

Title	大腸炎関連大腸がん・異形成の病態解明
Sub Title	Elucidation of mechanism of colitis associated cancer and dysplasia
Author	中里, 圭宏(Nakazato, Yoshihiro)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>潰瘍性大腸炎では大腸がんリスクが高い。慢性炎症による影響が指摘されているが未だにその機序は不明である。発症したがんではTp53変異が高率にみられることから、発がんに必要な因子と考えられている。そこでTp53KOマウスを用いて発がん機序解明を目的とした。潰瘍治癒過程で回復起点となるクリプトが存在し、そのクリプトがTp53変異幹細胞であれば、変異領域が形成されると考えられ、Tp53変異領域形成の一機序の可能性が示唆された。変異領域面積や炎症期間に相関して発がんリスクは上昇した。また、発がんにはβ-カテニン変異が高率に認められた。</p> <p>Patients with ulcerative colitis have an increased risk of colorectal cancer. Studies have pointed out that chronic inflammation can lead to cancer, but the mechanism by which it does is still unknown. Because Tp53 mutations are commonly found in colitis-associated cancer, they are thought to be an important factor in carcinogenesis. This study aimed to elucidate the mechanism of colitis-associated cancer using Tp53KO mice. While some crypts are thought to be starting points for recovery in ulcer healing, a mutated lesion will form in a Tp53 mutated crypt, suggesting a possible mechanism of Tp53 mutation lesion formation. The risk of the development of cancer increased in correlation with the size of the lesion bearing the mutation and the duration of inflammation. Beta-catenin mutations were frequently found in the cancers that developed in the Tp53KO mice.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2017～2018 課題番号：17K15969 研究分野：消化器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K15969seika

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.

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15969

研究課題名(和文)大腸炎関連大腸がん・異形成の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of colitis associated cancer and dysplasia.

研究代表者

中里 圭宏(Nakazato, Yoshihiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：90772400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎では大腸がんリスクが高い。慢性炎症による影響が指摘されているが未だにその機序は不明である。発症したがんではTp53変異が高率にみられることから、発がん重要な因子と考えられている。そこでTp53KOマウスを用いて発がん機序解明を目的とした。潰瘍治癒過程で回復起点となるクリプトが存在し、そのクリプトがTp53変異幹細胞であれば、変異領域が形成されると考えられ、Tp53変異領域形成の一機序の可能性が示唆された。変異領域面積や炎症期間に相関して発がんリスクは上昇した。また、発がんにはβ-カテニン変異が高率に認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎は原因不明の慢性炎症性腸疾患であり、年々増加傾向にあり本邦で16万人を越える罹患者が登録されている。長期間罹患による大腸がんリスクが高いが、未だにその発がん機序は不明である。好発年齢は20歳代であり、若年者に発症した場合の社会的損失が大きい。さらに通常の大腸がんとは異なり、潰瘍性大腸炎関連大腸がんでは、異形領域が1か所でも出現した場合は同時多発性に発症しているリスクが高いため侵襲的な全大腸切除がよきなくされる。この潰瘍性大腸炎関連大腸がんの機序・リスク因子を解明することは社会的損失を防ぐ重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Patients with ulcerative colitis have an increased risk of colorectal cancer. Studies have pointed out that chronic inflammation can lead to cancer, but the mechanism by which it does is still unknown. Because Tp53 mutations are commonly found in colitis-associated cancer, they are thought to be an important factor in carcinogenesis. This study aimed to elucidate the mechanism of colitis-associated cancer using Tp53KO mice. While some crypts are thought to be starting points for recovery in ulcer healing, a mutated lesion will form in a Tp53 mutated crypt, suggesting a possible mechanism of Tp53 mutation lesion formation. The risk of the development of cancer increased in correlation with the size of the lesion bearing the mutation and the duration of inflammation. Beta-catenin mutations were frequently found in the cancers that developed in the Tp53KO mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸炎関連大腸がん 潰瘍性大腸炎 慢性炎症 Tp53 field cancerization

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎患者は年々増加傾向であり、長期罹患ではその高い発がん率が大きな問題となっている¹⁾。大腸炎関連大腸がん(CAC)には Tp53 変異異形成が特徴とされているが、Tp53 変異のみでは発がんは認めない。慢性的な炎症暴露により、Tp53 変異を特徴とする前がん病変(異形成)を経て発がんすることが知られている²⁾。こうした異形上皮は2次元的な拡がりを示す領域形成から、field cancerization と称されている³⁾⁴⁾。この異形成上皮の領域が同時多発的な CAC を導く。申請者は慢性炎症により Tp53 変異幹細胞が領域形成に関連すると考え、Tp53 変異上皮幹細胞の制御異常が異形成領域の拡大に寄与し、CAC の発がん母地となると考え本研究計画を考案した。

2. 研究の目的

- (1) CAC 発症には Tp53 変異が特徴的であり、field cancerization を有することから、Tp53 変異上皮幹細胞に慢性炎症が影響し、field cancerization を形成し発がんに至る機序についてマウスモデルを用いて解明することを目的とした。
- (2) オルガノイド培養(腸管上皮幹細胞体外培養)を用いて in vivo で慢性炎症を再現し、WT、Tp53K0 クリプトの炎症性サイトカイン耐性や phenotype を検証する。
- (3) マウスモデルで発がんのリスク因子およびがんの遺伝子変異の検討する。

3. 研究の方法

- (1) 慢性炎症により p53 変異細胞が領域形成をされると考えられているため、Tp53K0 マウスに Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS)を投与し、腸管慢性炎症を誘導する。LacZ 遺伝子を挿入することで Tp53K0 クリプトの動態が可視化できる。このマウスモデルは潰瘍性大腸炎の慢性炎症を疑似化し、可視化することで field cancerization 発生を検証することができる。さらに WT でも同様に調べ、正常クリプトにおける慢性炎症下の動態と比較する。
- (2) Tp53K0 マウス腸管から選択的に WT、Tp53K0 クリプトを抽出し体外培養する。in vitro の実験系で炎症性サイトカイン耐性について評価し、耐性メカニズムを解明する。さらに Tp53K0 オルガノイドに炎症性サイトカインを継続投与することで in vitro で慢性炎症を再現し phenotype を検証する。
- (3) Tp53K0 マウスに DSS 投与して発がんモデルを作成する。Tp53K0 誘導率や DSS 投与方法で発がんリスク因子を検討する。発がんしたクリプトを抽出し体外培養する。培養したゲノムを抽出し exome sequence にて遺伝子変異を検索する。

4. 研究成果

(1) 以前のデータにおいて VillinCreERT2 : RosaLacZ/Tp53^{WT/WT} マウスにタモキシフェン (TAM) で LacZ 領域を誘導し DSS で慢性炎症を誘導した結果, LacZ 領域形成を認めていた. 同様に VillinCreERT2:RosaLacZ/Tp53^{f1/f1} マウスを用いて, タモキシフェン(TAM)で Tp53KO 領域を誘導し同時に LacZ で可視化した. TAM のみでは LacZ 領域の形成はみられず, DSS により慢性炎症を誘導することで Tp53KO 領域形成を認めた

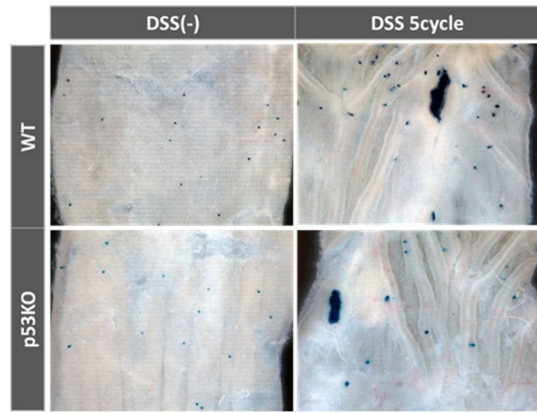


図 1

(図 1). これは非炎症下において Tp53KO クリプトが領域形成における優位性がないことを示している. しかし, WT においても LacZ 領域形成が認められたことから, 粘膜治癒の機構として, 潰瘍の回復起点となったクリプトがモノクローナルな領域形成することが示された. しかし, WT と Tp53KO の領域形成における有意差は確認できず(図 2), Tp53KO クリプトの慢性炎症に対する優位性を証明することはできなかったが, この Tp53KO 領域が field cancerization の一機序である可能性が示された.

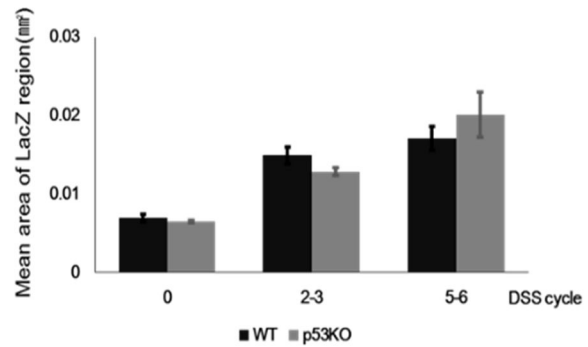


図 2

(2) Lgr5-EGFP-IRES-CreER/tdTomato^{f1/WT}/p53^{f1/f1} マウスを用いて, TAM 投与することで Tp53KO クリプトと WT クリプトを選択的に体外培養することが可能である. 同一マウスで各々クリプトをモノクローナルに培養した. 潰瘍性大腸炎患者で発現が上昇している炎症性サイトカインは多数存在するが, その中で特に関連が強いと考えられる IFN, IL1, IL-8, IL17A を選択した. 予備実験として, 体外培養した WT クリプトにこの 4 種のサイトカインを単剤またはコンビネーションで投与し, 生存率を検証したところ, IFN + IL17A が最も生存率が低く, 強い炎症を有すると考えた. 次に体外培養した Tp53KO クリプトと WT クリプトに IFN + IL17A を投与し, 生存率を検証した. in vitro では Tp53KO クリプトは WT と比較して炎症耐性があることが示されたが(図 3), in vivo では LacZ 領域に有意差がみられなかったことから, Tp53KO クリプトの炎症耐性の優位性は軽微であることが示唆される. in vitro で慢性炎症を

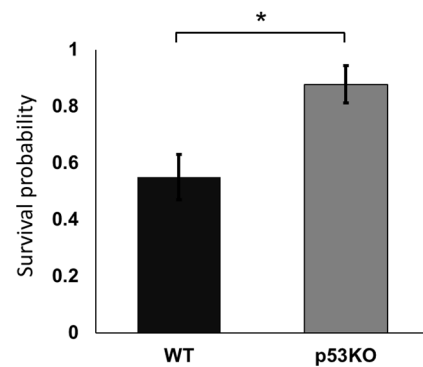


図 3

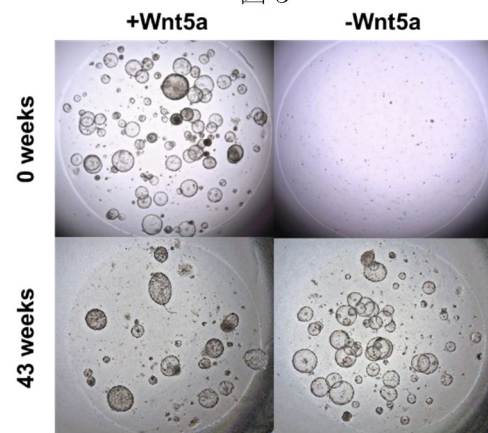


図 4

Gut 2004, 53(5):710-716.

- 3) Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953, 6(5):963-968.
- 4) Leedham SJ, Graham TA, Oukrif D, McDonald SA, Rodriguez-Justo M, Harrison RF, Shepherd NA, Novelli MR, Jankowski JA, Wright NA: Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* 2009, 136(2):542-550.e546.