

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07251

研究課題名(和文) ACLYトランスジェニックマウスにおける腸内細菌叢変化および発がん機序の研究

研究課題名(英文) Analysis of the intestinal flora of ACLY and its effect for carcinogenesis

研究代表者

神田 浩明 (Kanda, Hiroaki)

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 病理診断科・科長(兼) 診療部長

研究者番号：90260067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ACLY(ATPクエン酸解裂酵素)は多種のがんで発現亢進がみられるため、がんにおけるACLYの役割を検討してきた。その一環でヒトACLYを導入したトランスジェニックマウス(ACLYM)を作成した。C57BL/B6マウスを背景としたマウスにリンパ腫が多発したが、コントロールマウス(CM)にも多発したため、リンパ腫耐性のC3Hマウスにバッククロスを行い観察を行ったところ、約20%のACLYMにリンパ腫が発生しCMには発生しなかった。飼育方法からC57BL/B6の実験でCMのリンパ腫発生に腸内細菌叢の関与を疑い、メタゲノム解析を行ったところ、ACLYMの腸内細菌叢は新たに購入したCMと異なっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACLY(ATPクエン酸解裂酵素)は脂肪酸やコレステロールを合成する主要な経路を担っている。この酵素は多種のがんで発現亢進がみられるため、われわれはがん細胞におけるこの酵素の役割を検討してきた。その一環としてヒトACLYを導入したトランスジェニックマウスを作成して観察したところ、リンパ腫が多発し、この蛋白とリンパ腫の関連が疑われた。この発がんメカニズムに関し、マウス飼育法の検討から、腸内細菌叢の関与が疑われた。調べてみるとトランスジェニックマウスではコントロールマウスとは異なった腸内細菌叢を有することがわかった。現在、原因細菌の同定を試みるなどの実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：ATP-citrate lyase (ACLY) catalyzes the generation of acetyl-CoA from citrate. ACLY expression is upregulated and/or ACLY is phosphorylated in several types of cancer. We generated ACLY transgenic mice (Tg) to examine the role of ACLY in carcinogenesis. Tg with C57BL/B6 background spontaneously developed lymphoma/leukemia (LL), frequently. But control mice developed LL, too. Then, the Tg were back-crossed with C3H mice, which are resistant to LL. About 20% of Tg developed LL, spontaneously. No LL was seen in the controls. This study suggests that ACLY might contribute to LL development. Since the bleeding method was different between C57BL/B6 and C3H experiments, one possible cause of LL development, especially in control mice, might be owing to the intestinal flora. Metagenomic analysis revealed that there was difference of intestinal flora between Tg and control mice using bleeding.

研究分野：病理学

キーワード：ATP-citrate lyase マウス リンパ腫 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

ACLY (ATP クエン酸解裂酵素) はクエン酸からオキサロ酢酸とアセチル CoA を生成する酵素で、脂肪酸やコレステロールを合成するための主要な経路の中心を担っている。この酵素は多種のがんで発現亢進がみられることから、われわれはがん細胞におけるこの酵素の役割を検討してきた。その一環としてヒト ACLY を導入したトランスジェニックマウス (ACLY マウス) を作成した。

2. 研究の目的

ACLY マウスを長期観察し、腫瘍発生の有無を観察し、腫瘍が発生すればその機序を解明する。

3. 研究の方法

1. トランスジェニックマウスの作成

われわれは細胞実験で得られた結果を個体に結びつけるために、ACLY トランスジェニックマウスの作成を行った。肺がん、前立腺がんなど多種のがんで ACLY の発現増強が認められることから、プロモーターは ROSA26 を用いて全身での発現を期待し、ヒト全長 ACLY cDNA を C57BL/6 マウスに導入した。作成は熊本大学に依頼した。

2. トランスジェニックマウスの観察

トランスジェニックマウスは生後に耳切により個体を同定し、尾を切って DNA を抽出し、PCR 法で Transgene の有無を確認した。その後体重測定を行いながら 18-24 週の長期観察を続けた。生後 1 年より目視で不調のマウスが認められた時には、Scarify し、剖検した。

3. トランスジェニックマウスの背景系統の変更

発生する自発腫瘍が背景の系統により変化するかどうか検討するため、C57BL/6 系統の ACLY トランスジェニックマウスを C3H 系統にバッククロスを行った。

4. 腫瘍の組織学的解析

形成された臓器・腫瘍を剖検により摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定の後、パラフィン包埋し、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行って組織像を検討した。

5. 便の採取とメタゲノム解析

便は採取時に各マウス個体を独立したケージに移し、約 1 時間放置する間に排泄されたものを回収し、凍結保存した後、QIAamp DNA stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った。

抽出した DNA を吸光度計により濃度測定し、必要な DNA 量、濃度を満たしていることを確認した後、DNA チップ研究所に送付して 16S rRNA を対象として次世代シーケンスによる細菌叢の解析を依頼した。

4. 研究成果

1. ACLY トランスジェニックマウスに発生する自発腫瘍

ACLY トランスジェニックマウスを無処置で長期観察を行った。24-30 月齢のオス 24 匹を剖検すると 14 匹 (58%) に血液系腫瘍 (リンパ腫・白血病)、7 匹 (29%) に肺がん、1 匹 (4%) に小腸がん と 血管系腫瘍 が認められた (重複がんは別個に計算した)。

自発肺がんがマウスに発生することは非常にまれであり、ACLY がこれら腫瘍発生に働いたと考えられた。過去の文献で ACLY と前立腺がんの関係の報告があるため(Hum Pathol 37:401-409, 2006)、前立腺を観察したが、前立腺に異常は見られなかった。

ところが、コントロールマウスにも 50%(6 匹中 3 匹)でリンパ腫の発生が認められた。

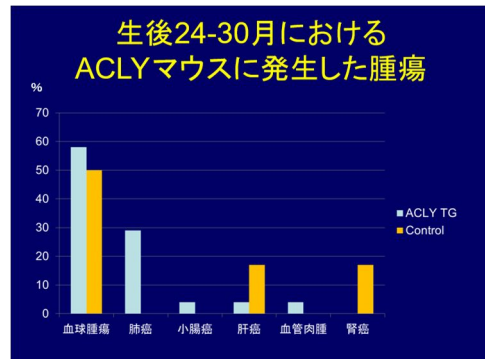


図 C57BL/B6 背景トランスジェニックマウスに発生した腫瘍

2. 系統を変えた時の ACLY トランスジェニックマウスに発生する腫瘍

C57BL/B6 マウスはコロニーによっては血球系腫瘍が多発することが知られている。そのため、血球系腫瘍の発生頻度が低く、肝細胞がんや肉腫の発生頻度が高いとされる C3H マウスにバッククロスを行い、無処置で長期観察を行った。C57BL/B6 の結果から生殖や発育に問題がないことがわかったため、バッククロスに用いた C3H マウスをコントロールとし、ホモのトランスジェニックマウスを観察した。

表 1 に結果を示す。オス 67 匹、メス 62 匹 計 129 匹とコントロール C3H マウス 49 匹(オス 19, メス 30 匹)を無処置で 18 月観察すると、全体としてトランスジェニックマウス 73 匹 (57%; オス: 41, 61%; メス: 32, 52%) と コントロール 8 匹 (16%; オス: 4, 21%; メス: 4, 13%)にがんが認められた。ACLY トランスジェニックマウスは全体、オス、メスすべてで有意にがん発生率が高かった($p < 0.05$)。腫瘍別にみると、肝がん 33 匹 (26%; オス: 22, 33%; メス: 11, 18%), リンパ腫 28 匹 (22%; オス: 12, 18%; メス: 16, 26%), 肺がん 7 匹 (5%; オス: 6, 9%; メス: 1, 2%), 肉腫 4 匹 (3%; オス: 2, 3%; メス: 2, 3%), 小腸がん 2 匹 (2%; オス: 2, 3%; メス: 0), 皮膚がん 2 匹 (2%; オス: 0; メス: 2, 3%), 卵巣がん 1 匹 (1%; メス: 1, 2%), コントロールには肝がん 7 匹 (14%; オス: 4, 21%; メス: 3, 10%), 肺がん 1 匹 (2%; オス: 1, 5%; メス: 0), 卵巣がん 1 匹 (2%; メス: 1, 3%)であった。コントロールにリンパ腫は認められなかった。肝がんの発生率に有意差は認められなかった。ACLY が血液系腫瘍発生に関与する可能性がわかった。

さらに、オスメスの間で発生腫瘍に差を見てみると肝がんで有意差は見られなかったが($p = 0.18$, Fisher の直接法) オスが多く発生したのに比べ、リンパ腫はオスメスの間で差を認めなかった。肝腫瘍がオスに好発することはよく知られた事実であるが、リンパ腫においては性差においても異なったメカニズムが関与する可能性が示唆された。

	個体数	全がん	肝がん	リンパ腫	肺がん	小腸がん	肉腫	皮膚がん	卵巣がん
ACLY	129	73(57%)*	33(26%)	28(22%)	7(5%)	2(2%)	4(3%)	2(2%)	1(1%)
オス	67	41(61%)**	22(33%)	12(18%)	6(9%)	2(3%)	2(3%)	0	-
メス	62	32(52%***)	11(18%)	16(26%)	1(2%)	0	2(3%)	2(3%)	1(2%)
コントロール	49	8(16%)*	7(14%)	0	1(2%)	0	0	0	1(2%)
オス	19	4(21%)**	4(21%)	0	1(5%)	0	0	0	-
メス	30	4(13%***)	3(10%)	0	0	0	0	0	1(3%)

表1: マウスに発生した腫瘍

*, **, ***; $p < 0.05$

3. ACLY トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの腸内細菌叢の解析

ACLY がリンパ腫の発生に関与していることは明らかとなったが、当初の C57BL/B6 コントロ

ールマウスに発生した腫瘍に疑問が残った。上述のように C57BL/B6 はコロニーによってはリンパ腫の発生が高頻度に見られるとされるが、トランスジェニックマウスの作成施設やかけ合わせマウスを購入した業者に問い合わせたが、そのようなコロニーであるとの報告はないとのことであった。

別にわれわれは、がん研究所がん生物部の原英二先生(現大阪大学)に協力して、高脂肪食による肝発がんでは腸内細菌叢に変化があり、“悪玉”腸内細菌が産生するデオキシコール酸による肝臓の星細胞の障害とそれが引き起こすサイトカイン産生 (Nature 2013 ; 499:97) や “悪玉”腸内細菌の成分であるリポティコ酸による免疫能低下(Cancer Discovery 2017; 7:522)が重要であることを見出した。ACLY も脂肪酸代謝に関与する酵素であり、マウス作成の共同研究者である右田らは ACLY の過剰発現により細胞内に長鎖脂肪酸が過剰に産生されることを証明してきた(Int.J.Cancer 135:37, 2014)。

さらに、Friswell らの研究によればマウスの腸内細菌叢は系統によって異なるが、それを超えて母親の腸内細菌叢に影響を受けることがわかっている(Pros One 5:e8584, 2010)。ACLY トランスジェニックマウスはホモでも生殖能や発育等に障害が見いだされないため、C3H マウスの実験ではホモトランスジェニックマウスを対照として、コントロールマウスとは別ケージで飼育して観察を行った。しかし、C57BL/B6 の実験では当初はこれらに異常が出る可能性も考慮したためにヘテロマウスの交配により得られたトランスジーン陰性のマウスをコントロールマウスとして検討した。つまりコントロールマウスも同一ケージで飼育していた。また、家計図を作成していなかったため詳細なデータが提示しえないが、トランスジェニックマウスが腫瘍を発生する同腹のコントロールマウスに腫瘍が多発していることがうかがわれた。これらの事実から腸内細菌叢が発がんに関与しているのではないかと考えた。

そのため、腫瘍がほとんど発生していない生後 1 年時点の ACLY 雄トランスジェニックマウス(C57BL/B6 バックグラウンド)から便を採取し、DNA を抽出した。コントロールは実験動物中央研究所(CIEA)から購入した同年齢のマウスから同様に便を採取、DNA を抽出した。抽出した DNA を DNA チップ研に送付し、16SrRNA の次世代シーケンス解析を行った。

その結果、トランスジェニックマウスにおいて腸内細菌叢はコントロールと大きく異なり、クロストリジウムなどのいわゆる “悪玉菌” が増えていることがわかった(別表 2,3)。

がん、特に大腸がんの発生に関与する物質として腸内細菌叢が産生するコリバクチンが注目されているため、ACLY トランスジェニックマウス腸内細菌のコリバクチンを測定したが、陰性であった。

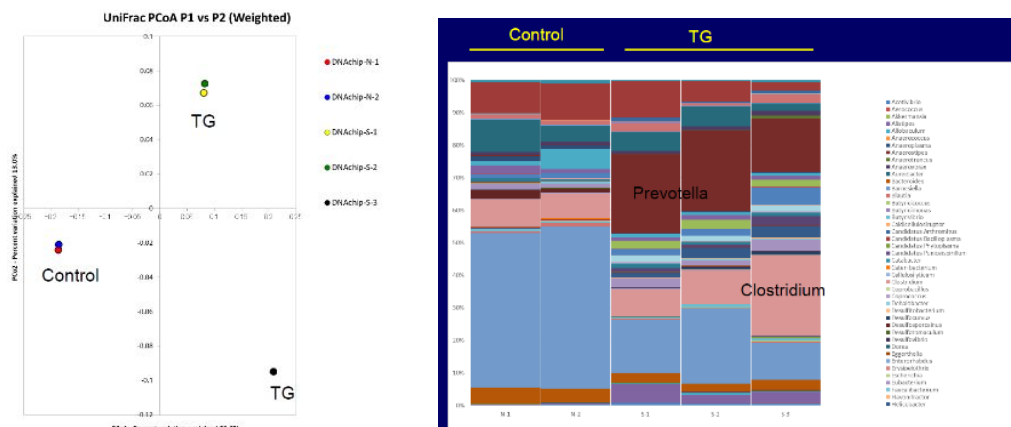


図: ACLY トランスジェニックマウスとコントロールマウスの腸内細菌叢

4. まとめと今後の方針

研究により、ACLY がリンパ腫の発生に関与すること、そのメカニズムには腸内細菌叢が関与している可能性が示された。ACLY トランスジェニックマウスの母親から出生した非トランスジェニックマウスが母親の腸内細菌叢を受け継いでリンパ腫感受性になった可能性を疑っている。

今後 C57BL/B6 コントロールマウスの腫瘍発生が抗生剤投与や C3H マウスと同様の隔離した飼育で減少するのか、逆に同腹のマウスを genotype によりトランスジェニックマウスとコントロールマウスに分ける飼育方法で C3H コントロールマウスにリンパ腫が発生するか見ていくことを計画するとともに、糞便移植や原因細菌の同定を試みていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Kanda, Kimie Nomura, Toshihiko Iizuka, Mutsunori Fujiwara, Yuichi Ishikawa, Toshiro Migita
2. 発表標題 ATP-citrate lyase transgenic mice frequently develop lymphoma/leukemia spontaneously
3. 学会等名 2020年 米国がん学会(AACR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神田 浩明, 野村 起美恵, 飯塚 利彦, 石川 雄一, 右田 敏郎
2. 発表標題 Frequent spontaneous tumor development in ACLY transgenic mouse
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田 浩明, 野村 起美恵, 飯塚 利彦, 石川 雄一, 右田 敏郎
2. 発表標題 ACLY トランスジェニックマウスに発生する腫瘍の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------