

令和6年度吉田富三賞を受賞して

金沢大学がん進展制御研究所・腫瘍遺伝学研究分野・教授

大島 正伸

はじめに

この度は、令和6年度(第33回)日本癌学会吉田富三賞受賞の栄誉に浴し、心より御礼を申し上げますと共に、福島県浅川町町長・一般社団法人浅川町吉田富三顕彰会理事長でいらっしやいます江田文男様、吉田富三記念館館長の真田秀男様、一般財団法人浅川町吉田富三顕彰会の皆様、また間野博行理事長をはじめとする日本癌学会役員の皆様、さらに今回ご推薦をいただいた金沢大学医薬保健研究域医学系呼吸器内科学の矢野聖二教授に心より感謝申し上げます。吉田富三賞は、日本のがん研究者にとりまして最高の栄誉であり、我が国のがん研究の基礎を築き、その発展を支えて来られた歴代受賞者の末席に加えさせて頂きました事に、身が引き締まる思いです。

吉田富三博士は、世界に先駆けて可移植性の腹水がんである「吉田肉腫」の樹立に成功されました。吉田肉腫の作成は、同じ条件で再現性のある動物モデルを用いたがん研究の礎を築き、それは、今日のマウスモデルやオルガノイドモデルを用いた、がんの本態解明に向けた個体レベルの研究の発展につながっています。私自身も、動物モデルを用いた遺伝学的手法でがん研究に取り組んでおり、その先駆となられました吉田富三博士の名前を冠する本賞を受賞致しましたことに感慨無量です。ここに、受賞の感謝の気持ちを込めて、私自身のこれまでのがん研究について、簡単に紹介いたします。

北海道大学獣医学部比較病理学教室でタール癌に出会う

私は、北海道大学獣医学部比較病理学教室において、牛や馬、そして鶏などの家畜の疾患を対象に、組織病理発生を学びました。私が所属した、比較病理学教室の初代教授は市川厚一博士で、東京大学医学部病理学教室において、山極勝三郎教授の助手として兎の耳にタールを塗擦することで、がんを発生させることに成功させた研究者でした。市川先生は、北海道大学に戻られてからもタールがんの研究を継続し、大学の標本室には、市川先生が作成した、ホルマリン漬けの兎耳のタールがんの標本がありました。それを見学したのが、私のがん研究に触れた最初の体験です。また、研究室には、市川先生が病理標本用のマップと呼ばれる板の裏に筆で力強く、「忍耐」、「努力」と書かれた書が、額に入れて飾られていました。その書を見ながら、病理学を学ぶ日々を過ごしましたが、市川先生は、異なる動物種の多様な病理像を比較観察することで、ヒトの疾患を理解するという意味を込めて、研究室名を「比較病理学」にされたと聞いています。当時、自分自身が動物モデルを用いたがん研究をするとは夢にも思いませんでしたが、今から思い返すと、学生時代に動物腫瘍の組織病理発生を学んだことが、その後、ヒトのがん研究に進むきっかけになったと思います。それからの

長い研究生活の中で、研究がうまく進まない時には、市川先生のマップの書を思い出して奮起することができました。

ジーンターゲティング技術による大腸発がん研究

大学院を修了してから製薬企業の研究所に就職し、分子生物学的手法を使って疾患関連遺伝子の探索研究に携わっていましたが、1992年に米国留学からジーンターゲティング技術を携えて帰国した武藤誠先生のもとで、ノックアウトマウスの開発研究に参画する機会に恵まれました。1990年前後に米国で、マウスの胚盤胞から iPS 細胞のように万能性を維持した胎仔性幹細胞 (Embryonic Stem Cell, ES 細胞) が樹立されました。ジーンターゲティングとは、ES 細胞を用いて相同組み換えにより特定の遺伝子を破壊 (ノックアウト) し、得られた組み換え ES 細胞を野生型マウスの胚盤胞にマイクロインジェクションで戻して雌マウスの子宮に移植し、目的遺伝子に変異を導入したマウスを作成する技術です。それぞれの過程に高い技術力が必要であり、未分化性を保ったまま ES 細胞を培養することも困難を極めており、挑戦的な研究領域でしたが、武藤先生が率いる研究グループで、私は当時発見されたばかりの大腸がんのがん抑制遺伝子、APC 遺伝子の変異モデル作成を行いました。

腸管の上皮幹細胞では、Wnt シグナルが幹細胞の未分化性を維持しています。APC は Wnt シグナルを負に制御する分子なので、遺伝子変異による機能欠損により、Wnt シグナルが恒常的に活性化し、それが大腸がん発生の最初のステップではないかと考えられていました。APC 遺伝子変異マウスの腸管を初めて実体顕微鏡下で観察した時、自分で導入した遺伝子変異により実際に生体内で発生した腸管腫瘍を、驚きを持って観察したのを覚えています。APC 遺伝子変異が大腸がん発生に関与することは、臨床検体の解析から示されていましたが、そのメカニズムの解明には、実験的な発がん再現モデルで検証する必要があります。そこで、APC 遺伝子変異マウスの腸管腫瘍を詳細に解析していくと、マウス個体は APC 変異をヘテロで持っているのに対して、全ての腫瘍細胞では野生型 APC 遺伝子を欠損し、ヘテロではなくなっていることがわかりました。この現象をヘテロ接合体欠失 (loss of heterozygosity, LOH) と呼びます。当時、遺伝的にヘテロで Rb 遺伝子変異を持つ小児の網膜で、野生型の Rb 遺伝子が LOH により欠損すると網膜芽細胞腫が発生することが報告され、「Knudson の2ヒット説」が提唱されていました。そこで、さらに詳細に APC 変異マウスの腸管を解析すると、単一のクリプトで APC 遺伝子の LOH を起こした細胞では、Wnt シグナル活性化が誘導されて幹細胞性を獲得し、腫瘍形成に至ることを明らかにし、APC 遺伝子の2ヒット変異が大腸がん発生の引き金になることを、個体レベルで証明することができました。世界中でジーンターゲティング技術を使った研究競争が始まり、複数の国内外の研究室で APC 遺伝子変異マウスモデルが作成されましたが、2 ヒット変異による発がんを証明した私達の研究成果は、米国科学アカデミー紀要に論文として発表し、若きリーダーだった武藤先生と祝杯をあげました。

COX-2/PGE2 経路の阻害による大腸がんの予防

現在では、慢性炎症が発がんに関与することが良く知られていますが、炎症とがんの関係について明らかになって来たのは比較的最近の事です。今から 150 年ほど前に、ドイツの病理学者であるウィルヒョウは、がん組織は白血球浸潤がともなうこと観察し、がんの発生には炎症反応が関与する可能性を指摘しました。しかし、分子生物学の発展により、相次いでがん遺伝子やがん抑制遺伝子が発見され、研究の主流は遺伝子解析となり、炎症反応とがんの関係については大きく注目されること無く、約 100 年が経過します。1990 年代になって、アスピリンなどの非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) を長期服用する人達では、大腸がんによる死亡率が有意に低いことが論文報告されました。さらに、シクロオキシゲナーゼ (COX) のアイソフォームである COX-2 が炎症反応を誘導する酵素として発見され、発がんには COX-2 発現にともなう炎症反応が関与している可能性が考えられるようになって来ました。COX-2 はプロスタグランジンの生合成の律速段階を触媒する酵素で、下流で産生するプロスタグランジン E2 (PGE2) が、炎症反応の誘導に重要な役割を果たします。

この発表を受けて、多くの研究グループが、ラットの化学発がんモデルを使って、アスピリンをはじめ、スリダクやイブプロフェンなどの様々な NSAIDs の投与実験を行い、NSAIDs が腸管発がんを予防できる可能性を示す結果を報告しました。私達は、APC 遺伝子変異マウスを使った解析により、確かに COX-2 遺伝子の発現は正常の腸管では認められず、ポリープ組織だけで誘導されていることを確認しました。そこで、COX-2 遺伝子ノックアウトマウスを米国の研究グループから入手して、APC 遺伝子変異マウスとの交配実験を実施した結果、APC 遺伝子の LOH により Wnt シグナルを活性化させた腸上皮細胞は、確かに形態学的には腫瘍化しているのですが、そこで増殖を続けることができずポリープを形成することはありませんでした。これは、本当に驚きの結果で、遺伝子変異による発がんプロセスが始まっても、周囲で誘導される炎症反応を制御することにより、腫瘍形成を阻止できること示す結果となりました。この研究成果を発表した Cell 誌の論文は、これまでに 3000 回以上の引用があり、がんと炎症の関係について、大きなインパクトを与えることになりました。

この研究で、もう一つ重要な発見となったのは、COX-2 遺伝子の発現細胞に関することです。がんの発生は遺伝子変異や発現変化で説明できると考えられており、COX-2 もがん遺伝子として、がん細胞で発現して腫瘍形成を促進すると考えられていました。しかし、COX-2 遺伝子を LacZ 遺伝子と組み換えたマウスを作成し、個体内での COX-2 発現モニターを可能とした結果、COX-2 遺伝子発現は腫瘍細胞ではなく周囲の線維芽細胞で認められました。すなわち、上皮細胞での遺伝子変異と、周囲の間質反応での炎症経路の誘導が腫瘍形成に関与することを初めて明らかにすることができました。現在では慢性炎症反応が、がんの微小環境を形成し、発がん促進に作用することが明らかにされています。私達の研究成果は、COX-2 の阻害により、大腸発がんを予防できる可能性がある事を示しており、がんの化学予防の概念の樹立に大きく貢献しました。しかし、大手製薬企業で開発された COX-2 選択的阻害薬には、長期服用により予想されなかった心臓への副作用が見られ、私達の研究発表が

ら四半世紀過ぎた今でも、化学予防薬の開発には至っていません。ただし、微小環境での COX-2/PGE2 経路の誘導が発がん極めて重要であるという概念は変わらず、将来的により詳細なメカニズムが明らかとなり、適切な治療標的が特定されれば、がんの予防治療薬の開発につながることを期待されます。

炎症反応依存的な胃がんモデルの開発研究

私は、2005 年に金沢大学がん研究所(現在のがん進展制御研究所)に教授として採用され、自分の研究室を主宰することになり、以前から興味があった胃がんのモデル研究を推進しました。胃がんは東アジアでの罹患率が高く、欧米では大腸がん比べてモデル研究が推進されていませんでした。胃がんでは、APC 遺伝子変異は少なく、Wnt リガンドの発現亢進が広く見られたため、リガンド依存的な Wnt 活性化が重要と考えて、胃粘膜上皮で Wnt1 を発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、組織学的に Wnt シグナルを活性化した胃粘膜上皮細胞が散見されましたが、腫瘍形成には至りませんでした。一方で、ヘリコバクター・ピロリ菌の胃粘膜感染が胃がん発生のリスク因子であることが報告され、ピロリ菌感染による慢性炎症が胃がん発生に関与すると考えられました。そこで、胃粘膜で COX-2/PGE2 経路の活性化を誘導したマウスモデルを新たに作成しました。このマウスでは、ヘリコバクター感染と類似した、慢性炎症を胃粘膜に発症し、それに伴って胃粘膜の細胞増殖が亢進した過形成病変が見られましたが、腫瘍化には至りませんでした。

そこで、作成した Wnt リガンド発現マウスと COX-2/PGE2 誘導マウスを交配し、COX-2 依存的な炎症反応を起こした胃粘膜で Wnt シグナルが活性化したマウスを作成すると、100%の効率で胃粘膜に大きな胃がんを自然発生しました。この結果は、胃での発がんには Wnt 活性化だけでは不十分であり、ピロリ菌感染等による慢性胃炎の環境が腫瘍発生に必要である可能性を示しています。大腸がんでは、APC 変異で腫瘍化した細胞周囲で COX-2 発現が誘導されましたが、胃粘膜ではそのような間質反応が誘導されません。この結果は、ピロリ菌の除菌が、胃がん発生リスクを低減させる可能性を支持するものです。

私達は、作成した胃がんモデルを Gastric Neoplasia (胃の新生物)の略で、Gan マウスと名付けて、胃がん発生における炎症の役割について解析を展開しました。その結果、胃腫瘍間質細胞では、Toll 様受容体 (TLR) を介した自然免疫反応が活性化しており、それが、COX-2/PGE2 経路を誘導して炎症反応が起きます。TNF- α や IL-6/IL-11 などの炎症性サイトカインが、胃がん細胞の受容体を介して NF- κ B や Stat3 などの転写因子を活性化し、幹細胞特性の維持や増殖亢進に作用し、これらのメカニズムが発がんを促進すると考えられました。このように、マウスモデルの解析により、炎症反応による発がん促進機構が次第に明らかとなって来ました。これらの結果を基に、将来的な治療薬開発が期待されます。

遺伝子変異の蓄積による大腸がん悪性化モデル

Vogelstein らによって、遺伝子変異の蓄積によりがんが発生するという、「多段階発がん

説」が知られています。ダーウィンの進化論のように、遺伝子変異によりがん細胞として有利な形質を獲得し、それを繰り返すことによって、良性腫瘍が次第に悪性化するという概念です。ヒトの臨床検体解析結果から推測されていましたが、動物実験による検証は、複数の遺伝子変異を次々と導入することが大変な作業となるため、行われていませんでした。そこで、私達は、自分たちで作成した APC 遺伝子変異マウスを基として、Kras、Tgfr2、p53、Fbxw7 の全部で5種類の遺伝子変異を、さまざまな組み合わせで腸管上皮細胞に導入したマウスモデルを5年以上の歳月をかけて交配により作成しました。これらの遺伝子変異は、ヒトの大腸がんで高頻度に検出されており、悪性化に関与すると考えられています。マウスモデルの作成に長い時間を費やしましたが、得られたモデルの包括的な病理解析により、遺伝子変異の組み合わせと悪性化形質の相関について、明らかにすることができました。

APC 遺伝子変異はがん化の最初にイベントであり、単独の変異でポリープを発生します。次に Tgfr2 または p53 遺伝子の変異が入ると、腫瘍細胞は粘膜下浸潤しますが、2遺伝子の変異では悪性化には不十分で、さらに KRAS 変異が加わると、腫瘍細胞は異形成等の悪性化形質を示し、粘膜下を遊走して血管やリンパ管内に浸潤します。さらに、APC、KRAS、TGFR2 の3遺伝子変異を誘導した腫瘍細胞は、肝臓に転移巣を形成する能力を獲得しますが、APC、KRAS、TGFR2、p53 の4遺伝子に変異を導入した腫瘍細胞は、より高い転移能を獲得します。これらの研究結果により、多段階発がん説を個体レベルで検証し、より詳細な遺伝子変異と悪性化形質の相関を示すことができました。

オルガノイドを用いた転移機構の研究

4重、5重変異を導入したマウスは、悪性度の高い腸管腫瘍を発生するため、長生きすることが出来ません。そこで、各種遺伝子変異マウスに発生した腸管腫瘍から、オルガノイドを樹立しました。オルガノイドとは、生体内と類似した立体構造を維持しながら、細胞外基質と同じ成分のゲル中で3次元培養する方法ですが、がん組織から樹立したオルガノイドは、生体内と類似した多様性を持つ細胞形質を維持していることから、がんの基礎研究や治療薬開発の応用研究まで、広く使われている最新の培養方法です。私たちは、AKTPという4重変異を導入した腸管腫瘍オルガノイドと、AP という2重変異を持った腫瘍由来オルガノイドを使って、ポリクローナル転移という新しい転移機構の概念について検証研究を行いました。

以前の転移に関する考え方では、原発巣で悪性化したがん細胞は、間葉系細胞の性質を獲得して単独で浸潤、遊走するようになり、血管内に浸潤して血流を介して遠隔臓器に到達し、そこで転移巣を作ると考えられていました。しかし、近年の研究により、がん患者の血中には、複数のがん細胞が凝集してクラスターを形成していることが報告され、さらに単独細胞よりもクラスターの方が、遠隔臓器に到達してからの転移巣形成効率が高いことが実験的に示されました。原発巣を構成するがん細胞の遺伝子変異は一様ではなく、多様性があることが知られており、クラスターの中に遺伝的に異なるがん細胞が含まれていれば、転移巣でも多様性が維持されると考えられ、ポリクローナルな転移が起こると想定されましたが、これま

でに実験的な証明はありませんでした。

AKTP オルガノイドは高い転移性があり、マウス脾臓に移植すると、門脈を經由して肝臓に到達し、多発性に肝転移巣を形成します。一方で、悪性化がそれほど進行していない腫瘍由来の AP オルガノイドは脾臓から肝臓に到達しても、そこで生着することはなく転移巣は形成されません。そこで、AKTP 細胞と AP 細胞を混ぜて脾臓に移植すると、AKTP と AP の異なる細胞で構成されるキメラ状の転移巣が形成されました。すなわち、転移性を獲得していないがん細胞でも、高い転移性を持ったがん細胞と一緒にクラスターを形成すれば、転移巣を形成できることが示されました。この結果は、確かにポリクローナル転移は起こり得ることを示しており、ダーウィン進化を基盤とする多段階発がんでは説明できない、新しい転移機構が考えられました。

この結果は、治療法の選択にも影響を及ぼす可能性を含んでいます。つまり、転移巣のゲノム解析により、特定の遺伝子変異が検出されれば、それに対する分子標的薬の適用が想定されますが、実際には、その遺伝子変異を持たないがん細胞も混在する可能性があり、治療薬の効果は限定的になることも想定されます。ポリクローナル転移に関しては、今後、ヒトの転移巣由来オルガノイドを樹立した検証研究が重要と考えています。

p53 変異と悪性化の誘導機構

私たちは、個々の遺伝子変異による発がんへの影響について解析を進めて来ましたが、その中でも p53 に着目した研究を推進しています。p53 には、ゲノムや染色体に異常があると、細胞周期を止めて修復を誘導し、修復できない場合は細胞死を誘導する機能があります。したがって、p53 遺伝子の欠損はがんの悪性化誘導に重要と考えられますが、興味深いことに、検出される遺伝子変異のほとんどは、ミスセンス型変異で、たった1つのアミノ酸置換を起こしています。興味深いことに、p53 遺伝子を欠損させたマウスは白血病や肉腫を自然発生しますが、p53 遺伝子にヒトのがんと同じミスセンス変異を導入したマウスでは、肺や腸管などの上皮組織に腫瘍を発生します。このことから、アミノ酸置換を起こした p53 は、新たに発がん促進機能を獲得した可能性が考えられ、機能獲得 (Gain-of-function, GOF) 型変異と呼ばれるようになりましたが、個体レベルでの検証は十分に行われてませんでした。

そこで、ヒトのがんと同様の 270 番コドンのアミノ酸が置換された p53 R270H 変異を持つマウスを、APC 遺伝子変異マウスと交配実験した結果、p53 R270H 変異を持つ腸管腫瘍細胞は、粘膜下に浸潤することを確認しました。このような悪性化誘導は、野生型 p53 を欠損するだけでは見られないので、GOF 型変異が悪性化形質を誘導することを示します。

ヒトの進行がんでは、多くの場合 GOF 型 p53 遺伝子変異とともに、対立遺伝子の野生型 p53 は LOH により欠損しています。そこで、p53 GOF 変異と野生型 p53 の双方を持つ p53 遺伝子変異ヘテロの AKTP 細胞を作成し、脾臓への移植実験を実施すると、興味深いことに p53 遺伝子の LOH を起こした AKTP 細胞が選択的に肝転移巣を形成しました。すなわち、原発巣で p53 遺伝子の GOF 変異を起こした腫瘍細胞は、浸潤性を獲得して粘膜下浸潤を

起こしますが、さらに LOH により野生型 p53 遺伝子を欠損すると、がん細胞は転移巣る能力を獲得すると考えられました。

さらに詳細なオルガノイドを用いた細胞実験により、p53 遺伝子変異が GOF/LOH の組み合わせの AKTP 細胞では、MAPK 経路や炎症反応のシグナル経路が活性化していることが明らかになりました。それらのシグナルが、遠隔臓器に播種されたがん細胞が暴露されるストレスに対して、耐性を獲得して悪性を誘導する可能性が考えられました。海外の研究グループも、GOF 型 p53 変異による悪性化誘導に関する研究を推進しており、詳細な分子機構が解明されれば、新たな悪性がんに対する治療標的となることが期待されます。

おわりに

山極・市川によるタールがんの発生、そして吉田富三博士らによる腹水肉腫の樹立、これらの偉大な業績には比較出来ませんが、APC 遺伝子変異マウスの腸管におけるポリープの発生、腫瘍細胞における野生型 APC 遺伝子の LOH による欠損、COX-2 遺伝子の欠損による腸管腫瘍発生の抑制、これらの現象をマウス実験を通して発見した時の驚きと喜びは、何事にも代え難い経験でした。そしてこの度、一連の実験動物を用いたがん研究に対して、吉田富三賞を受賞することは本当に栄誉なことです。これまでの研究を支えて頂きました多くの皆様に、あらためて感謝致します。特に、研究の方向性を与えて頂きました、武藤誠先生、また、同僚として研究を支えて頂きました万有製薬つくば研究所発生動物研究部、京都大学医学研究科遺伝薬理学、金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究室の皆さんに心より感謝いたします。また、私の父は医学研究者だったこともあり、小学校の頃から大学の研究室に出入りしていて、ライフサイエンスの研究に触れる機会に恵まれました。また、姉が大腸がんを患い、先端医療を受けながらも再発を繰り返すのを近くで見ていて、悪性化機構の解明の重要性を強く認識しました。さらに、APC 遺伝子変異マウスや COX-2 関連実験、オルガノイドを用いたポリクローナル転移研究は、家内の大島浩子と二人三脚で推進しました。最後に、研究のきっかけとなり、これまでの研究を支えてくれた家族に感謝します。