細胞消失を誘導したと考えられた．

我々は，さらに ADAM10 阻害薬である GI 254023X をオルガノイドまたは野生型マウスに投与し，Notch 活性の阻害と杯細胞分化亢進，幹細胞消失を確認した．次に，ADAM10 阻害薬の治療効果を検証するため，ヒト大腸がんより樹立した大腸がんオルガノイドに対し，GI 254023X の投与を行った。残念ながら大腸がんオルガノイドに対しては杯細胞分化作用および幹細胞抑制作用を示さず，ADAM10 阻害単剤による治療効果は低いことが示唆された．大腸がんでは ADAM10 のオルソログである ADAM17 を発現しており，抵抗性の原因となったと考えられた．

今後，他剤との併用により ADAM10 阻害薬を用いた抗癌治療開発のさらなる検討が必要である．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

① Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Ohta Y, Nanki K, Kawasaki K, Nakazato Y, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, Sato T. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements. Cell Stem Cell.査読あり（in press）
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.003

② Mihara E, Hirai H, Yamamoto H, Tamura-Kawakami K, Matano M, Kikuchi A, Sato T, Takagi J. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/α-albumin. Elife. 査読あり. 2016 Feb 23;5.
DOI: 10.7554/eLife.11621.

③ Fujii M, Matano M, Nanki K, Sato T. Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. Nat Protoc. 査読あり. 2015 Oct;10(10):1474-85.
DOI: 10.1038/nprot.2015.088

④ Matano M, Nakajima K, Kashiwagi Y, Udaka S, Maehashi K. Sweetness characterization of recombinant human lysozyme. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 査読あり. 2015 Oct;188:8-14.
DOI: 10.1016/j.cbpb.2015.05.009.

⑤ Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. Nat Med.査読あり. 2015 Mar;21(3):256-62.
DOI: 10.1038/nm.3802

⑥ Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between RORγt+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 査読あり. 2014 Aug;20(8):1426-34.
DOI: 10.1097/MIB.0000000000000105.

〔産業財産権〕
○出願状況（計 1 件）

名称：細胞培養培地、培養方法、及びオルガノイド
発明者：佐藤俊朗，股野麻未，高木淳一
権利者：学校法人慶應義塾
種類：特許
番号：特願 2016-029060
出願年月日：2016 年 2 月 18 日
国内外の別：国内

６．研究組織

(1)研究代表者

股野　麻未（MATANO MAMI）
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：20439889