慢性炎症と胃がん発生

炎症性微小環境と TNF- α による胃がん発生促進機序

大島 浩子

要約：慢性炎症反応は、発がん促進に関与すると考えられている。とくに、ピロリ菌感染に起因した胃がん発生では、炎症性サイトカインが腫瘍発生に関与する可能性が報告されている。我々は、炎症依存的胃がんを発生する *Gan* マウスと TNF- α (*Tnf*) および TNF-R1 受容体 (*Tnfrsf1a*) 欠損マウスを用いて、胃発がんにおける TNF- α /TNFR1 シグナルについて解析した。その結果、*Tnf*-/- *Gan* マウスと *Tnfrsf1a*-/- *Gan* マウスは、有為に腫瘍発生が抑制された。また、骨髓移植実験の結果から、骨髓由来細胞 (BMDCs) が発現する TNF- α が BMDCs の TNFR1 受容体を介した活性化により腫瘍発生促進に関与することが明らかとなった。さらに、マイクロアレイ解析結果から、TNF- α 依存的に腫瘍細胞で CD44 遺伝子の発現が誘導され、これが腫瘍細胞の腫瘍原性獲得に関わっている可能性が示された。したがって、TNF- α /TNFR1 シグナルを標的とする胃がん治療の可能性が示唆された。

1. はじめに

がん全体の約 15% は感染症に起因した慢性炎症反応が関与していることが報告されている (1, 2)。その中でも、ピロリ菌の感染に伴う慢性炎症は胃がん発生に重要と考えられている (3, 4)。IL-1 β や TNF- α は、炎症性サイトカインの一つで、これらの遺伝子の多型が胃がん発生リスクと相関することが示されている (5-7)。また、TNF- α (*Tnf*) や TNFR1 (*Tnfrsf1a*) 遺伝子ノックアウトマウスでは、発がん物質の投与により皮膚や腸管に発生する腫瘍が顕著に抑制される (8-10)。これらの結果から、炎症性サイトカインの中でも、TNF- α /TNFR1 シグナルが腫瘍発生を促進することが示唆される。

我々は、これまでにヒト胃がんと同じ分子機序で胃がんを発生する *Gan* マウスを開発した。*Gan* マウスの胃粘膜上皮では PGE₂ 産生と Wnt シグナルが亢進しており、これにより炎症を伴う腫瘍が発症する (11, 12)。Wnt シグナルの亢進は、ヒト胃がんの発生の重要な発がん経路の一つと考えられている (11, 13)。一方、COX-2/PGE₂ 経路は、胃がんを含む様々ながん組織で亢進が認められており、腫瘍発生で重要な役割を果たすことが知られている (14)。

我々は、*Gan* マウスと TNF- α 遺伝子 (*Tnf*) ノックアウトマウスと TNF- α 受容体遺伝子 (*Tnfrsf1a*) ノックアウトマウスを交配し、*Tnf*-/- *Gan* マウスおよび *Tnfrsf1a*-/- *Gan* マウスを作製し、腫瘍発生の変化について解析を行った。その結果、TNF- α /TNFR1 シグナルが胃上皮細胞で CD44 発現を誘導し、胃がん発生に関与している可能性が示された。

2. 結果および考察

胃がん発生における TNF- α の働きを調べるために、*Gan* マウスで TNF- α 遺伝子を欠損させた、*Tnf*-/- *Gan* マウスを作製した (15)。この結果、*Tnf*-/- *Gan* マウスの胃腫瘍形成は顕著に抑制され、同腹対照の *Tnf*+/+ *Gan* マウス胃腫瘍の約 40% 程度だった (図 1)。この結果は、TNF- α は腫瘍発生に重要であることを示している。*Tnf*+/+ *Gan* マウスでは、BrdU 陽性細胞が腫瘍領域のほとんどをしめているのに対して、*TNF*-/- *Gan* マウスでは、BrdU 陽性細胞が neck 領域の増殖帯に局在していた。このような増殖細胞の分布は、腫瘍ではなくて過形成に認められるものと類似しており、胃腫瘍組織以外の領域では、腫瘍細胞の分化が誘導されている可能性が示唆された。

キーワード：炎症、微小環境、TNF- α 、胃がん、マウスモデル

金沢大学 がん進展制御研究所 腫瘍遺伝学研究分野 (〒920-1192 金沢市角間町)

E-mail: hoshima@staff.kanazawa-u.ac.jp 原稿受領日：2014 年 2 月 20 日、依頼原稿

Title: The role of inflammatory cytokine TNF- α and microenvironment in mouse gastric tumorigenesis

Author: Hiroko Oshima

Gan マウスの腫瘍領域では、多くのマクロファージが浸潤して、それらが活性化していることを報告した(16). $\text{TNF-}\alpha$ や受容体の TNFR1 , TNFR2 が上皮細胞

で発現しているのか、浸潤したマクロファージを含む間質細胞で発現しているのかをレーザーマイクロダ イセクションにより組織を分けて回収して RT-PCR に より検討した. この結果, $\text{TNF-}\alpha$, TNFR1 , および TNFR2 は、腫瘍上皮細胞より、間質細胞で発現が高いことが明らかとなった. そこで、骨髄由来細胞 (bone marrow-derived cells : BMDCs) が発現する $\text{TNF-}\alpha$ の発がんにおける作用を解析するために、GFP トランスジェニックマウス ($\text{Tnf}^{+/+}\text{GFP}$) から骨髄を採取し、X 線照射した $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ マウスに移植した. この結果, $\text{Tnf}^{+/+}\text{GFP}$ マウスの骨髄移植により, $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ マウスの腫瘍形成は顕著に回復し、大きな胃がんが発生した (図 2A). $\text{Tnf}^{+/+}\text{GFP}$ マウスの骨髄を移植した $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ マウスの胃腫瘍組織では、間質に GFP 陽性細胞が多数浸潤していることから、腫瘍組織には、BMDCs が積極的に遊走すると考えられた (図 2B). 恐らく、炎症にともなうケモカイン発現が関与すると考えられる. また、多くの GFP 陽性細胞は、F4/80 陽性のマクロファージであることが免疫染色の結果から明らかとなった. 以上の結果から、多くのマクロファージを含む BMDCs が産生する $\text{TNF-}\alpha$ が胃がん発生を促進している可能性が考えられた.

$\text{TNF-}\alpha$ シグナル依存的に腫瘍組織で発現誘導する発がん促進因子を探索する目的で, $\text{Tnf}^{+/+}\text{Gan}$ マウスと $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ マウスそれぞれの胃腫瘍組織を用いたマイクロアレイ解析を行った. この結果, $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ マウスの腫瘍組織で $\text{Tnf}^{+/+}\text{Gan}$ マウスの胃腫瘍と比較して有為に発現が低下している遺伝子が約 150

図1 $\text{Tnf}^{+/+}\text{Gan}$ および $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ マウスに発生する胃腫瘍の大きさの比較
A: 約 50 週齢の $\text{Tnf}^{+/+}\text{Gan}$ と $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ に発生した胃腫瘍の肉眼写真. B: $\text{Tnf}^{+/+}\text{Gan}$ の胃腫瘍サイズを 100% としたときの各 Tnf 遺伝子型の Gan マウスの腫瘍サイズの比較. (文献 15 より改変)

図2 $\text{Tnf}^{+/+}\text{GFP}$ マウス骨髄細胞を移植した $\text{Tnf}^{-/-}\text{Gan}$ マウスの胃腫瘍病変
A: 肉眼写真 (左) および蛍光実体顕微鏡下写真 (右). GFP 陽性細胞浸潤のため腫瘍組織は GFP 陽性となる. B: 胃腫瘍領域の組織切片. GFP 抗体 (左) と F4/80 抗体 (右) で免疫染色. 腫瘍組織に多くの GFP 陽性の細胞が浸潤し、BMDCs が多く浸潤していることを示している. また、それらの多くは、F4/80 陽性細胞のマクロファージである. (文献 15 より改変)

個見つかった (図 3)。この遺伝子リストの中には、Wnt の標的遺伝子である CD44, CD133, SOX9 など、上皮細胞の幹細胞性および未分化性に関与する遺伝子が含まれていた。この中で、Wnt の標的遺伝子の一つであり、また、腫瘍細胞の幹細胞性に関与する可能性が報告されている、CD44 に着目した。RT-PCR 解析の結果、CD44 の発現量は、*Tnf*^{-/-}*Gan* マウス腫瘍で、*Tnf*^{+/+}*Gan* マウス胃腫瘍と比較して有為に減少した (図 4A)。また、免疫染色の結果、*Tnf*^{+/+}*Gan* マウスの腫瘍では、CD44 発現は、腫瘍組織全体の腫瘍上皮細胞で発現が認められた。一方、*Tnf*^{-/-}*Gan* マウスの腫瘍組織では、CD44 発現細胞数が顕著に減少していた (図 4B)。次に、*Tnf*^{-/-}*Gan* マウスの腫

瘍組織の CD44 の発現と胃上皮細胞の分化状態を免疫染色により解析した結果、CD44 を発現していない細胞で構成される領域では、上皮細胞は壁細胞 (H+K+ATPase 陽性) または、粘液細胞 (Muc5AC 陽性) 等へ分化していた。以上の結果から、TNF- α シグナルを介した、CD44 の発現誘導が胃腫瘍細胞の未分化性維持に関与し、腫瘍発生に関与する可能性が示唆された。

最後に、ヒト胃がん組織における CD44 発現と TNF- α 発現について RT-PCR 法により検討した。約 65% のヒト胃がん組織で TNF- α の発現誘導が認められ、また、約 74% で CD44 の発現上昇が認められた。さらに、TNF- α と CD44 の発現は、正に相関関係が

図 3 *Tnf*^{+/+}*Gan* および *Tnf*^{-/-}*Gan* マウス胃組織を用いたマイクロアレイの解析
Tnf^{-/-}*Gan* マウス胃腫瘍で、*Tnf*^{+/+}*Gan* マウス腫瘍組織と比較して、2 倍以上の発現低下を認めた遺伝子が約 150 個検出された。
*は、CD44 遺伝子の場所を示している。(文献 15 より改変)

図 4 *Gan* マウス胃腫瘍組織における CD44 遺伝子の発現

A: RT-PCR 解析結果, B: 免疫染色結果. *Tnf* 遺伝子欠損 *Gan* マウスでは、有意に CD44 の発現低下が認められた。(文献 15 より改変)

あることから、ヒト胃がん組織においても TNF- α 依存的に CD44 発現が誘導される可能性が考えられた (図 5). CD44 は、Wnt 標的遺伝子であるので、*Tnf*^{+/-}*Gan* と *Tnf*^{-/-}*Gan* でマウス腫瘍組織における非リン酸化 β -catenin レベルをウエスタンブロッティングで比較した結果、*Tnf*^{-/-}*Gan* では *Tnf*^{+/-}*Gan* に比較して、非リン酸化 β -catenin 量が減少していた (図 6). 以上の結果から CD44 発現が TNF- α によって直接誘導されるのではなく、TNF- α が Wnt シグナルを亢進し、Wnt 活性化により CD44 発現が誘導され、その結果として、腫瘍細胞での未分化性が維持されている可能性が考えられた.

これまでの *Gan* マウスと CD44 遺伝子ノックアウトマウスの交配実験の結果から、CD44 は、胃がん発生に重要であることが示され (17, 18), このメカニズム

図 5 ヒト胃がんサンプルの TNF- α と CD44 の発現解析
ヒト胃がんサンプルで、TNF- α と CD44 の発現に正の相関が認められた。(文献 15 より改変)

図 6 腫瘍組織における Wnt シグナル解析
Tnf 遺伝子欠損 *Gan* マウスの腫瘍領域では、*Tnf* 遺伝子が正常の *Gan* マウスと比較して、Wnt シグナルの低下が認められた.

として、活性化酸素 (ROS) 産生の抑制による腫瘍細胞の生存誘導が報告された. したがって、*Gan* マウス胃がん組織でも、TNF- α 依存的に ROS 産生が抑制される可能性が考えられ、今後の検討が必要である. また、マイクロアレイ解析結果から抽出された遺伝子群の中には、他にも腫瘍発生を促進する因子が含まれている可能性があり、今後の研究課題である.

3. おわりに

これまでに、胃がん発生には IL-1 β や IL-6 が関与している可能性がマウスモデルで示されており、本研究により TNF- α も胃がん発生に重要である可能性が示された. これらのサイトカインシグナルが、腫瘍細胞の増殖だけでなく、未分化性維持に関与する可能性は興味深い. 今後、ROS の制御も含めて詳細な分子機序を解明することにより、将来的に炎症反応の制御による胃がんの予防、治療の可能性へ展開することが期待される.

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない.

文 献

- 1) Coussens LM, et al. Nature. 2002;420:860-867.
- 2) Grivennikov SI, et al. Cell. 2010;140:883-899.
- 3) Peek Jr RM, et al. Nat Rev Cancer. 2002;2:28-37.
- 4) Fox JG, et al. J Clin Invest. 2007;117:60-69.
- 5) El-Omer EM, et al. Nature. 2000;404:398-402.
- 6) El-Omer EM, et al. Gastroenterology. 2003;124:1193-1201.
- 7) Mochado JC, et al. Gastroenterology. 2003;125:364-371.
- 8) Moore RJ, et al. Nat Med. 1999;5:828-831.
- 9) Arnott CH, et al. Oncogene. 2004;23:1902-1910.
- 10) Popivanova BK, et al. J Clin Invest. 2008;118:560-570.
- 11) Oshima H, et al. Gastroenterology. 2006;131:1086-1095.
- 12) Oshima H, et al. Cancer Sci. 2009;100:1779-1785.
- 13) Clemens WM, et al. Cancer Res. 2002;62:3503-3506.
- 14) Wang D, et al. Nat Rev Cancer. 2010;10:181-193.
- 15) Oshima H, et al. Oncogene. In press.
- 16) Oshima H, et al. Gastroenterology. 2011;140:596-607.
- 17) Ishimoto T, et al. Cancer Sci. 2010;101:673-678.
- 18) Ishimoto T, et al. Cancer Cell. 2011;19:387-400.

著者プロフィール

大島 浩子 (おおしま ひろこ)

金沢大学 がん進展制御研究所 腫瘍遺伝学研究分野, 助教, 薬学博士.

◇熊本大学薬学部卒業, 万有製薬つくば研究所 武藤研究室, 京都大学大学院医学研究科遺伝薬理研究室, (現)金沢大学がん進展制御研究所.

◇研究テーマ: マウスモデルを用いた消化管腫瘍発生メカニズムの解明.

◇趣味: 旅行, 読書 (推理小説), 組織切片を切ること.