

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390042

研究課題名（和文） 芳香族炭化水素受容体による大腸がん抑制機能

研究課題名（英文） AhR plays a role in suppression of intestinal carcinogenesis.

研究代表者

川尻 要（KAWAJIRI KANAME）

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・専門員

研究者番号：50142112

研究成果の概要（和文）：

芳香族炭化水素受容体（AhR）はリガンド依存的な転写因子および E3 ユビキチンリガーゼとして特定の蛋白質の細胞内レベルを調節している。AhR は、ダイオキシンや発がん物質ベンゾピレンなどと反応して奇形や発がんを引き起こすことが知られているが、本研究課題によって、AhR には β -カテニンの分解促進による大腸がん抑制機能を有することが証明され、自然界および化学的に設計された安全な AhR リガンドによる発がん予防が展望された。

研究成果の概要（英文）：

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor known to be involved in the promotion of chemical carcinogenesis. We demonstrated that AhR plays a tumor suppressor role in the intestine as an E3 ubiquitin ligase of β -catenin. Our findings suggest that chemoprevention with naturally-occurring and chemically-designed AhR ligands can be used to successfully prevent intestinal cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：遺伝子、環境、癌、シグナル伝達、炎症

研究開始当初の背景

AhRはベンゾピレンなどの芳香族炭化水素を

外来性リガンドとする受容体型転写因子であり、その標的遺伝子として発がん物質の代

謝活性化を促進するP450(CYP1A1, 1B1)が知られている。AhRが発がん促進に直接的に関与していることはAhR遺伝子欠損マウスにおいてベンゾピレン投与による皮膚がんの発生が見られなくなることで証明された[PNAS, 97, 779-782, (2000)]。一方、東大の加藤らはAhRにリガンド依存的なE3 ユビキチンリガーゼ活性を新たに見出した[Nature 446, 562-566, (2007)]。我々はAhRの活性化機構について細胞生物学的な視点より研究を進展させ、リガンド非依存的・細胞密度依存的にAhRの細胞内局在が変化することを見出したが、この性質はがん抑制遺伝子産物であるAPC, VHLと類似していた[J. Biol. Chem., 279, 19209-19216 (2004)]。

AhR遺伝子欠損(AhR^{-/-})マウスでは腸での炎症亢進も観察されていたので大腸がんの自然発症の研究を開始した。その結果、生後10W以降の全てのAhR^{-/-}マウスに大腸(特に盲腸部)に腫瘍が発生し、最終的には腺がんに至ることを見出した。大腸組織の増殖・分化は主にWntシグナル伝達系が重要な役割を担っており、その遺伝子変異はβ-カテニンの異常蓄積をもたらし、がん化を促進すると考えられている。そこでAhRとβ-カテニンの発現様式を対比させながら研究を進展させた。その結果、(1) AhRは小腸、及び盲腸に存在し腸内細菌に対する生体防御の役割に関与しているパネート細胞に主に発現している。(2) 腫瘍の形成が見られない時期のAhR^{-/-}マウス腸組織においても、野生型マウス(AhR^{+/+})と比較してβ-カテニンが細胞質・核に多く蓄積している。(3) ヒト大腸がん培養細胞でAhRリガンド依存的にβ-カテニンの分解、AhRとβ-カテニンの結合、及びユビキチン化が誘導された。また、*in vitro* システムでもAhRリガンド存在下でAhR E3ユビキチンリガーゼ複合体(CUL4B^{AhR})によるβ-カテニンのユビキチン化が促進された。(4) 腸内細菌で形成されるインドール-3-酢酸(IAA, オーキシン)がAhRナチュラルリガンドとしてAhRを活性化しβ-カテニンを分解する引き金となる。(5) β-カテニン依存的な転写活性はAhRリガ

ンドの存在により減少する。この減少はCUL4B^{AhR} E3ユビキチンリガーゼ複合体の構成成分に対するRNAiの存在で阻害されるがAPC siRNAでは影響されない。以上の結果からAhRは化学発がん物質による発がん促進作用とは反対に、大腸がん(盲腸がん)の発症を抑制する重要な働きを持つことが強く示唆された。

研究の目的

新たに発見したAhRによる大腸がん抑制機能について、従来のAPC依存的な分解系とは異なるナチュラルリガンド依存的AhR E3 ユビキチンリガーゼ活性によるβ-カテニン分解によることを提唱し、これを確立するものである。具体的には、(1) AhRおよびAPC経路によるβ-カテニン分解機構の関係、(2) AhRリガンドによる腸がん発生抑制、(3) 腸内細菌のAhR発現および炎症と発がんへの関連、盲腸部特異的発がんの分子機構の解明、(4) AhRのヒト大腸がんにおける役割などについて明らかにする。

研究の方法

(1) AhR 遺伝子欠損マウスと小腸に多数の腺腫が発生するAPC^{Min/+}マウス(Minマウス)との二重遺伝子欠損マウスを作製し、遺伝子型による発がん感受性を比較する。同時にAhR natural ligandsを添加した固形飼料で発がんが抑制されるかについて検討する。(2) 無菌状態でのAhRの発現レベルや、Germ-free AhR^{-/-}マウスの発がんについて検討し、発がんにおける腸内細菌の関与について調べる。(3) AhRはPlasminogen-activator inhibitor 2(PAI-2)遺伝子の発現を誘導し、カスパーゼ1の活性化を抑制することによりインフラマソーム複合体によるIL-1β/IL-18分泌を阻害して炎症を抑える。また、これらの炎症性サイトカインの亢進がAhR^{-/-}マウスで観察されることから、インフラマソーム複合体の中心的な構成成分であるASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)遺伝子欠損マウスとの二重遺伝子欠

損マウスでの発がんを検討し、AhR^{-/-}マウスでの発がんや炎症の関係を調べる。

研究成果

(1) Min マウスは APC 遺伝子変異によってβ-カテニンの分解低下とその異常蓄積により小腸に腺腫が多数発生することが知られている。β-カテニン分解における AhR および APC 経路の関連性を発がん感受性の視点より検討した。APC と AhR 遺伝子との二重遺伝子欠損マウスの盲腸での発がんを調べたところ、AhR allele の数が完全に欠損している Min/AhR^{-/-}で最も早期に発がんが確認され、次いで Min/AhR^{+/-}、Min/AhR^{+/+}の順であった。すなわち、Min マウスは AhR の allele-dose 依存的に発がん感受性が変化することが確認された。二重遺伝子欠損マウスでの早期の腫瘍の悪性化は組織学的診断によっても確認された。

(2) Min マウスでの発がんは AhR が発がん感受性に関連することから AhR リガンドである I3C (indole-3-carbi-nol), DIM (3,3'-diindolylmethane) を添加した固形飼料でマウスを飼育し、その発がんへの予防効果を調べた。これらのリガンドはアブラナ科野菜に多く含まれるグルコシノレートから腸内細菌の関与のもとに腸内で代謝・産生されるものである。リガンド添加効果は盲腸での腫瘍の発生時期、小腸での腺腫数を標準飼料で飼育された様々な遺伝子型をもつ Min/AhR 二重遺伝子欠損マウスで比較した。その結果、Min/AhR^{+/+}、Min/AhR^{+/-}では、盲腸での発がん遅延と小腸での腺腫数の減少が有意に確認されたが、AhR^{-/-}では腫瘍発生に影響を与えなかった。また、リガンド添加飼料で飼育したマウス腸のβ-カテニンの発現は adherence junction の部分を除いて大幅に減少していることが組織免疫染色による解析で観察された。従って、AhR は腸内で産生されるリガンドに依存して、β-カテニン分解を促進して発がんを抑制していることが明らかになった。(1), (2)の結果から、2つのβ-カテニン

分解系は独立的、かつ協調的に発がん抑制に働いていることが示された。また、低分子 AhR リガンドで APC 経路の遺伝子変異によるβ-カテニン分解低下・異常蓄積で多数の腫瘍が生じる Min マウスの発がんを減少させることは非常に重要な視点を与える。すなわち、①アブラナ科野菜はヒトの大腸がんに対して予防効果があるという疫学的な指摘への根拠となること、および②ヒト大腸がんではその80%以上に APC 経路に関連する遺伝子に変異があり、β-カテニン分解活性が低下している。AhR 経路を活性化することによる新たな大腸がん予防治療戦略、特に遺伝的に大腸がんが高危険度群の患者予備軍に対して自然界・化学的にデザインされた無害な低分子 AhR リガンドを適用することによって発症遅延を導くことができる可能性がある。

(3) AhR^{-/-}マウスでは炎症が促進されており、腸においても炎症性サイトカインの発現が高い。AhR ユビキチンリガーゼ欠損によるβ-カテニンの異常蓄積だけで発がんに至るのか、または発がんに炎症が関与するかについてを明らかにするために、①無菌 AhR^{-/-}マウス、及び②AhR/ASC 二重遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、両者のマウス系において共にβ-カテニンの蓄積は見られるものの、発がんの消失(無菌)及び遅延(AhR/ASC 二重遺伝子欠損)が観察され、AhR^{-/-}マウスの発がんには腸内細菌による炎症が発がんを促進させることが示唆された。

近年、ノトバイオートマウスを用いた方法により特定の腸内細菌が腸のどの領域に局在して、生育し、どのような働きをしているかについての研究が進展している。細菌種特異的に、腸での生育する場所やナイーブ T 細胞から Th17/Treg 細胞への分化の方向付けがなされているらしい。ナイーブ T 細胞の分化の方向性においても AhR が重要な働きをしていることを考慮すると、腸内細菌が盲腸特異的発がんに関与しているのかもしれない。AhR 欠損マウスでは、β-カテニンの異常蓄積と炎症亢進が同時に観察されることはすでに述

べたが、今後、発がんに至る両者の関係について、さらに詳しい研究が必要であろう。

主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K., Kato, S. Cross-talk of dioxin and estrogen receptor signals through the ubiquitin system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127** 102-107 (2011) (査読有)
- ② Ikuta, T., Ohba, M., Zouboulis, CC., Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K. B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *J. Dermatol. Sci.* **58** 211-216 (2010) (査読有)
- ③ Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **86**, 40-53 (2010) (査読有)
- ④ Sekine, H., Mimura, I., Oshima, M., Okawa, H., Kanno, J., Igarashi, K., Gonzalez, F.J., Ikuta, T., Kawajiri, K., and Fujii-Kuriyama, Y. Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Cell. Biol.* **29**, 6391-6400 (2009) (査読有)
- ⑤ Kawajiri, K., Kobayashi, Y., Ohtake, F., Ikuta, T., Matsusihima, Y., Mumura,

J., Petterson, S., Pollenz, R.S., Sakaki, T., Hirokawa, T., Kurosumi, M., Poellinger, L., Kato, S., and Fujii-Kuriyama, Y. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 13481-13486 (2009) (査読有)

- ⑥ Ikuta, T., Namiki, T., Fujii-Kuriyama, Y., and Kawajiri, K. AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 588-596 (2009) (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① Kawajiri, Kaname: AhR plays a role in suppression of intestinal carcinogenesis. The 15th Charles Heidelberger International Symposium in Cancer Research. (2010. 1. Phitsanulok, Thailand)
- ② 川尻 要: AhRによる大腸がん抑制機構. 第2回博多シンポジウム「内・外環境と生物応答」(2009. 10. 福岡)
- ③ Kawajiri, Kaname: AhR plays a role in suppression of intestinal carcinogenesis. HORIBA International Conference / CDBIM Symposium, The University of Tokyo. (2009. 10. 東京)
- ④ Ikuta, T., Kobayashi, Y., Kitazawa, M., Sekine, H., Itano, N., Kurosumi, M., Fujii-Kuriyama, Y., Taniguchi, S., Kawajiri, K.: β -catenin accumulation and ASC-mediated inflammation promote cooperatively intestinal carcinogenesis in AhR-deficient mice. 第68回日本癌学会, 2009年10月(横浜)
- ⑤ 生田統悟, 大場 基, 川尻 要: Ah レセ

プター (AhR) リガンドによる Blimpp1 mRNA の増加. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 (神戸)

- ⑥ 川尻 要 : Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) の大腸がん抑制機能について. 第 14 回日本家族性腫瘍学会学術集会・シンポジウム, 2008 年 6 月 (東京)

[図書] (計 1 件)

- ① Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. Regulation of AhR activity by the AhR repressor (AhRR). in The AH Receptor in Biology and Toxicology, John Wiley & Sons. Inc. 101-108 (2011)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

名称 : 腸がん抑制剤及び腸がん抑制作用を有する物質のスクリーニング方法

発明者 : 川尻 要

権利者 : 埼玉県

種類 :

番号 : 特願 2010-027578 号

出願年月日 : 2010 年 2 月 10 日

国内外の別 : 国内

[その他]

(1) [PNAS, 106, 13481-13486 (2009)] への論文発表を受けて、「発がん予防につながる新たな大腸がん抑制機構を発見 — 緑黄色野菜は大腸がん予防効果があること理由 —」の報道発表を平成 21 年 7 月 31 日に埼玉県庁記者クラブで行った。その詳細は埼玉県政ニュース平成 21 年 7 月 31 日に掲載された。報道発表を受け、同日の NHK ニュース、テレビ埼玉で報道される。8 月 1 日、毎日、読売、産経、埼玉新聞などで報道される。

(2) PNAS に発表した論文が Science-Business eXchange (BioCentury & Nature)

に取り上げられた [SciBX, 2 (No. 35), 11, (2009)]。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川尻 要 (KAWAJIRI KANAME)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・
専門員

研究者番号 : 50142112

(2) 連携研究者

生田 統悟 (IKUTA TOGO)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・
主任研究員

研究者番号 : 00262072

小林 康人 (KOBAYASHI YASUHITO)

埼玉県立循環器・呼吸器病センター (現在)

研究者番号 : 80425652