

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07987

研究課題名(和文)キサンチン誘導体の予防的な組み合わせ投与による腸炎からの上皮異形成化の抑制

研究課題名(英文)Protective effect of xanthine derivatives on colitis-associated dysplasia

研究代表者

溝口 恵美子 (Mizoguchi, Emiko)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40782157

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)：炎症性腸疾患(IBD)における慢性炎症からの腸上皮と癌化にはキチナーゼ様タンパク1型(CHI3L1)が深くかかわっている。我々は汎キチナーゼ阻害剤でキサンチン誘導体の一種であるカフェイン(CAF)がCHI3L1の発現・活性化を抑制することを発見している。本研究では、アゾキシメタン(AOM)誘導性の大腸異形成モデルにおいて、CAFよりもペントキシフィリン(PTXN)によって大腸腫瘍数・腫瘍の大きさが有意に抑制されることが分かった。CAFおよびPTXN同時投与では副作用(例：ショック死)が強いため実験を中断した。今後、PTXNが将来的に大腸癌の予防・治療薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、日本における大腸癌と潰瘍性大腸炎やクローン病を含む炎症性腸疾患の罹患率が増加の一途をたどっている。特に大腸癌は最も予後不良な固形癌の一つである。我々のグループは、酵素活性を持たないタイプの哺乳類キチナーゼの一種であるCHI3L1が急性・慢性炎症時や大腸癌発症時に著しく増加し、その病態に深く関与することを報告してきた。興味深いことに、キサンチン誘導体の一種であるCAFとPTXNがCHI3L1の発現とその機能を抑制することがわかった。特にPTXNは、AOM誘導性の腸管上皮異形成に伴う大腸腫瘍数および腫瘍の大きさをCAFよりも有意に抑制したことから、将来的に臨床応用の可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Previously, our group has reported that caffeine (CAF), one of the xanthine-derivatives, suppresses inflammation by inhibiting pan-chitinases including enzymatically inactive chitinase 3-like 1 (CHI3L1), in a dextran sodium sulfate (DSS)-induced acute colitis. In this study, we have examined anti-neoplastic effect of CAF and/or PTXN in an Azoxymethane (AOM)-induced chronic colitis-associated cancer model. AOM was intraperitoneally administered to 8-week-old C57Bl/6 mice for 6 times, and these mice were sacrificed 5 weeks after the final administration of AOM. The mice were treated with CAF, PTXN or dH2O for 8 times intraperitoneally. Both CAF and PTXN administered mice cause severe adverse effects (e.g. shock death), so we suspended further experiment in this group. In an AOM-induced colonic cancer model, PTXN-treated mice significantly reduced the incidence of tumor multiplicity as well as tumor size as compared to the other two groups. PTXN may have an anti-neoplastic effect.

研究分野：癌免疫生物学、粘膜免疫学、消化器内科学

キーワード：Chitinase 3-like 1 炎症性腸疾患 上皮異形成 キサンチン誘導体 カフェイン ペントキシフィリン 核局在配列

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性腸疾患(IBD)の患者数は増加の一途をたどり、慢性炎症に伴う癌化のリスク増加が社会問題となっている。キチンはエビやカニなどの甲殻類に多く存在し、キチナーゼと呼ばれる酵素によって分解される。興味深いことに、キチン質を持たない哺乳類でもキチナーゼが存在(主にマクロファージや上皮細胞が分泌)していることが判明した。近年の研究で我々のグループは、キチナーゼ3様タンパク1型(CHI3L1)がIBDにおいて過剰発現し上皮の癌化に関与することを世界で初めて報告している。CHI3L1は健常者では殆ど発現がないが、活動期IBD患者の腸管で強発現する。また、慢性炎症に癌を合併する患者では、健常者の約20倍のCHI3L1 mRNA発現が上昇することを報告している。さらにメチル化したキサンチン誘導体の一種であるカフェイン(CAF)がCHI3L1の発現および活性を抑制することを見出しているが、CAFは心血管系や睡眠に対する副作用が憂慮されるため、副作用が少なくIBDおよびその癌化を効果的に抑制するキサンチン誘導体(単剤または併用)を探索することが望まれる。

2. 研究の目的

本研究は、IBDにおける上皮異形成に対する抑制効果を有する種々のキサンチン誘導体(単剤・併用)を探索することを目的とする。最終的な到達目標は、長期的に服用可能なIBD予防薬を開発または同定することである。CAFは、心血管系や神経系(特に睡眠)に対する副作用が憂慮されるため、標的臓器が異なるキサンチン誘導体、特に皮膚や末梢系に働くペントキシフィリン(PTXN)との組み合わせ投与、または単剤投与を検討する。この作用を以下の方法で研究する。

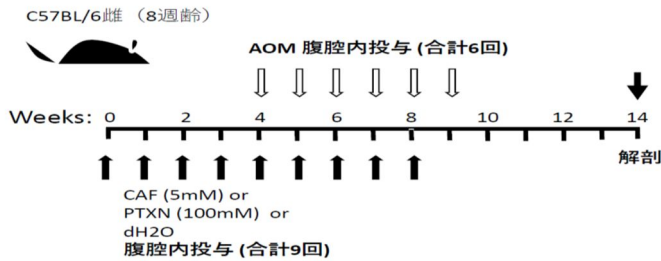
- (1) マウス慢性炎症モデルにおけるキサンチン誘導体の予防的投与による効果の確認
- (2) ヒト癌細胞株(大腸癌および口腔癌)におけるTNF α 刺激によるCHI3L1の核内移行およびキサンチン誘導体による核内移行抑制効果の確認

3. 研究の方法

(1) キサンチン誘導体の抗腫瘍効果を8週齢の野生型C57Bl/6雌マウスを用いて、5mM CAF投与群(n=5)、100mM PTXN投与群(n=5)、dH₂O投与群(n=5)の3つのグループに分けて検討を行った。キサンチン誘導体の至適濃度に関しては、我々の既存データ(Lee IA, Mizoguchi E et al, World J Gastroenterol 2014;20:1127-1138)から5mM CAFと100mM PTXNに決定した。しかし、本濃度でCAFとPTXNを併用した場合、ショック死や体重減少を含む予期せぬ副作用が見られたため、本実験からは併用群を除外した。これらを併用する場合は各血中濃度を極力低下させるなどの再検討が必要と考えられる。図1に示す投与プロトコールに従って、発癌作用のあるアゾキシメタン(AOM:12mg/kg)をマウスに週一回の頻度で6週間連続腹腔内投与し、上皮異形成を誘導した。AOMにより誘導した腸管上皮細胞の異形成や早期大腸癌などの腫瘍性変化に対するキサンチン誘導体の抑制効果を評価するために、AOMを最終投与してから5週間後にマウスを解剖した。解剖後摘出した大腸組織を肉眼的所見(腫瘍数と腫瘍の大きさ)、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本による病理学的診断、および異形成を伴わない大腸部位におけるCHI3L1の発現を抗マウスCHI3L1ポリクローナル抗体(Bioss Antibodies Inc., Woburn, MA, USA)を用いて免疫組織染色を行い、病理組織診断を行った。本実験に用いたマウスは平成30年4月より新設された久留米大学医学部基礎3号館動物実験施設にて、動物実験委員会の承認(研究番号2018-065-1, 2019-080)のもとに飼育および管理されたものを使用

した。

図 1



(2) ヒト大腸癌細胞株 (HCT116、SW480) およびヒト口腔癌細胞株 (HSC-4、OSC-19) を使って 2 dimensional (2D) または 3 D 培養状態で炎症性サイトカインの一種であるヒト由来の TNF α (5 0 ng/ml) (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) または IL-13 (15ng/ml) (R & D Systems) にて刺激を行い、キサンチン誘導体の有無による CHI3L1 の発現状態を確認した。またこの CHI 3 L 1 の核内移行を CAF, PTXN の単剤または併用による阻害効果を検証した。

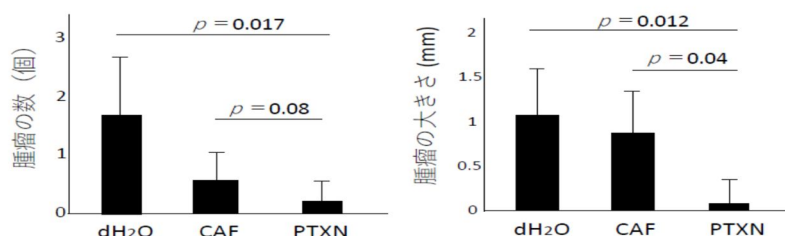
4 . 研究成果

(1) マウス慢性炎症モデルに関する研究結果

肉眼的所見について

AOM を最終投与してから 5 週間後にマウスを解剖し、回盲部を含む大腸を摘出した。その後、PBS (Phosphate Buffered Saline) にて丁寧に腸管内を洗浄後、縦方向に割を入れて腫瘤 (腸管の隆起) の有無を肉眼的に観察し、腫瘤の大きさ と数 を比較した。一般に、慢性炎症における腸管の長さは、炎症の重症度に比例して縮小化する傾向にあるが、上記 3 群のマウスの腸管の長さは PTXN 投与群で 8.68 ± 0.54 cm、CAF 投与群で 8.18 ± 0.41 cm、コントロールである dH₂O 投与群で 8.0 ± 0.41 cm と、PTXN 投与群が dH₂O 投与群と比較して有意に ($p < 0.05$) 腸管が長く炎症の程度が軽度であることがわかった。腫瘤の大きさは、PTXN 投与群で 0.10 ± 0.22 mm、CAF 投与群で 0.80 ± 0.91 mm であるのに対し、dH₂O 投与群で 1.13 ± 0.78 mm と、PTXN 投与群は dH₂O 投与群と比較して有意に腫瘤のサイズが小さかった ($p = 0.012$)。また、腫瘤数に関しては、PTXN 投与群 (0.20 ± 0.45 個)、CAF 投与群 (0.60 ± 0.55 個)、dH₂O 投与群 (1.75 ± 1.26 個) であり、PTXN 投与群は dH₂O 投与群と比較して有意に腫瘤数が少なかった ($p = 0.017$) [図 2]。肉眼的観察により、CAF 投与群と dH₂O 投与群において結節状の隆起が認められたのに対し、PTXN 投与群では殆ど認められなかった。この結果から、同じキサンチン誘導体である CAF と PTXN の間でも抗炎症・抗腫瘍作用に差があると言える。近年、Ghosh 教授の研究チームにより、PTXN が NF- κ B ファミリーである cRel の働きを阻害することで、抗腫瘍効果を発揮することを報告していることから、PTXN にはキチナーゼ阻害以外の機序による抗腫瘍作用も期待できる (Grinberg-Bleyer Y et al, Cell, 2017;170:1096-1108)。

図 2



病理学的的所見について

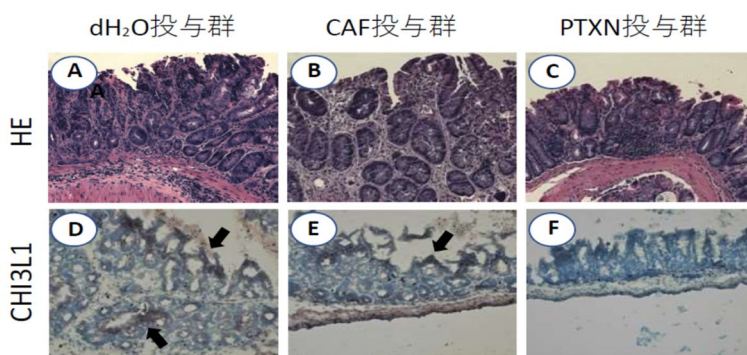
HE 染色による病理所見は腫瘍（腫瘍）の状態 [なし(0)・軽度異形成(1)・高度異形成(2)・上皮内癌(3)・進行癌(4)・遠隔転移(5)] を二重盲検法にて診断した。その結果、腫瘍の大腸病理組織スコアは、PTXN 投与群 (0.4 ± 0.54, n=5)、CAF 投与群 (1.0 ± 0.70, n=5)、dH₂O 投与群 (1.8 ± 1.09, n=5) であった。PTXN 投与群は、dH₂O 投与群と比較して有意に病理組織学的な改善傾向が認められた ($p = 0.039$)。一方で、CAF 投与群は dH₂O 投与群と比較して有意な改善は認められなかった ($p = 0.088$)。また、キサンチン誘導体である PTXN 投与群と CAF 投与群で比較したところ、PTXN 投与群において有意に軽症だった ($p = 0.035$)。HE 染色を行った代表的な病理組織像を **図 3 A-C** に示す。dH₂O 投与群において、粘膜固有層内および粘膜筋板に中等度から高度の炎症細胞浸潤を伴う腸管上皮細胞の軽度異形成像が 1 例、高度異形成像を呈する症例が 3 例、部分的な上皮内癌にまで発展した症例が 1 例認められた。また、PTXN 投与群では、粘膜固有層内の炎症細胞浸潤が比較的軽度で巣状(限局性)であり、2 例では部分的な軽度異形成像を認めた一方で、3 例ではほぼ正常上皮組織であった。さらに、CAF 投与群では粘膜固有層内に浮腫を伴う中等度の炎症細胞浸潤を認め、3 例に部分的な軽度異形成像を認め、1 例に高度異形成像を認めたが 1 例では正常組織であった。

免疫組織染色について

代表的な大腸組織(非炎症部位、非異形成部)における抗 CHI3L1 抗体を用いた免疫組織像を **図 3 D-E** に示す。dH₂O 投与群では、腸管の管腔側に強く CHI3L1 の発現が認められ、腸管上皮に腸内細菌が多く付着している像がみとめられた (**図 3 D、矢印**)。また、CAF 投与群においても管腔側に CHI3L1 の発現が一部に認められた (**図 3 E、矢印**)。一方で、PTXN 投与群では、腸管上皮上において CHI3L1 の発現は殆ど認められなかった (**図 3 F**)。これらの結果から、キサンチン誘導体の中でも、PTXN が腸管上皮における CHI3L1 の発現を抑制し、CHI3L1 による潜在性病原性細菌と大腸粘膜との結合性が軽減している可能性が示唆された。

以上の結果から、PTXN が腸管上皮上における CHI3L1 の発現を抑制することで、慢性炎症関連型大腸異形成の発症率を低下させている可能性が強く示唆された。キサンチン誘導体の中でも特に PTXN が将来的に大腸癌の予防・治療薬として臨床応用できるものとして大きく期待できる。今回の実験では、各群とも n=5 であり、結果を一般化するためには更にマウス数を増やして検討を行う必要があることが考えられる。また予備実験における DSS 急性腸炎では PTXN よりも CAF の方がむしろ抗炎症作用が認められたことから、同じキサンチン誘導体でも急性炎症と慢性炎症とでは抗炎症性の作用機序が異なると考えられる。今後は、CAF および PTXN の至適濃度を再検討し、両者併用による細胞レベルの抗炎症性メカニズムも明らかにしていきたい。

図3

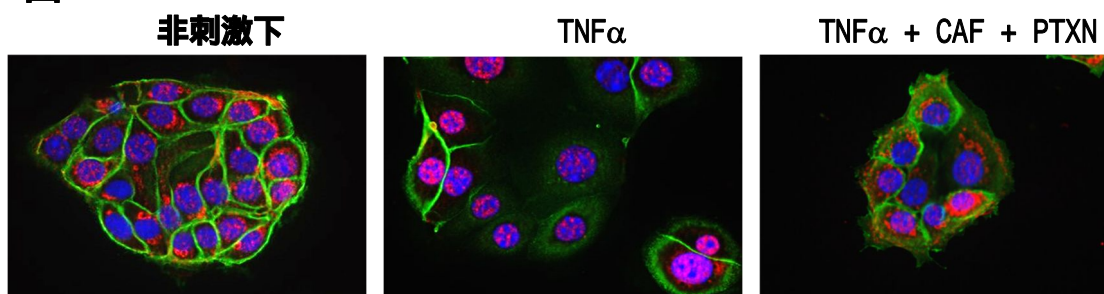


(2) ヒト大腸上皮細胞細胞株における研究結果

まず、ヒト大腸上皮細胞由来の HCT116 細胞株を 4 well カルチャースライド (Corning

Incorporated) にマトリゲル基底膜マトリクス (Corning) を薄層して 3D 培養した状態で炎症性サイトカイン TNF α (50 ng/ml) で刺激したのち 48 時間後に、ウサギ抗ヒト CHI3L1 ポリクローナル抗体 (Bioss) および細胞周囲のマトリックスの保持にかかわるヒアルロン酸レセプターである CD44 に対するマウスモノクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にて免疫染色を行った。CHI3L1 に対しては CF488-goat anti-rabbit IgG (Biotium Inc., Fremont, CA, USA), CD44 に対しては CF594-goat anti-mouse IgG (Biotium) にて二次染色を行い、蛍光顕微鏡 (Keyence, BZ-X800) 下で観察を行った。その結果、**図 4** に示すように無刺激状態では CHI3L1 (red) が主に核周辺または細胞質に、また CD44 (green) は核細胞を取り巻くように細胞間に発現している像が観察された。一方、TNF α 刺激後には CD44 の発現が低下し、CHI3L1 がほぼすべての細胞において核内に移行する像が観察されたが、この CHI3L1 核内移行はキサンチン誘導体である CAF および PTXN の同時投与によってほぼ阻害され、CD44 の発現も回復した。このことから、TNF α 刺激による CHI3L1 の核内移行はキサンチン誘導体 (CAF, PTXN) によって明らかに阻害できることがわかった。CAF および PTXN の単剤では CHI3L1 の核内移行が残り、阻害効果が不十分であったことも確認した。

図 4



上記の TNF α 刺激下における CHI3L1 核内移行は、その他のヒト大腸癌細胞株 (SW480, T84) においても認められた。また、ヒト口腔由来の扁平上皮癌細胞株 (HSC-4, OSC-19) においても TNF α 刺激後に同様な CHI3L1 の核内移行像が認められ、この核内移行は CAF および PTXN によって阻害された。正常の口腔内上皮では大腸上皮と同様にほとんど CHI3L1 の発現が認められなかったことから、口腔内の慢性炎症や慢性刺激による口腔上皮異形成および癌化にも CHI3L1 が関与していることが示唆された。ヒト口腔癌 HSC-4 において、非刺激下では CHI3L1 の発現を認めなかったが、他の 3 種類の細胞株では CHI3L1 の発現を恒常的に認めた。TNF α 刺激によって、HSC-4 細胞株においても CHI3L1 が核内に発現誘導されたが、CHI3L1 の発現を誘導する Th2 サイトカインの IL-13 (15 ng/ml) にて刺激した場合、CHI3L1 は核周辺に発現が誘導された。また、RT-PCR 法によって、HSC-4 および SW480 には CHI3L1 レセプターである IL-13 receptor alpha 2 (IL-13R α 2) およびインスリン様成長因子と関連する細胞膜貫通型タンパクである TMEM219 が非刺激状態でも恒常的に発現していることを確認している。また、免疫染色でも、これらの細胞株で CHI3L1, IL-13R α 2, TMEM219 の co-localization を確認したことから、炎症性サイトカインや Th2 サイトカインによって CHI3L1, IL-13R α 2, TMEM219 の結合体が形成されることが確認できた。しかし、なぜ TNF α 刺激後のみに CHI3L1 が核内に移行したのかは不明である。さらに、ヒト大腸癌および口腔癌の臨床検体を抗 CHI3L1 抗体 (Bioss) で免疫染色したところ、異形成および早期癌の症例で CHI3L1 の発現が上皮細胞および周囲の炎症細胞 (主にマクロファージ) の核内に特異的に認められた。この結果から、急性および慢性の炎症状態では細胞質または核周辺に局在していた CHI3L1 が、上皮細胞の腫瘍化に伴って核内移行していることがクローズアップされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 溝口恵美子、一万田莉麻、衣笠哲矢、岡田季之、溝口充志	4. 巻 9
2. 論文標題 キサンチン誘導体の慢性炎症関連性大腸癌発症抑制における役割について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 女性健康科学研究会誌	6. 最初と最後の頁 30-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Emiko Mizoguchi, Daren Low, Yui Ezaki, Toshiyuki Okada	4. 巻 18
2. 論文標題 Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 151-167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5217/ir.2019.09.09154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizoguchi Atsushi, Yano Arisa, Himuro Hidetomo, Ezaki Yui, Sadanaga Takayuki, Mizoguchi Emiko	4. 巻 53
2. 論文標題 Clinical importance of IL-22 cascade in IBD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 465-474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-017-1401-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Emiko Mizoguchi, Renuka Subramaniam, Toshiyuki Okada, Atsushi Mizoguchi	4. 巻 11
2. 論文標題 A review of selected IBD biomarkers: From animal models to bedside	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11020207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yui Ezaki, Atsushi Mizoguchi, Emiko Mizoguchi
2. 発表標題 Role of chitosome (CHI3L1/IL13Ra2/TMEM219) complex in oral squamous cell carcinoma and precancerous stage
3. 学会等名 Japanese Society for Immunology (JSI) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emiko Mizoguchi
2. 発表標題 Animal models for IBD study
3. 学会等名 Asian Organization of Crohn's and Colitis (AOCC) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺谷由唯、楠川仁悟、岡田季之、溝口充志、溝口恵美子
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるChitinase3-like 1の関与
3. 学会等名 日本消化器免疫学会 (JSMI)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 口腔白板症の上皮異形成判別方法	発明者 溝口恵美子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、出願準備中	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------