

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ  
「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究開発領域  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation  
(AMED-CREST) “Creation of Basic Medical Technologies to Clarify and  
Control the Mechanisms Underlying Chronic Inflammation” research area
- 研究開発課題名： (日本語) 消化器がんの発生・進展過程における慢性炎症の誘導と役割の解明  
(英語) The roles of chronic inflammation in gastrointestinal cancer development and  
malignant progression
- 研究開発担当者 (日本語) 金沢大学 がん進展制御研究所 教授 大島 正伸  
所属 役職 氏名： (英語) Cancer Research Institute, Kanazawa University, Professor, Masanobu Oshima
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語)  
開発課題名： (英語)  
研究開発分担者 (日本語) 所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

本課題は、慢性炎症反応による消化器がん発生・悪性化誘導の分子機構を明らかにし、慢性炎症の制御によりがん化を制御することを目的として、大島チームが推進している。その目的達成のため、下記3項目について研究を推進し、平成 28 年度は以下の成果が得られた。

#### (1) 消化器がんにおける炎症反応誘導および慢性化機構

再生腸管粘膜上皮細胞における TGF- $\beta$ シグナルの遮断は、浸潤性大腸がん発生を誘導し、浸潤がん組織では炎症反応が数ヶ月にわたって持続して慢性化している。マウス胃上皮細胞オルガノイドを用いたマイクロアレイ解析を実施し、TGF- $\beta$ シグナルを遮断した上皮細胞では CCL6 や CCL9 等のケモカイン発現が誘導されることを明らかにし、腫瘍上皮細胞自身が炎症細胞の浸潤を誘導すると考えられた。また、p53 遺伝子変異により粘膜下浸潤が誘導されたマウス大腸がん細胞からオルガノイドを樹立し、発現解析および Ingenuity Pathway 解析を実施した結果、TLR/MyD88 や NF- $\kappa$ B 経路などの自然免疫および炎症反応の有意な活性化が認められた。したがって、p53 変異を有する多くのがん組織では、がん細胞自身で活性化する炎症性経路により、持続的にがん組織における炎症反応を誘導している可能性が考えられた。

#### (2) 慢性炎症による消化器がん発生促進機構

ヒト胃がんおよびマウス胃がんモデル (Gan マウス) の腫瘍組織では、炎症性サイトカイン発現が亢進している。TNF- $\alpha$  依存的に胃がん細胞で発現誘導される遺伝子群を特定し、その中から、RNA Scope により Noxo1 遺伝子が分裂期の胃がん細胞に特異的に発現することを明らかにした。また、COX-2 依存的な胃炎発生モデル (K19-C2mE マウス) に NOX 阻害薬を投与した結果、炎症依存的な胃上皮細胞の増殖亢進による過形成が顕著に抑制されることを明らかにし、NOX1 複合体依存的な活性酸素種 (ROS) が腫瘍細胞増殖促進に関与する可能性を示した。また、ヒトおよびマウス胃がん細胞で炎症依存的に発現誘導する microRNA 群を特定し、最も強い誘導が見られた miR-135b の発現が IL-1 $\beta$  により誘導されることを明らかにした。さらに、K19-C2mE マウスにおいて miR-135b を欠損させると、粘膜過形成が有意に抑制することを明らかにし、さらに miR-135b の新規標的遺伝子の同定を行った。以上の結果から、炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  は、Noxo1 および miR-135b の発現を誘導し、それぞれのシグナル活性化により腫瘍細胞の増殖亢進に作用すると考えられた。

#### (3) 慢性炎症による消化器がん悪性化促進機構

TGF- $\beta$  遮断により発生する浸潤性大腸がん細胞では Stat3 がリン酸化して活性化していることから、がん悪性化における Stat3 の役割について遺伝子欠損マウスを用いて解析した。その結果、Stat3 は単離された正常腸管幹細胞の増殖に必須であり、Stat3 遺伝子を欠損した上皮細胞は、オルガノイド形成および粘膜傷害からの再生が抑制されることを明らかにした。しかし、Wnt シグナル活性化により幹細胞増殖に関する Stat3 依存性が認められなくなることから、消化管上皮幹細胞の生存・増殖に関して Wnt シグナルと Stat3 のクロストークが考えられた。さらに、Stat3 による幹細胞生存に関与する責任因子として細胞接着関連遺伝子群を候補として特定した。

To understand the induction mechanisms of chronic inflammation in gastrointestinal cancer tissues and its roles in cancer development and malignant progression, Oshima team has performed the following research projects according to the three category plans.

(1) The induction mechanism of chronic inflammation in gastrointestinal cancer

It has previously been shown that suppression of TGF- $\beta$  signaling in the regenerative intestinal mucosa causes invasive colon cancer development, and inflammation is continuously associated during cancer development over several months. DNA microarray of gastric epithelial cell-derived organoids revealed that expression of chemokines CCL6 and CCL9 was upregulated by TGF- $\beta$  suppression, which may further recruit inflammatory cells to tumor tissues. Moreover, we have established organoid cultures from malignant intestinal tumors of *Apc* and *Trp53* compound mutant mice, and RNA sequencing and Ingenuity Pathway analysis were performed. Notably, p53 gain-of-function mutation causes activation of NF- $\kappa$ B and MyD88 inflammatory and innate immune pathways. These results indicate that malignant cancer cells can induce inflammatory responses by cancer cell intrinsic signaling.

(2) Promotion of gastrointestinal tumor development by chronic inflammation

Gastric tumor model mice (Gan mice) develop inflammation-associated tumors in the stomach, and expression of inflammatory cytokines is upregulated in tumor tissues. Among the TNF- $\alpha$ -dependent upregulated genes in Gan mouse tumors, expression of Nox1 mRNA was detected in proliferating tumor cells by RNA scope. Moreover, treatment of gastritis mouse model (K19-C2mE mice) with NOX1 inhibitor suppressed inflammation-dependent hyperplasia of gastric mucosa, suggesting a role of NOX1/ROS signaling in tumor cell proliferation. Moreover, among upregulated microRNAs by gastric tumor epithelial cells of Gan mice in an inflammation-dependent manner, we selected miR-135b as the most significantly induced microRNA and found its expression to be induced by IL-1 $\beta$ . Gene disruption of miR-135b in gastritis mice resulted in significant suppression of hyperplasia. Furthermore, we determined candidate miR-135b target genes. These results indicate that inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , promote gastric tumorigenesis through acceleration of cell proliferation by induction of Nox1 and miR-135b, respectively.

(3) Malignant progression of gastrointestinal tumor by chronic inflammation

Stat3 is phosphorylated in the invading colon cancer cells of TGF- $\beta$ -suppressed mice, suggesting a role of Stat3 in malignant progression. Organoid culture experiments using Stat3 gene knockout mice have revealed that Stat3 is required for expansion of intestinal stem cells, because Stat3 disruption resulted in suppression of organoid formation as well as mucosal regeneration. However, Wnt signaling activation compensates these defects by Stat3 disruption, suggesting a cross talk between Wnt signaling and Stat3 in survival and clonal expansion of epithelial stem cells. Moreover, several adhesion-related molecules were identified as candidate factors for Stat3-dependent stem cell survival.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 5件）

1. Maeda Y, Echizen K, Oshima H, Yu L, Sakulsak N, Hirose O, Yamada Y, Taniguchi T, Jenkins BJ, Saya H, and Oshima M. Myeloid differentiation factor 88 signaling in bone marrow-derived cells promotes gastric tumorigenesis by generation of inflammatory microenvironment. *Cancer Prev Res*, 2016, 9, 253-63.
2. Echizen K, Hirose O, Maeda Y and Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E<sub>2</sub> and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci* 2016, 107, 391-7.
3. Oshima H, Echizen K, Maeda Y, and Oshima M. The role of chronic inflammation in the promotion of gastric tumorigenesis. *Chronic Inflammation*, Eds by Miyasaka M, Takatsu K. Springer, 2016, 173-86.
4. Oshima H, Nakayama M, and Oshima M. The role of inflammation responses in mouse gastric tumorigenesis. *Helicobacter pylori Research*, Eds by Backert S, and Yamaoka Y. Springer, 2016, 325-38.
5. 越前佳奈恵, 大島正伸. がんの発生と悪性を促進するマクロファージ. 医学のあゆみ (医歯薬出版), 2016, 258, 35-40.
6. 大島正伸. 特集「発がん」企画. 実験医学 (羊土社), 2016, 34, 2258-306.
7. 大島浩子, 越前佳奈恵, 大島正伸. 遺伝子変異と微小環境の相互作用による発がん. 実験医学. (羊土社), 2016, 34, 2294-9.
8. Nakayama M, Sakai E, Echizen K, Yamada Y, Oshima H, Han TS, Ohki R, Fujii S, Robine S, Voon DC, Tanaka T, Taketo MM, and Oshima M. Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation, *Oncogene*, 2017, in press.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The role of chronic inflammation in gastric cancer development. 口頭, Oshima M, The 16th Annual Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan, 2016/5/21, 国内.
2. 微小環境が促進する消化器がんの発生と悪性化進展, 口頭, 大島正伸, 第40回日本リンパ学会総会, 2016/6/25, 国内.
3. Inflammatory microenvironment that accelerates gastrointestinal tumorigenesis. 口頭, Oshima M, The 9th Annual Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium (SGCC), 2016/7/21, 海外.
4. 炎症依存的な胃癌発生における Nox1 複合体/ROS の機能解析. 口頭, 越前佳奈恵, 大島浩子, 大島正伸, 第69回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016/8/30, 国内.
5. 慢性炎症反応による発がん悪性化の誘導, 口頭, 大島正伸, 第89回日本生化学会大会. 2016/9/27, 国内.
6. Interaction of genetic alterations and microenvironment during generation of tumor heterogeneity, 口頭, Oshima M, 第75回日本癌学会学術総会 (コアシンポジウム), 2016/10/6, 国内.

7. Malignant progression of colon cancer cells by defined multiple driver gene mutations, ポスター, Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Oshima M, 第75回日本癌学会学術総会, (2016年10月6日, 横浜), 国内.
8. Functional and genetic analysis of Nox1/ROS in inflammation-associated gastric tumor development, ポスター, Echizen K, Oshima H, Oshima M, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.
9. Nuclear localized mutant p53 causes invasion and metastasis by drastic morphological changes of colorectal tumor gland, ポスター, Nakayama M, Sakai E, Echizen K, Oshima H, Han TS, Ohki R, Ochiai A, Voon DC, Taketo M, Oshima M. 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.
10. Chronic inflammation and Stat3 in intestinal tumorigenesis, 口頭, Oshima H, Nakayama M, Oshima M, 第75回日本癌学会学術総会 (シンポジウム), 2016/10/7, 国内.
11. MicroRNA-135b acts as node of convergence for multiple oncogenic pathways in gastrointestinal carcinogenesis, 口頭, Han TS, Voon DC, Oshima H, Oshima M, 第75回日本癌学会学術総会 (インターナショナルセッション), 2016/10/7, 国内.
12. Cancer malignant progression and microenvironment, 口頭, Oshima M, 第64回日本ウイルス学会学術集会 (シンポジウム), (2016年10月25日, 札幌), 国内.
13. Driver gene mutations and colon cancer malignant progression. 口頭, Oshima M, IGM Hokkaido Univ/CRI Kanazawa Univ International Joint Symposium, 2016/11/21, 国内.
14. Interaction of driver gene mutations and inflammation in gastrointestinal cancer promotion. 口頭, Oshima M, International Symposium of Cancer Center of Excellence-Innovative Research in Cancer Prevention and Treatment, 2016/11/28, 海外.
15. ドライバー遺伝子変異によるがんの新規悪性化誘導機構, 口頭, 大島正伸, 中山瑞穂, 坂井絵梨, 大島浩子, 第39回日本分子生物学会年会 (シンポジウム), 2016/12/2, 国内.
16. The role of chronic inflammation in gastric cancer development. 口頭, Oshima M, Seoul International Gastric Cancer Forum, 2016/12/3, 海外.
17. Cooperation of driver mutations and microenvironment for colon cancer development. 口頭, Oshima M, 21th Korea-Japan Cancer Research Workshop, 2016/12/23/, 海外.
18. Inflammatory microenvironment induces invasive colon cancer in the TGF- $\beta$  suppressed epithelia. ポスター, Oshima H, Nakayama M, Oshima M, The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience “Chronic Inflammation”, 2017/1/20, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. がんを育む微小環境：炎症とがんの関係, 大島正伸, 金沢大学市民公開講座, 2016/6/4, 国内.
2. The role of inflammation in gastric and colon cancer development, Oshima M, 延辺大学医学部講演会, 2016/7/25, 海外.
3. How to get published your results in the best scientific journal, Oshima M, 復旦大学がん研究所講演会, 2016/9/7, 海外.

4. マウスモデルを使った生きた疾患の理解, 大島正伸, 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手技術講習会, 2016/9/14, 国内.

(4) 特許出願

特願 2017-49202 号