

【研究紹介】

WntとCOX-2の相互作用による消化器癌発生機序の研究

Gastrointestinal carcinogenesis through simultaneous activation of Wnt and COX-2 pathways

金沢大学がん研究所 がん幹細胞研究センター腫瘍遺伝学研究分野

大 島 正 伸

はじめに

Wntシグナルは正常腸上皮の幹細胞維持に重要な役割を果たしていると考えられている。その制御因子の遺伝子変異によりWntシグナルが持続的に亢進する事が、多くの大腸癌の原因であり胃癌発生にも深く関わっていると考えられている。一方、COX-2は炎症の局所で誘導されるプロスタグランジン合成酵素である。COX-2の発現は癌組織でも誘導されており、非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) によりCOX-2活性を阻害すると消化管の腫瘍発生が抑制される事が知られている。このように、WntとCOX-2の二つの経路がそれぞれ消化器癌発生に極めて重要である事は確立されている。しかし、それらがどのように発癌に関与しているのかは未だ不明な点が多い。当研究室では消化器癌に関わる遺伝子改変・導入マウスを作製し、WntとCOX-2に着目しながら生体内での腫瘍発生について研究を進めている。

腸管腫瘍発生におけるWntとCOX-2

大腸癌の癌抑制遺伝子であるAPCは、Wntシグナルの細胞内伝達因子であるβ-cateninのリン酸化に必要な足場を提供する。APC欠損のためにリン酸化されなくなったβ-cateninは細胞内に蓄積し、その結果Wntシグナル標的因子の転写が活性化される。Wnt亢進に作用するAPC遺伝子変異は、大腸癌発生の多段階変異の最上流に位置していると考えられており、実際にAPC遺伝子ノックアウトマウスでは腸管全域に多数のポリープが自然発生した¹⁾。誘導型酵素のCOX-2は、発生直後の小さな腫瘍組織では発現が認められない。しかし、ポリープの大きさが直径約1mm程度になると腫瘍組織内の間質で発現が誘導される。ヒトの大腸癌では、癌細胞自身でのCOX-2発現が認められるが、ポリープの段階ではモデルマウスと同様に間質でCOX-2発現が検出される。COX-2経路が腫瘍発生に果たす役割を解明するため、COX-2遺伝子ノックアウトマウスを作製してAPC遺伝子ノ

ックアウトマウスとの交配実験を行なった結果、約80%のポリープ数の減少を認めた²⁾。この結果は、COX-2選択的阻害薬のrofecoxibを用いた投与実験によって薬理的にも確認した³⁾。以上の結果から、図1に示す腸管腫瘍発生機序が考えられる。すなわち、APC遺伝子欠損によりWntシグナルが亢進すると、腸上皮細胞は腫瘍化 (initiation) して増殖を始める。続いて、間質で発現誘導するCOX-2の経路が腫瘍細胞の増殖維持に作用している。腫瘍組織ではCOX-2と同時にPGE₂変換酵素のmPGES-1も誘導される (後述)。したがって、COX-2経路の遮断は有効な発癌予防手段と考えられる。しかし、COX-2選択的阻害薬には心臓に対する副作用があるので、癌予防に直接使用する事は困難である。

胃癌発生におけるWntとCOX-2

胃癌発生の分子機序は、大腸癌の多段階発癌のように明らかになっていない。胃癌発生とWntシグナルとの関係を示す結果が報告されているが、我々も約80例の胃癌組織を用いた免疫染色を行なった結果、半数あまりの43例でWntシグナル亢進を示すβ-cateninの核局在を認めた⁴⁾。したがって、胃癌症例の中には確かにWntシグナル亢進が発生原因になっているものがあると考えられた。しかし、胃癌では大腸癌のようにAPC遺伝子変異があまり検出されていないので、β-cateninの変異あるいは過剰発現などがWnt亢進の原因と考えられる。一方、アスピリンなどのNSAIDs服用者では胃癌発生率が低い事が報告されており、さらに胃癌発生の危険因子である*Helicobacter pylori*感染により胃粘膜でCOX-2が発現誘導される事も報告されている。これらの状況証拠から、胃癌発生もWntとCOX-2の異なる二つのシグナル経路が重要な役割を果たしていると推測された。しかし、腸管のようにマウスモデルを用いた遺伝学的な解析はほとんどなされていない。

COX-2経路活性化による粘液細胞化生と過形成

胃粘膜上皮細胞で転写活性のあるkeratin 19 (K19) 遺伝子プロモーターを用いて、COX-2およびmPGES-1の二つの誘導型酵素を発現するトランスジェニックマウスを作製した⁵⁾ (以下、K19-C2mEマウス)。mPGES-1は、COX-2により合成されるプロスタグランジンH₂ (PGH₂) をPGE₂に変換する酵素である。COX-2とmPGES-1の双方が大腸癌や胃癌を含めて多くの癌組織で発現誘導されている事が報告されている。K19-C2mEマウスの胃粘膜には過形成病変が認められた。組織学的には、酸性粘液を含む粘液細胞へ化生した上皮細胞が多く含まれていたため、metaplastic hyperplasiaと診断した (図2A,B)。過形成病変が大きく成長しても異形性を伴う腫瘍細胞は出現せず、80週齢のK19-C2mEマウスでもNSAIDsを投与すれば症状は消失した⁶⁾。また、これらの病変は必ずマクロファージ浸潤とその活性化による炎症反応をともっていた。さらに炎症性サイトカインで

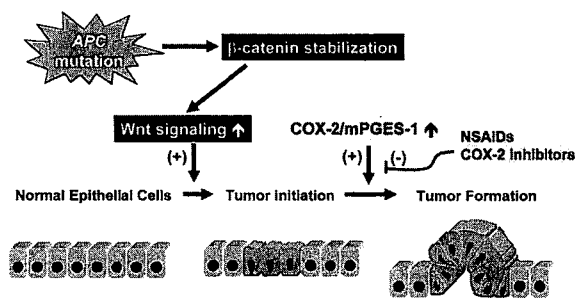


図1. 腸管腫瘍発生の模式図。APC遺伝子変異によりWntシグナルが活性化すると上皮細胞が腫瘍化する (initiation)。続いて、間質でCOX-2経路 (COX-2およびmPGES-1) が誘導されると腫瘍細胞の増殖が維持される。NSAIDsやCOX-2阻害薬は腫瘍増殖を抑制する。

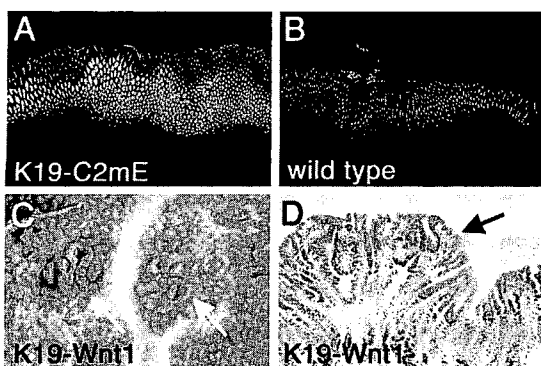


図2. (A) K19-C2mEマウスに発生する粘液細胞化生 (*H. pometia* レクチン染色). (B) 対照の野生型マウス. (C) K19-Wnt1マウスに発生する微小前癌病変 (実体顕微鏡写真). (D) 前癌病変の拡大図.

あるTNF- α 遺伝子を欠損させると、炎症とともにmetaplastic hyperplasia病変も消失した。以上の結果から、COX-2とmPGES-1の発現誘導によるPGE₂シグナルの活性化は、何らかの機序により胃粘膜での炎症を誘発し、それに伴い産生されるTNF- α などのサイトカインが細胞分化や増殖に影響を及ぼしていると考えられた。

Wnt経路活性化による微小前癌病変

Wntリガンドファミリーの中で、canonicalなWntシグナルを伝達するWnt1を選び、その遺伝子をK19プロモーターについでトランスジェニックマウスを作製した⁴⁾ (以下、K19-Wnt1マウス)。マウスの胃粘膜で未分化な上皮細胞に特異的に発現する因子としてTFF2がある⁵⁾。K19-Wnt1マウスの胃粘膜上皮に対してTFF2発現をin situ hybridizationで検出すると、野生型マウスに比較して明らかに未分化な上皮細胞数が増加した。すなわち、Wntシグナルが上皮細胞の分化を抑制している事が示唆された。さらに実体顕微鏡下での精査により、K19-Wnt1マウスの胃粘膜には限局して隆起した病変が散見された (図2C,D)。組織学的には未分化な上皮細胞で構成する腺管が異常に分岐しており、 β -cateninの細胞内の蓄積も顕著であったため、Wntシグナル亢進に起因した微小前癌病変と診断した。この病変の数は年齢とともに増加したが、腫瘍形成には至らなかった。

WntとCOX-2双方の活性化による腫瘍発生

APC遺伝子ノックアウトマウスでは、Wntシグナルの亢進により腫瘍化が起こると引き続いてCOX-2の発現が何らかの機序により誘導される。しかし、K19-Wnt1マウスの胃粘膜では、Wntシグナルが亢進しているにも関わらずCOX-2発現誘導は見られない。そこで、K19-Wnt1マウスとK19-C2mEマウスを交配して、ダブルトランスジェニックマウスを作製して解析した (以下、K19-Wnt1/C2mEマウス)。このマウスの胃粘膜ではWntとCOX-2/PGE₂双方のシグナルが同時に亢進している。図4に示すようにK19-Wnt1/C2mEマウスの胃には、顕著な血管新生による充血を伴う大きな腫瘍病変が発生した。組織学的には、異形性を示す腫瘍上皮細胞で構成され、 β -cateninの核への局在が認められた。また、間質での毛細血管が明らかに増加していた。これまでに、20匹以上のK19-Wnt1/C2mEマウスを剖検したが、全ての個体で同様の激しい腫瘍病変の発生を認めた。以上の結果は、胃癌発生過程でもWntシグナルとCOX-2経路の相互作用

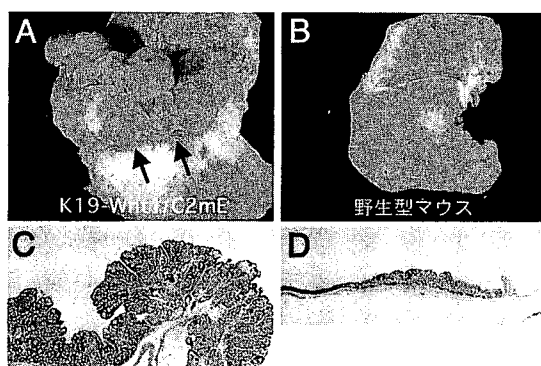


図3. K19-Wnt1/C2mEマウスの胃に発生する腫瘍 (A) と組織像 (C). (B) および (D) は野生型マウスの正常胃粘膜。

が重要である事を示している。すなわち、Wntシグナルが亢進してもCOX-2経路を遮断すれば、胃癌発生は予防できるものと考えられる。

おわりに

腸管ではAPC遺伝子の変異により腫瘍が発生し、続いて周囲の間質でCOX-2発現が誘導され、腫瘍細胞の増殖が維持される。胃でもWntシグナルとCOX-2発現の重要性がマウスモデルを用いた研究により明らかとなったが、腸管のようにWnt亢進に続いて自動的にCOX-2が発現誘導されない可能性が考えられた。腸管でのCOX-2誘導機序は未だ解明されていないが、最近の研究報告は腸内細菌の関与を示唆している。すなわち、正常腸内細菌も上皮細胞のToll-like receptor (TLR) を介した感染刺激により、腸管の恒常性を維持している⁷⁾。TLRによって活性化するNF- κ Bは直接あるいは間接的にCOX-2の発現を誘導するので、腫瘍組織でのCOX-2誘導に細菌感染刺激が関与している可能性がある。そう考えると、常在細菌の乏しい胃粘膜ではCOX-2発現が誘導されにくい事も推測できる。*Helicobacter*感染はCOX-2の発現誘導という作用からも胃癌発生に重要な役割を果たしていると考えられる。

最近になって、細胞内でのWntとPGE₂シグナルのクロストークについて報告された。それによるとGPCR受容体を介してPGE₂シグナルが細胞に伝わると、 β -cateninをリン酸化する複合体の形成が阻害されて、結果的にWntシグナルが亢進する⁸⁾。すなわち、COX-2経路の活性化は、Wntシグナルをさらに亢進させる方向に作用する。今後、これまでに作製したモデルマウスを用いて、生体内でも同様の反応が起こっているのかを解明して行きたい。

文 献

- 1) Oshima M, et al *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4482-4486
- 2) Oshima M, et al *Cell* 1996; 87: 803-809
- 3) Oshima M, et al *Cancer Res* 2001; 61: 1733-1740
- 4) Oshima H, et al *Gastroenterol* 2006; 131: 1086-1095
- 5) Oshima H, et al *EMBO J* 2004; 23: 1669-1678
- 6) Oshima M, et al *Cancer Res* 2005; 65: 9147-9151
- 7) Rakoff-Nahoum S, et al *Cell* 2004; 118: 229-241
- 8) Castellone MD, et al *Science* 2005; 310: 1504-1510