

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17389

研究課題名（和文）肥満関連大腸がんにおけるTET2の関与～代謝と大腸がんを繋ぐ分子機序の解明～

研究課題名（英文）Modulation of AMPK/ TET2/ 5-hmC axis in response to metabolic alterations as a novel pathway for obesity-related colorectal cancer development

研究代表者

今 孝志（KON, TAKASHI）

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10829740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：肥満関連大腸癌では非肥満の大腸癌に比べて腫瘍部の5-hmCやTET2が低下していました。また肥満で変化する代表的な代謝因子であるインスリン、グルコースを大腸癌細胞株に投与すると増殖活性を上げ、TET2の発現を低下させました。RNA干渉と呼ばれる方法でTET2の発現を強制的に抑制すると、細胞増殖活性が上昇しました。一方、薬剤により細胞内のエネルギーセンサーであるAMPKを誘導することで、TET2の低下や細胞増殖活性が抑制されました。これらの結果から肥満関連大腸がんにはAMPK-TET2という新しい経路が関与していると考えました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦で増加している肥満関連大腸癌に肥満やメタボリックシンドロームの増加に伴って本邦では大腸癌が増加しています。この肥満に関連した大腸癌の発生機序を明らかにすることで、この大腸がんの増加に歯止めをかけ、また有効な治療や予防法を開発できると考えます。本研究の結果から肥満関連大腸がんにはAMPK-TET2という新しい経路がかかわっていることが考えられ、これは新しい診断マーカーや治療標的になる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：Obesity has been widely acknowledged to pose a great risk of colorectal cancer (CRC). A recent study demonstrated that sustained hyperglycemia destabilizes the tumor suppressor ten-eleven translocation (TET) 2 as a substrate of the AMPK and dysregulates levels of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC). This novel pathway may play important roles in obesity-related CRC development.

In this study, we demonstrated that the expression of 5-hmC and TET2 was decreased in obesity-related CRC tissue. Glucose and insulin treatment decreased the expression of TET2 in CRC cells. The proliferation was induced in CRC cells by TET2siRNA transfection. In contrast, induction of AMPK inhibited cell proliferation accompanied by the upregulation of TET2 expression. AMPK-TET2-5-hmC axis is proposed as novel molecular pathway in obesity-related CRC development, may be a new diagnostic marker and therapeutic target.

研究分野：消化器内科

キーワード：TET2 5-hmC 大腸癌 肥満 AMPK

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

肥満、メタボリックシンドローム（MetS）の増加は、本邦における大腸癌増加の主要因である。この肥満関連大腸癌の病態の中心にはインスリン抵抗性、高インスリン血症があるとされ、インスリン抵抗性やアディポサイトカイン分泌異常、慢性の低炎症状態、インクレチンの分泌異常と肥満関連大腸がんおよび前癌病変である腺腫との解析を行い、報告を重ねてきた。しかしながら、なぜ肥満、MetS が大腸癌を導くのか、その直接的な機序は未だ不明な点が多い。肥満関連大腸癌を征圧するためには、その発生機序の分子基盤に立脚した新しい戦略を探索することが極めて重要な課題である。

近年、高血糖が細胞内のエネルギーセンサーである AMPK の活性を低下させることで、腫瘍抑制因子である TET2（tet methylcytosine dioxygenase 2）の不安定化を惹起し、DNA のエピジェネティックな修飾の一つである 5-ヒドロキシメチル化（5hmC）レベルを低下させ、発癌に促進的に作用するという新しい分子機構が報告された（*Nature* 2018;559:637–41）。大腸癌組織での TET2 の mRNA 発現レベルと予後との相関（*J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141:1379–92）や大腸癌細胞株では TET2 の核外排出が 5hmC レベルの低下を引き起こしていることも報告（*Clinical Epigenetics* 2016;8:9）されている。これらのことから大腸癌において TET2 は重要な鍵分子となり、特に AMPK-TET2 経路は肥満関連大腸癌に極めて重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。

2．研究の目的

本研究は、肥満関連大腸癌における腫瘍抑制因子 TET2 の役割を明らかにし、肥満、MetS から引き起こされる大腸癌の発育進展に関わる新しい分子機序を解明することを目的とする。

3．研究の方法

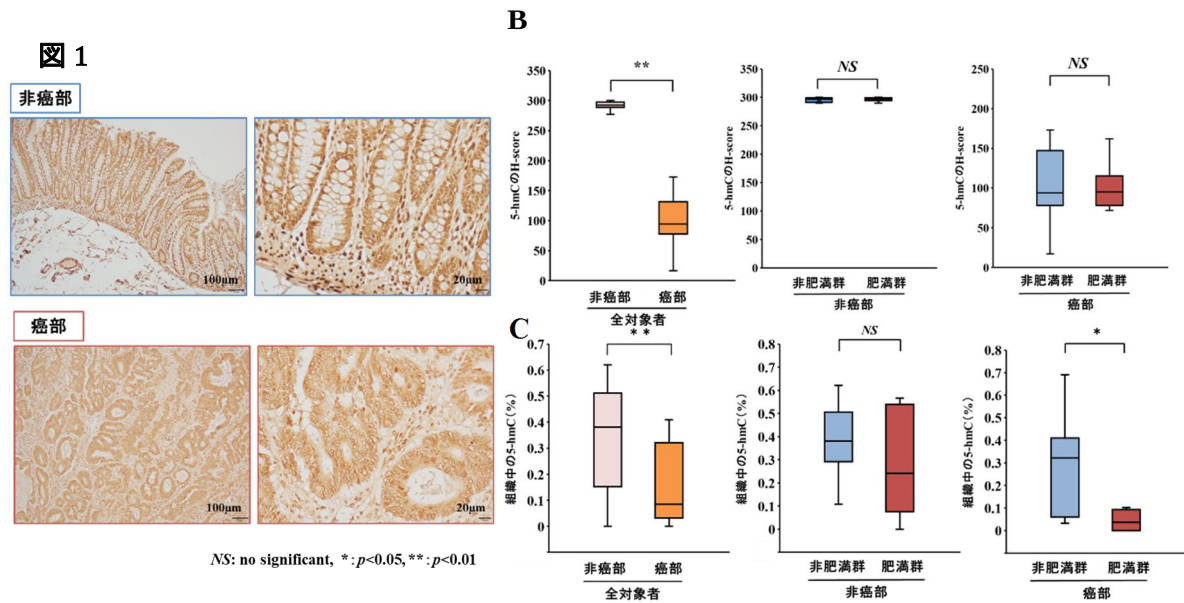
2017 年 4 月～2019 年 3 月までに当院にて大腸癌と診断され外科的切除が行われた 81 例を対象とした。CT で測定した内臓脂肪面積が 100 cm² 以上を肥満者と定義し、肥満を伴う大腸癌患者（肥満群）7 例、肥満群と年齢、性別、組織型、病期を合わせた非肥満群 7 例を抽出した。（1）切除標本のパラフィン切片（FFPE）を用いて癌部と非癌部の 5-hmC レベルを ELISA 法にて定量し比較した。また核内の 5-hmC の発現レベルを H-score を用いて免疫組織学的に評価した。（2）FFPE から RNA を抽出し、TET ファミリー（TET1～3）の発現を real time PCR で測定した。（3）また大腸癌細胞株（HT-29、HCT116）を用いて高グルコース、高インスリン状態、飽和脂肪酸・不飽和脂肪酸の投与による TET ファミリー酵素の mRNA レベルの変化についても検討し、（4）TET2siRNA および AMPK inducer である AICAR（5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside）が TET2 発現および大腸癌細胞株の増殖活性に与える影響を検討した。

4．研究成果

（1）肥満群の大腸癌における 5-hmC

全対象者のゲノム DNA の 5-hmC%の中央値は 0.092%（IQR 0.076–0.123）であり、非肥満群と肥満群で差はなかった。癌部および非癌部組織における核内の 5-hmC の発現レベルを免疫組織学的に検討した（図 1A）。全対象者における 5-hmC の H-score の中央値（図 1B）は非癌部に比し癌部で有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。非癌部ないし癌部において、肥満群と非肥満群の間では 5-hmC の H-score の中央値に差は同定できなかった。一方、ELISA で定量した組織中 DNA の 5-hmC%の中央値（図 1C）は、非癌部に比し癌部で有意に低下していた（ $p < 0.01$ ）。この組織中

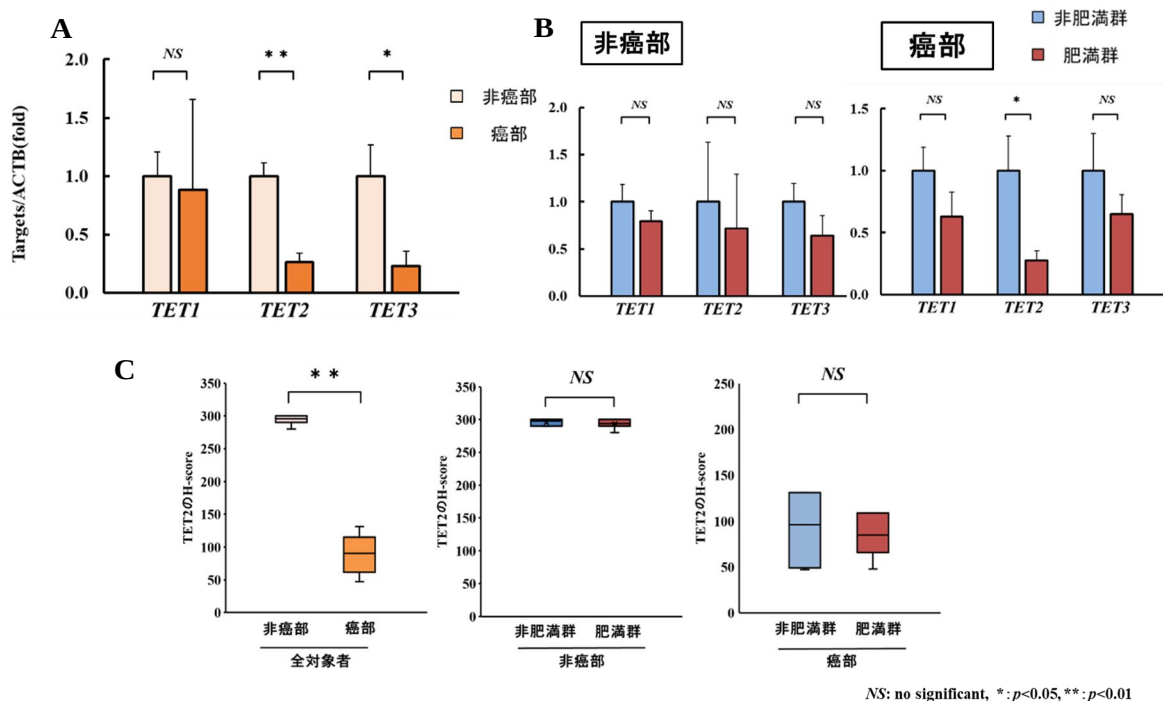
DNA の 5-hmC%は、非癌部では肥満群と非肥満群で差はなかったが ($p = 0.46$)、癌部では肥満群で有意に低下していた ($p = 0.03$)



(2) 肥満群の大腸癌における TET の発現レベル

全対象者の組織中の *TET1*、*TET2*、*TET3* の発現レベルを RT-qPCR で検討した (図 2A)。非癌部に比し、癌部において *TET2* ($p < 0.01$)、*TET3* ($p = 0.03$) の発現が有意に低下していたが、*TET1* の発現に差はなかった ($p = 0.89$)。非癌部においては *TET1*、*TET2*、*TET3* いずれにおいても差はなかったが、癌部においては、非肥満群に比べ、肥満群で *TET2* の有意な発現の低下を認め ($p = 0.04$)、*TET1*、*TET3* には有意な差はなかった (図 2B)。 *TET2* の H-score の中央値 (図 2C) は非癌部に比し癌部で有意に低かった ($p < 0.01$)。 *TET2* の H-score の中央値は、非癌部では肥満群と非肥満群で差はなく、癌部では非肥満群に比し肥満群で低下傾向を認めた。

図 2



(3) ヒト大腸癌細胞株における TET の発現変化

ヒト大腸癌細胞株へのグルコース刺激は有意に細胞増殖活性を増強させ、HT-29 (0.71-fold, $p = 0.03$; 図 3A) および HCT116 (0.71-fold, $p = 0.04$; 図 3B) でともに *TET2* 発現が有意に低下した。*TET1* および *TET3* の発現には有意な変化はなかった。

インスリン刺激も同様に細胞増殖活性を増強させ、HT-29 (0.47-fold, $p < 0.01$; 図 4A) HCT116 (0.62-fold, $p < 0.01$; 図 4B) で *TET2* 発現が有意に低下し、*TET1* および *TET3* の発現レベルに有意な差はなかった。

図 3

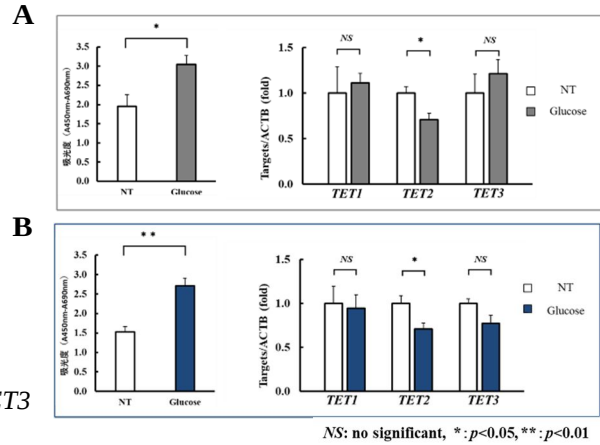
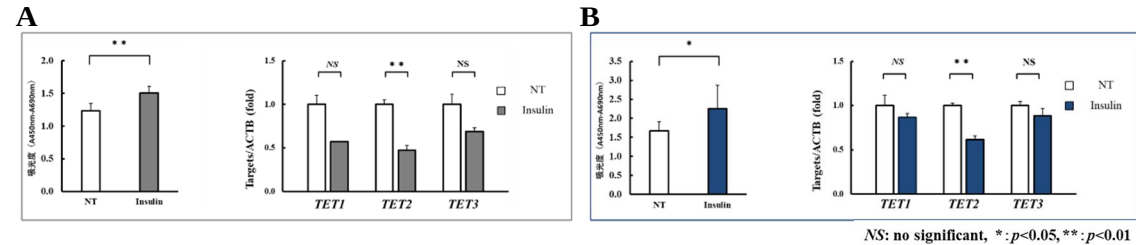
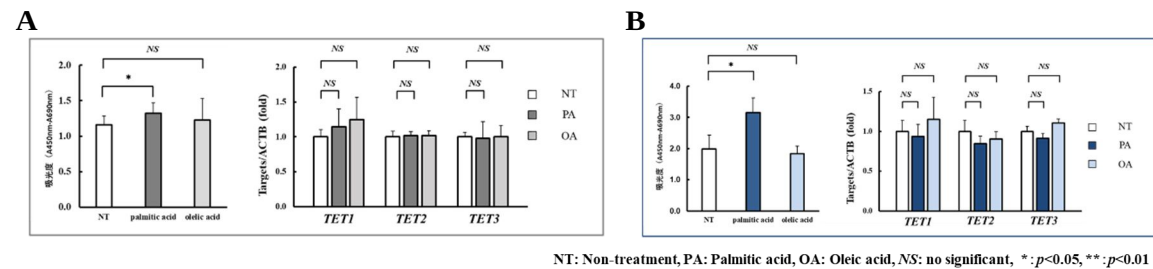


図 4



パルミチン酸は HT-29 (図 5A) と HCT116 (図 5B) の細胞増殖活性を有意に増加させたが、オレイン酸では増殖活性に変化を認めなかった。またパルミチン酸とオレイン酸の投与では *TET1*、*TET2*、*TET3* のいずれも発現に差はなかった。

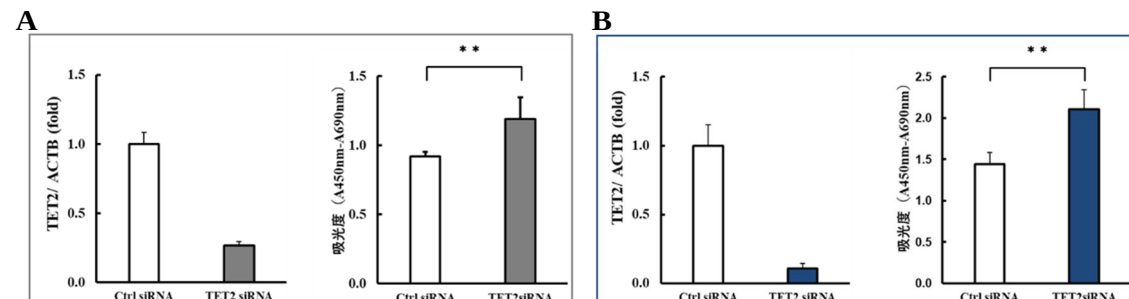
図 5



(4) *TET2* 発現変化が大腸癌細胞に与える影響

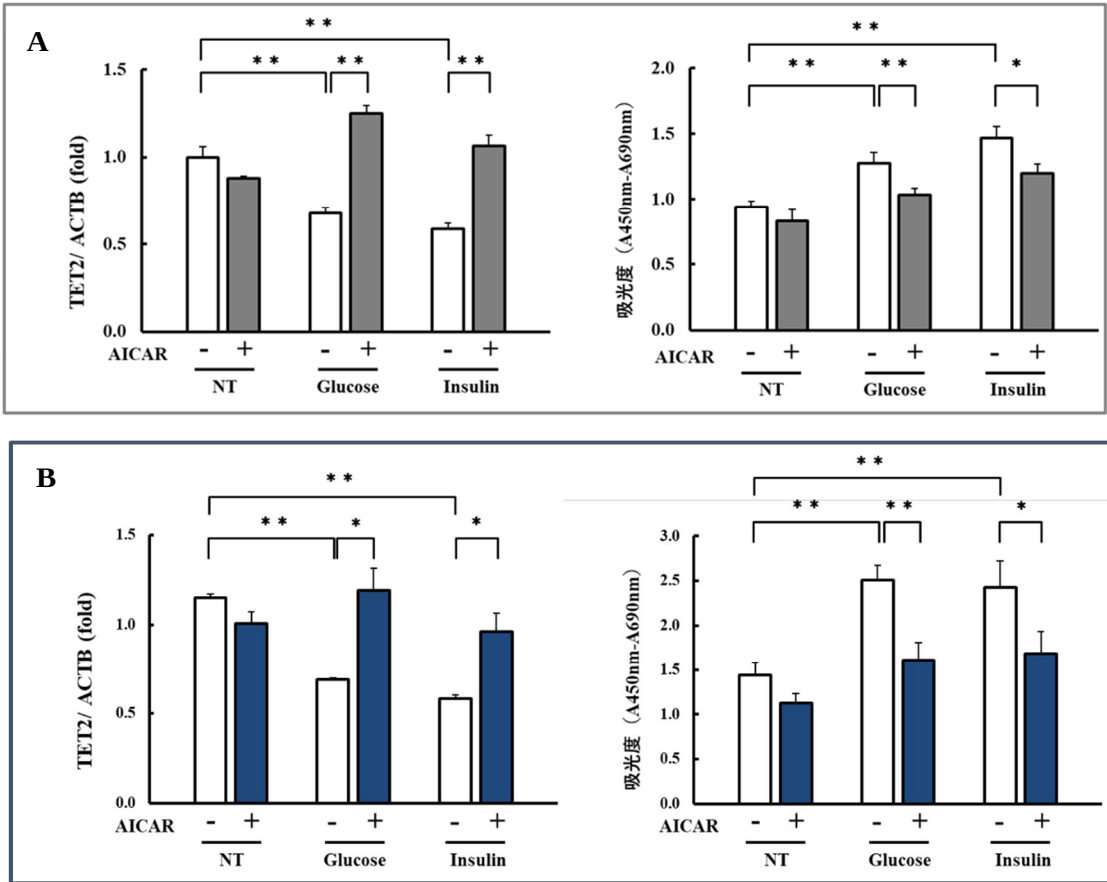
*TET2*siRNA のトランスフェクションより HT-29 では 74%、HCT116 では 85%の *TET2* 発現が抑制され、HT-29 (図 6A) HCT116 (図 6B) とともに有意に細胞増殖活性が増加した。

図 6



HT-29 (図 7A) および HCT116 (図 7B) への AICAR の投与は、グルコースやインスリンによって抑制された *TET2* の発現を有意に上昇させ、グルコースやインスリンによって増加した細胞増殖活性を有意に抑制した。現在、脱メチル化酵素に加え、メチル化関連酵素 DNMTs や DNA メチル化状態の更なる評価を継続して行っている。また、代謝因子によるメチル状態の変化が、メチル化関連転写因子の結合部位にどのような変化を与えるかを CUN&RUN method を用いてマッピングしている。

図 7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐々木悠, 阿部靖彦, 八木周, 水本尚子, 今孝志, 小野里祐介, 堺貴之, 梅原松樹, 伊藤南, 上野義之	4. 巻 8
2. 論文標題 肥満、メタボリックシンドロームと消化管病態の関連性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 消化器・肝臓内科	6. 最初と最後の頁 341-348
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Kon, Yu Sasaki, Yasuhiko Abe, Yusuke Onozato, Makoto Yagi, Naoko Mizumoto, Takayuki Sakai, Matsuki Umehara, Minamin Ito, Ayumi Koseki, Yoshiyuki Ueno
2. 発表標題 Insulin and glucose altered AMPK-TET2-5hmC axis toward on the obesity-related colorectal cancer development
3. 学会等名 DDW 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今 孝志、佐々木 悠、阿部 靖彦、小野里 祐介、八木 周、水本 尚子、堺 貴之、伊藤 南、梅原 松樹、小関 歩、上野 義之
2. 発表標題 肥満関連大腸癌におけるTET2遺伝子発現の検討
3. 学会等名 第107回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Kon, Yu Sasaki, Yasuhiko Abe, Takao Yaoita, Makoto Yagi, Naoko Mizumoto, Masakuni Shoji, Yusuke Onozato, Takayuki Sakai, Ayumi Koseki, Hidenori Sato, Yoshiyuki Ueno
2. 発表標題 Obesity and colorectal neoplasm: identifying obesity-associated somatic genomic signals from colorectal adenoma and carcinoma
3. 学会等名 DDW 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今孝志, 佐々木悠, 阿部靖彦, 小野里祐介, 佐藤秀則, 矢尾板孝夫, 八木周, 水本尚子, 東海林正邦, 堺貴之, 小関歩, 上野義之
2. 発表標題 肥満関連大腸腫瘍における遺伝子変化の特徴についての検討
3. 学会等名 第62回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------