

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590747

研究課題名（和文） REG 蛋白による大腸粘膜再生と癌化に関する研究

研究課題名（英文） Role of REG protein in the regeneration and carcinogenesis of colorectal epithelial cells

研究代表者

福井 広一 (FUKUI HIROKAZU)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60378742

研究成果の概要（和文）：

REG 蛋白は大腸炎組織において Interleukin-6 (IL-6) や IL-22 などのサイトカイン刺激を受けて発現が誘導される。REG 蛋白には抗アポトーシス作用があり、この作用が炎症発癌に関与すると考えられた。REG 蛋白は潰瘍性大腸炎から発生する腫瘍の前癌病変に強発現することから、発癌予測マーカーとして臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

REG protein is induced by Interleukins 6 and 22 stimulations in colitis tissues. REG protein has an anti-apoptotic effect on colonic epithelial cells and its effect may play a role in the development of inflammation-related cancers. REG protein is overexpressed in the dysplastic lesion in ulcerative colitis tissues, and therefore, its detection may be an useful tool to not only diagnose but also predict ulcerative colitis-related neoplastic lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：遺伝子，癌，再生医学，病理学，臨床

1. 研究開始当初の背景

炎症組織では組織再生が盛んに行なわれ、その際に生じる生体反応の異常が発癌につながる可能性がある。REG 遺伝子は炎症によって傷害された消化管粘膜が再生する過程で強発現することが知られているが、我々は REG 遺伝子が胃炎・胃潰瘍および潰瘍性大腸

炎で REG 遺伝子が強発現し、その発現にはサイトカインが重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、REG 遺伝子が潰瘍性大腸炎組織において大腸粘膜の再生に深く関与していること、さらには、REG 蛋白が胃癌や大腸癌などの消化管癌の発生に役割を果たすことを報告してきた。

2. 研究の目的

- (1) 炎症に傷害された大腸粘膜上皮細胞に REG 発現が誘導される機序を明らかにすること.
- (2) 潰瘍性大腸炎における REG 発現の臨床病理学的意義を明らかにし, そこから発生する前癌病変の診断マーカーとして REG 発現が有用であるか検討すること.
- (3) REG 蛋白の抗アポトーシス作用に焦点を当て, REG 蛋白が癌細胞の生存や増殖に果たす役割と, その分子メカニズムを明らかにすること.

3. 研究の方法

(1) Reg 遺伝子の発現制御機構の検討

- ① 大腸癌細胞株を用い, 組織再生時に重要な役割をしている各種のサイトカイン・ケモカイン, 増殖因子による刺激実験を行う. その際, MAPK 経路, NF- κ B 経路, JAK-STAT 経路を中心に遺伝子発現に関わる細胞内シグナル伝達経路の活性化を Western 法で確認し, さらにそれぞれの経路で特異的な阻害剤を用いてシグナル伝達阻害実験を行う.
- ② Reg 遺伝子のプロモーター活性を promoter deletion assay によって評価し, 遺伝子転写に重要な領域を決定して, Reg 遺伝子の発現を制御している転写因子について検討する.

(2) 大腸炎炎症発癌モデルマウスの大腸病変における Reg 蛋白の発現に関する検討

- ① *p53* ホモノックアウト (KO), *p53* ヘテロ KO およびそれらの対照となる野生型マウスを作成し, 4% DSS を 1 週間経口摂取・2 週間休薬のクールを 2クール行い, 大腸炎症発癌モデルを作成する. この大腸炎症発癌モデルから経時的に大腸組織を摘出し, 炎症から発癌までの病変を病理組織学的に観察するとともに, それらの組織における Reg 蛋白の発現を免疫組織学法で検

討する.

- ② 野生型マウスと Reg KO マウスにそれぞれ炎症誘発剤である dextran sodium sulfate (DSS) を投与し, 大腸炎モデルを作成する. そのうえで経時的に大腸組織を採取し, Reg 蛋白の発現と病理組織学的因子の評価を行い, それらの関連を解析する.

(3) Reg 蛋白の作用機序に関する検討

- ① Reg 受容体を発現する大腸癌細胞株をスクリーニングし, リコンビナント Reg 蛋白を投与して細胞増殖やアポトーシス作用を検討する.
- ② Reg 蛋白で刺激した大腸癌細胞と非刺激大腸癌細胞を用い, マイクロアレイ法によって Reg 蛋白で刺激によって著明に発現変化する遺伝子を同定する.
- ③ 大腸癌細胞株に Reg 受容体遺伝子発現を抑制する siRNA probe を導入し, 癌細胞の動態を検討する.

(4) 潰瘍性大腸炎における REG 蛋白と IL-22 の関連

潰瘍性大腸炎の病態形成に重要な役割を果たす IL-22 に注目し, 潰瘍性大腸炎における REG 蛋白と IL-22 の関連についても検討を行う.

- ① 潰瘍性大腸炎組織より RNA を抽出し, realtime RT-PCR によって REG および IL-22 遺伝子発現を評価し, 臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析する.
- ② IL-22 と IL-22 受容体を発現する細胞を免疫組織学的に同定する.
- ③ 大腸癌細胞株を用い, IL-22 による REG 発現機序を *in vitro* 実験によって検討する.

4. 研究成果

(1) Reg 遺伝子の発現制御機構の検討

- ③ 大腸癌細胞株 LoVo および SW403 細胞を IL-6, IFN γ で刺激したところ Reg I 遺伝子の発現増強が認められた. 一方, REG IV 遺伝子は TGF- α , bFGF, HGF などの増殖因子の刺激によって発現が増強された.

④ IL-6 刺激によって ERK および STAT3 のリン酸化が亢進した. Reg I⁺ 遺伝子は STAT3 シグナルを STAT3 siRNA で抑制することによって発現が抑制されたが, ERK シグナルを阻害剤で抑制しても Reg I⁺ 遺伝子発現は抑制されなかった. これらのことから, Reg I⁺ 遺伝子には Jak-STAT3 経路が重要であることが示唆された. 他方, REG IV 遺伝子発現は MEK inhibitor によって抑制され, その発現には MAPK 経路が重要であることが示唆された.

⑤ Reg I⁺ 遺伝子のプロモーター活性を解析した結果, IL-6 反応責任部位は -142 ~ -134 に存在することが明らかになった. さらには, EMSA 法にて, 同部位への STAT3 結合を確認したところ, 実際 Reg I⁺ 遺伝子プロモーターに STAT3 が結合することが証明された.

(2) 大腸炎炎症発癌モデルマウスの大腸病変における Reg 蛋白の発現に関する検討

① *p53* ホモノックアウト (KO) に DSS を投与したところ, 慢性の大腸炎が惹起され, 12 週後に潰瘍大腸炎関連腫瘍に類似した大腸腫瘍が確認された.

② 大腸腫瘍細胞では b-catenin の異常な核集積像が認められ, Ki-67 陽性細胞数が増加していた. これらのことから, この腫瘍が強い細胞増殖能を有することが示唆された. また, 同腫瘍では Reg 蛋白の発現も確認され, Reg 蛋白が細胞増殖に関与する可能性が示された.

③ *Reg* KO マウスを用いた大腸炎モデルでは, 野生型に比較して *Reg* KO マウスにおいて血便, 体重減少, 高度の大腸短縮が認められた. 組織学的評価では, *Reg* KO マウスにおいて有意に高度の炎症細胞浸潤が認められた.

(3) Reg 蛋白の作用機序に関する検討

① 胃癌細胞株 AGS細胞および大腸癌細胞株 SW403 細胞 REG I⁺ 蛋白で

刺激したところ Akt のリン酸化が亢進し, その反応は抗 REG I⁺ 抗体の投与によって抑制された. また, Akt の下流で機能する抗アポトーシス分子の発現変化を検討したところ, REG I⁺ 投与によって Akt/Bad 経路が作用して, Bcl-xL の発現が増強することが明らかになった. また, REG I⁺ 蛋白の抗アポトーシス作用を TUNEL 法で検討した結果 REG I⁺ 蛋白は胃癌・大腸癌細胞に抗アポトーシス作用を示した. これらのことから, REG I⁺ 蛋白は Bcl-xL の発現を介してミトコンドリアからのチトクロム C の放出を抑制して抗アポトーシス作用を有する可能性が示唆された.

② STAT3 が炎症発癌で重要な役割を果たすことが報告されているが, REG Ia を強発現癌細胞株に対する STAT3 siRNA を導入実験を行った結果, STAT3 の抗アポトーシス作用の一部を REG I⁺ 蛋白が担っていることを示した.

③ Methylation-specific PCR 法を用い, 大腸粘液癌において Reg 受容体遺伝子のメチレーションが起きていることを示した. さらには, 大腸癌細胞の Reg 受容体遺伝子発現を siRNA システムで抑制したところ, 大腸癌細胞のヘパラン硫酸発現が抑制された.

(4) 潰瘍性大腸炎における REG 蛋白と IL-22 の関連

① 潰瘍性大腸炎組織における IL-22 と REG 蛋白の関連について検討を行った結果, 炎症によって傷害された大腸上皮細胞周囲に存在するリンパ球より IL-22 が産生されること, その産生された IL-22 が大腸上皮に発現する IL-22 受容体を介して REG 発現を誘導する可能性が示唆された. 次に, 大腸癌細胞株を用い, IL-22 が REG 発現を誘導する機序を *in vitro* 実験で検討した結果, IL-

22 が STAT3 シグナルおよび一部 M APK シグナルを介して REG 発現を誘導することを明らかにした。加えて、潰瘍性大腸炎に発生した癌の間質組織において IL-22 発現が増強し、癌組織では IL-22 および REG 発現が共に増強している所見を認めた。これらのことから、IL-22/STAT3/REG シグナルが潰瘍性大腸炎からの癌化に重要な役割を果す可能性が示唆された。

- ② 潰瘍性大腸炎関連癌の前癌状態 dysplasia における REG 蛋白発現を病理組織学的に検討した。その結果、非腫瘍性病変から dysplasia 病変に至る過程で REG 蛋白発現分布が基底部から粘膜表層部へ拡大し、dysplasia の異型度が高度になる程、REG 蛋白発現分布が拡大することを見出した。さらには、REG 蛋白発現パターンが P53 異常発現と関連することを示し、REG 蛋白発現が dysplasia 病変のマーカー候補になる可能性が示された。

5. 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 11 件)

- ① Tanaka H, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Yamagishi H, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Yasuda Y, Chiba T, Fujimori T. Immunohistochemical analysis of REG I expression in ulcerative colitis-associated neoplastic lesions. *Digestion* 83: 204-209, 2011. (査読あり)
- ② Ogata H, Sekikawa A, Fukui H. (他 9 名, 12 番目). GRO colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 24: 1479-1486, 2010. (査読あり)
- ③ Hakata Y, Fukui H, Sekikawa A, Yamagishi H, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Kawamata H, Imai Y, Fujimori T. Expression of β -catenin and REG I relation to cell proliferative ability in salivary gland tumors. *Exp Ther Med* 2010; 1: 437-443. (査読あり)
- ④ Sekikawa A, Fukui H, Suzuki K, Karibe T,

Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Shiratori K, Chiba T, Fujimori T. Involvement of the IL-22/REG I axis in ulcerative colitis. *Lab Invest* 2010; 90: 496-505. (査読あり)

- ⑤ Yamagishi H, Fukui H, Sekikawa A, (他 8 名, 2 番目). Expression profile of REG family proteins, REG I advanced gastric cancer: Comparison with mucin phenotype and prognostic markers. *Modern Pathol* 22: 906-13, 2009. (査読あり)

- ⑥ Kimura T, Fukui H, Sekikawa A, (他 9 名, 2 番目). Involvement of REG I in the regeneration of ductal epithelial cells in the minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 155: 16-20, 2009. (査読あり)

- ⑦ Abe A, Fukui H, Fujimori T. (他 15 名, 2 番目). Role of Necl-5 in the Pathophysiology of colorectal lesions induced by dimethylhydrazine and/or dextran sodium sulfate. *J Pathol* 217: 42-53, 2009. (査読あり)

- ⑧ Karibe T, Fukui H, Sekikawa A, Shiratori K, Fujimori T. *EXTL3* promoter methylation down-regulates *EXTL3* and heparan sulphate expression in mucinous colorectal cancers. *J Pathol* 216: 32-42, 2008. (査読あり)

- ⑨ Mukawa K, Fukui H, Fujimori T. (他 12 名, 7 番目). Inhibitory effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, on colitis-associated tumorigenesis in *p53*-deficient mice treated with dextran sulfate sodium. *Oncol Rep* 19: 393-399, 2008. (査読あり)

- ⑩ Yoshitake N, Fukui H, Yamagishi H, Sekikawa A, Fujii S, Tomita S, Ichikawa K, Imura J, Hiraishi H, Fujimori T. Expression of SDF-1 promotes invasion of predict lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 98: 1682-1689, 2008. (査読あり)

- ⑪ Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. REG I anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 29: 76-83, 2008. (査読あり)

axis in

and REG IV in

protein

and nuclear CX

in protein me

[学会発表] (計 3 件)

- ① 福井広一. 潰瘍性大腸炎関連腫瘍における REG I 発現の意義第99回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日 東京
- ② 福井広一. 潰瘍性大腸炎粘膜におけるインターロイキン 22 および REG I α の発現について第 68 回日本癌学会学術総会2009 年 10 月 2 日 横浜
- ③ 福井広一. *EXTL3* promoter methylation is involved in the reduction of heparan sulfate expression in mucinous colorectal cancers. 日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 広一 (FUKUI HIROKAZU)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：60378742

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：