

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04123

研究課題名(和文)腸内アミノ酸調整による腫瘍発生の回避とその機序の解明

研究課題名(英文)Prevention of tumor development by elucidation of function of amino acids

研究代表者

星 奈美子(Hoshi, Namiko)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40645214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌は日本では戦後に増加し、癌死亡率女性1位、男性3位となっている。疫学的に赤肉や加工肉の摂取がリスク因子として挙げられ、遺伝的因子に加え栄養状態などの環境因子の重要性を示唆するが、その機序は未解明である。

本課題では、肉類の主要な栄養素であるアミノ酸の腸管腫瘍発生での役割について検討することとした。アプローチとして、多くの必須アミノ酸のトランスポーターであるL-type amino acid transporter-1(LAT1)に着目して検討を行い、LAT1が正常な小腸上皮の分化に必要であることや、LAT1欠損により小腸腫瘍の発生に影響が出ることを見出し、論文等で発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LAT1は、本課題開始当初、大腸癌細胞特異的に発現し腫瘍増殖に寄与すると考えられていたが詳細な機能は不明であった。そこで、腸管上皮でのみLAT1が欠損する腫瘍モデルマウスを作成し解析した。結果として、想定外にもLAT1は正常陰窩上皮で恒常的に発現し、LAT1欠損でパネート細胞数が激減することを見出した。LAT1欠損は腫瘍径の減少だけでなく発生数も有意に抑制することを観察し、パネート細胞が分泌するWnt3蛋白の産生減少が関わることが示唆された。栄養素と腫瘍発生の関わりを示す基礎研究結果であり、食生活からの大腸がん予防法の開発など社会還元発展させることが期待できる有意義な成果と考える。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer has increased during a few decades after the World War II, it is now ranked first among women and third among men in terms of cancer mortality.

Epidemiologically, consumption of red and processed meat has been identified as risk factors, suggesting the importance of environmental factors such as nutritional status in addition to genetic factors, but the mechanism is not yet clarified.

In this project, we decided to investigate the role of amino acids, the major nutrients in meat, in intestinal tumorigenesis. As an approach, we focused on L-type amino acid transporter-1 (LAT1), a transporter of many essential amino acids, and found that LAT1 is required for normal small intestinal epithelial differentiation and that LAT1 deficiency affects small intestinal tumorigenesis. The findings were presented at domestic and international conferences and published in a literature.

研究分野：消化器病学

キーワード：アミノ酸 腸管腫瘍 予防

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は世界の癌罹患率第3位で、日本では戦後に増加し、癌死亡率女性1位、男性3位となっている。比較的短い時間での罹患率の上昇は遺伝的因子のみでは説明がつかず、環境因子の関わりが要因として推測される。疫学的に赤肉や加工肉などが増加因子として挙げられるが、その機序は未解明であった。申請者は、食事の変化による腫瘍増加は機序究明により食生活からのがん予防につながる可能性があると考え、肉類の主要な栄養成分であるタンパク質・アミノ酸に注目し、予備検討として単位当たりのカロリー量は同等だがアミノ酸含有量が異なる食餌をマウスに与えたところ、ある特定のアミノ酸を減量することで劇的に腫瘍が減少する形質を観察した。

2. 研究の目的

本課題の目的は、腸管腫瘍におけるアミノ酸の重要性を検討し将来的な食からのがん予防に発展させるための基礎的エビデンス蓄積を見据え、特定のアミノ酸やアミノ酸トランスポーターによる腸管腫瘍発生の修飾について検討し機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 9種類ある必須アミノ酸から、バリン、ロイシン、リジン、また非必須アミノ酸であるアルギニンの含有量を変えた特殊食を作成して腫瘍モデルマウスである $Apc^{Min/+}$ マウスに与えることで腫瘍形成が修飾されるか確認した。

(2) アミノ酸トランスポーターである L-type amino acid transporter1 に着目し、これが腸管上皮でのみ欠損するマウス株を作製した ($LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre$ マウス株)。更にこれを $Apc^{Min/+}$ マウスと交配することで腸管上皮特異的 $LAT1$ 欠損腸管腫瘍モデルであるマウス株 $LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}$ を作製し、腸管腫瘍の発生と成長に変化がおきるか観察を行った。

4. 研究成果

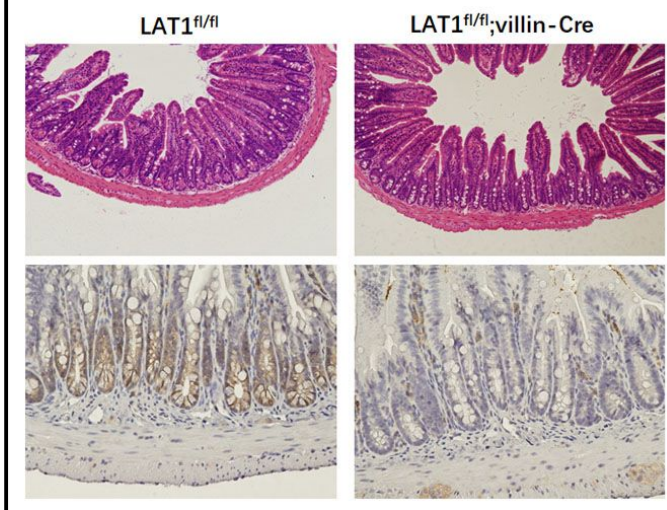
(1) 必須アミノ酸から、バリン、ロイシン、リジン、また非必須アミノ酸であるアルギニンを90%原料させたマ特殊飼料を作製し、 $Apc^{Min/+}$ マウスに投与し毎週の体重変化の確認と、15週齢で腸管腫瘍数とサイズの確認を行った。バリン制限では、摂食行動自体が抑制されることが判明し、中止した。ロイシン、リジン、アルギニン減量食ではマウスの行動に異常を認めず、15週齢まで問題なく完遂すること可能であった。リジン、ロイシンの必須アミノ酸減量食ではコントロール飼料群よりも個体の成長(体重)が抑制されたが、抑制レベルはリジン、ロイシンの両群で同等であった。一方15週齢における腫瘍形成を確認したところ、小腸腫瘍において、ロイシン減量は劇的に腫瘍数が減少し、コントロール食群、リジン減量、アルギニン減量食群では差を認めなかった。

(2) (1)の結果から、 $Apc^{Min/+}$ マウスの小腸腫瘍形成においては、ロイシンが重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、ロイシンは輸送するがリジンは輸送しないアミノ酸トランスポーターである $LAT1$ に着目し、腸管上皮特異的 $LAT1$ 欠損腸管腫瘍モデルであるマウス株 $LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}$ を作製し、腸管腫瘍の発生と成長に変化がおきるか観察を行った。 $LAT1$ はこれまで、腸管の正常上皮にはほとんど発現せず、大腸癌など腫瘍細胞でのみ発現するとの考えが一般的であった。しかし、 $LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre$ マウスの詳細な検討から、 $LAT1$ は腸陰窩の上皮細胞に限定的だが、恒常的に発現すること、さらにパネート細胞の数に有意な影響を与えることを確認した。 $LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre$ マウスでは、 $LAT1$ が効率よく欠損できていることも確認した(図1)

(3) $LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}$ マウスの解析結果：

コントロール $LAT1^{flox/flox}; Apc^{Min/+}$ マウス群 ($LAT1$ 発現あり) と $LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}$ マウス群 ($LAT1$ 欠損群) では、小腸腫瘍数が $LAT1$ 欠損群で有意に減少することが判明した(図2)。しかし、大腸腫瘍数に関しては両群間で有意な相

図1： $LAT1$ は正常陰窩で恒常的に発現
欠損によりパネート細胞が有意に減少する。



違いは認められなかった。

腫瘍の成長には、腫瘍細胞の増殖スピードの変化、腸内細菌叢の影響や、腸管免疫の炎症状態、またアポトーシス亢進などが影響することが知られているため、これらについて各論的に検討した。

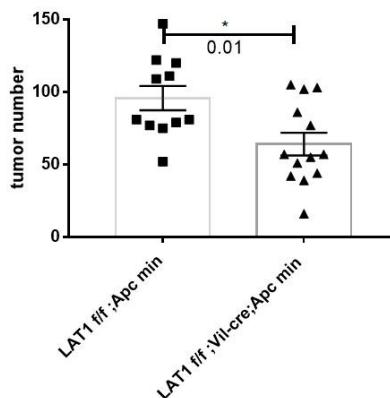
免疫染色にて ki67 の染色性を確認したところ、LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}腫瘍では LAT1^{flox/flox}; Apc^{Min/+}腫瘍に比べて陽性細胞が有意に減少していた。

腸内容物を回収して、16SrRNA 遺伝子のシーケンスで腸内細菌叢の解析を行ったが両群間で有意な相違は検出されなかった。

腸管組織から mRNA を抽出し、定量 PCR にて炎症性サイトカインの遺伝子発現量をしらべたが、両群間で有意な差は認めなかった。

免疫染色で TUNEL 染色を使用してアポトーシスについて評価した。LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}腫瘍では LAT1^{flox/flox}; Apc^{Min/+}腫瘍に比べて TUNEL 陽性細胞が有意に増加しており、アポトーシス亢進が認められるものと判断した。

図2：LAT1欠損によりApcMinマウスの小腸腫瘍は減少する

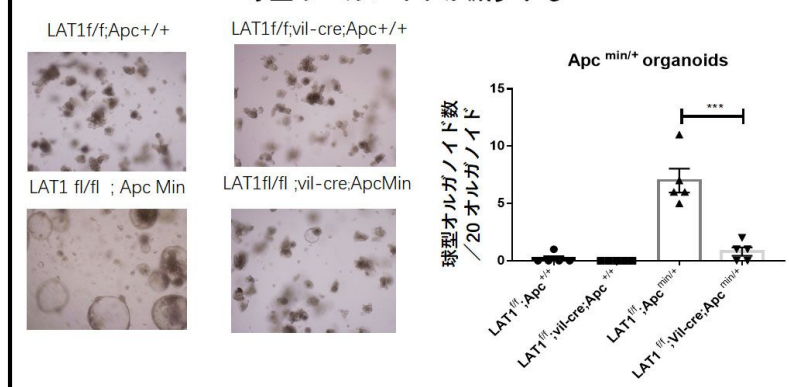


以上の結果から、LAT1 欠損により LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}腫瘍ではアミノ酸の細胞内輸送量が減少し、mTOR 経路の活性化が抑制され、アポトーシス亢進が起こるものと考えた。

そこで、腫瘍組織からタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティングにて mTOR1 活性化の評価として S6K1 リン酸化の状態を確認したところ、予想通り LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}でリン酸化が減少していた。また、アポトーシスについては、同様にウェスタンブロッティングにて cleaved Caspase3 を確認し、こちらも想定通り LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}で cleaved Caspase3 が増加していることを検出した。

これら、in vivo の結果を in vitro 実験で再現性があるか確認するため、LAT1^{flox/flox} マウス、LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre マウス、LAT1^{flox/flox}; Apc^{Min/+} マウス、LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+} マウスの4株からそれぞれ小腸末端の組織を使用し腸管オルガノイドを作製した。Apc^{Min/+} 組織からのオルガノイドは Wnt 経路が無秩序に活性化することで、球型となることが知られているが、LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+} から作成したオルガノイドでは、球型の数が激減し、Apc^{+/+}野生型と同様の「Budding」とよばれる形態のオルガノイドが多数観察された(図3)。この結果は、LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre; Apc^{Min/+}では腫瘍細胞の増殖抑制やアポトーシスの亢進のみで腫瘍の成長が抑制されるだけでなく、腫瘍の発生自体が抑制されていることが示唆された。そこで、球型オルガノイド発生のポイントとなる Wnt3 タンパクの発現量を確認したところ LAT1^{flox/flox}; Villin-Cre 組織では、Wnt3 が有意に減少することが確認され、腫瘍発生の数も減少しているものと考えられた。Wnt3 は主に小腸のパネート細胞細胞が産生源であることから、本研究において小腸腫瘍で腫瘍が減少するが大腸腫瘍では差異が認められなかった理由と考えられた。既報告において、パネート細胞特異的な Wnt3 欠損マウスでは、我々の結果と全く同様に Apc^{Min/+}腫瘍が小腸で減少し大腸では減少しないことが報告されている^{#1}。我々の結論と一致しており本研究の研究結果をサポートするものとする。

図3：LAT1欠損によりApcMinマウスの球型オルガノイドが減少する



これまで、LAT1 が腫瘍細胞自体のアミノ酸輸送に関わり腫瘍成長に促進的に働くという報告はある。しかし、我々の発見は、LAT1 がパネート細胞の数を変化させ Wnt3 産生を介し “ Cell-Extrinsic manner ” で腫瘍の発生に影響することを示し、新規知見として世界に先駆けて論文発表することができた^{#2}。

引用文献

#1 Chen et al., Life Sci Alliance, 2020, doi:10.26508/lsa.202000934

#2 Sui and Hoshi et al, J Gastroenterol, 2023, doi: 10.1007/s00535-023-01960-5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sui Yunlong, Hoshi Namiko, Ohgaki Ryuichi, Kong Lingling, Yoshida Ryutaro, Okamoto Norihiro, Kinoshita Masato, Miyazaki Haruka, Ku Yuna, Tokunaga Eri, Ito Yuki, Watanabe Daisuke, Ooi Makoto, Shinohara Masakazu, Sasaki Kengo, Zen Yoh, Kotani Takenori, Matozaki Takashi, Tian Zibin, Kanai Yoshikatsu, Kodama Yuza	4. 巻 58
2. 論文標題 LAT1 expression influences Paneth cell number and tumor development in ApcMin/+ mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 444 ~ 457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-023-01960-5	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 -

1. 著者名 Kong Lingling, Hoshi Namiko, Sui Yunlong, Yamada Yasutaka, Yoshida Ryutaro, Ooi Makoto, Tian Zibin, Kimura Ikuo, Kodama Yuza	4. 巻 31
2. 論文標題 GPR43 Suppresses Intestinal Tumor Growth by Modification of the Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Activity in Apc ^{Min/+} Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Principles and Practice	6. 最初と最後の頁 39 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000518621	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 星奈美子、隋雲竜、児玉裕三
2. 発表標題 腸管腫瘍の発生と細胞増殖におけるL-type amino acid transporter1 の役割とその機序の検討
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 隋雲竜、星奈美子、大垣隆一、伊藤裕貴、小谷武徳、的崎尚、児玉裕三
2. 発表標題 腸管腫瘍におけるアミノ酸トランスポーターLAT1の役割について
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yunlong Sui, Namiko Hoshi, Ryuichi Ohgaki, Ryutaro Yoshida, Norihiro Okamoto, Masato Kinoshita, Haruka Miyazaki, Yuna Ku, Eri Tokunaga, Daisuke Watanabe, Makoto Ooi, Kengo Sasaki, Yoh Zen, Takenori Kotani, Takashi Matozaki, Yoshikatsu Kanai, Yuzo Kodama
2. 発表標題 ROLES OF L-TYPE AMINO ACID TRANSPORT 1 IN THE DEVELOPMENT OF INTESTINAL TUMORS
3. 学会等名 United European Gastroenterology Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	佐々木 大介 (Sasaki Daisuke) (00650615)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教 (14501)	
研究分担者	佐々木 建吾 (Sasaki Kengo) (50558301)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・客員准教授 (14501)	

	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
研究協力者	大垣 隆一 (Ohgaki Ryuichi)		
研究協力者	金井 好克 (Kanai Yoshikatsu)		

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
---------	---------