

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08350

研究課題名(和文) 肥満、代謝異常によるRNA転写後制御の変調を介した新しい大腸発がん機序の解明

研究課題名(英文) Post-translational Modifications of RNA-binding Proteins in obesity-associated colorectal carcinogenesis

研究代表者

佐々木 悠 (Sasaki, Yu)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60466620

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)：肥満の大腸癌では細胞質におけるHuRの発現が増加していました。また大腸癌細胞では、インスリンによりHuRの核内から細胞質へ移行が高まり、HuRに結合するmRNA量が約4倍以上増加しました。網羅的なトランスクリプトーム解析から、HuRとの結合が2倍以上増加した38のmRNAsを同定しました。結合性が最も低下していたX geneではmRNAの安定性が50%低下していました。この遺伝子のノックアウトマウスでは小腸にリンパ腫様の腫瘍がみられました。今後、さらなる解析をすすめ、HuRによるRNAの転写後調節を介した大腸発癌機序を明らかにし、効果的な予防や治療を可能とする新しい分子基盤を創出します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肥満関連大腸癌におけるRNA結合蛋白HuRの核細胞質移行や標的mRNAsの変化、および大腸癌の発育進展に関わる可能性のある新規の標的遺伝子を明らかにしました。代謝変化によるHuRを介したRNA転写後制御の変調が肥満関連大腸発癌を導くという新しい機序を解明し、それを制御する方策を見出すことで、世界的に増えている肥満関連大腸癌の征圧につなげることが期待できます。

研究成果の概要(英文)：The expression of HuR in the cytoplasm exhibited an increase in colorectal cancers among individuals with obesity. Additionally, in colon cancer cell lines, insulin induced the translocation of HuR from the nucleus to the cytoplasm and significantly augmented the mRNA binding to HuR by at least a fourfold increase. Through a comprehensive transcriptome analysis, I identified 38 mRNAs with a more than twofold enhanced binding affinity to HuR. Notably, the X gene, which displayed the most substantial decrease in binding, experienced a 50% reduction in mRNA stability. Intriguingly, knockout mice lacking this gene exhibited lymphoma-like tumor growth in the small intestine. Further investigation will elucidate the precise mechanism by which HuR-mediated post-transcriptional regulation of RNA contributes to colon carcinogenesis. Moreover, these findings will lay the foundation for developing novel molecular strategies to effectively prevent and treat colon cancer.

研究分野：消化器病学

キーワード：大腸癌 大腸腺腫 肥満 代謝 メタボリックシンドローム インスリン抵抗性 RNA修飾

1. 研究開始当初の背景

肥満、メタボリックシンドローム (MS) の増加を背景に、本邦では大腸癌の患者さんが増えています。この肥満に関連して発生する大腸癌及びその前癌病変である大腸腺腫の病態の中核には、インスリン抵抗性に基づく高インスリン血症、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があることを報告してきました。しかしながら、肥満やMSにおけるこのような因子の変調が、どのようにして大腸発癌を導くのか、その直接的な分子機序は未だ不明な点が多いのが現状です。今後、ますます増加が見込まれる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は極めて重要な課題であります。

最近、RNA の転写後制御に関わる RNA 結合蛋白の一つである human antigen R (HuR) の機能異常が、肥満、インスリン抵抗性と関連することが報告されています。この HuR は、様々な RNA の AU リッチ配列 (ARE) と結合し、そのスプライシング、局在、安定性、翻訳の制御に関与していることが知られています。サイトカインや増殖因子をコードする mRNA には、その 3' 側非翻訳領域に ARE が高頻度に存在します。大腸癌細胞では、発癌と関連する mRNA に結合した HuR の核から細胞質への輸送が促進され、その mRNA の安定性が亢進し、発癌に促進的な役割を果たすことも知られています。この HuR による mRNA の安定性維持に重要な核細胞質輸送は、細胞内のエネルギーセンサーである AMPK に制御を受けることが報告されています。さらに、HuR はカスパーゼ 2 の翻訳を制御してアポトーシスを抑制し、大腸癌の治療抵抗性にも関与することが報告されています。カスパーゼ 2 は、肥満における生体内ホメオスタシス破綻の一因とされる脂肪酸蓄積による細胞のアポトーシスに重要な因子です。これらのことを考えますと、HuR による RNA の転写後調節は肥満関連大腸発癌の発育進展に極めて重要な役割があるのではないかと、という仮説が立てられます。

2. 研究の目的

RNA 結合蛋白 HuR に着目し、肥満関連大腸発癌における RNA 転写後調節の役割を解析し、肥満、MS からの大腸がんの発育進展に関わる新しい分子機序を明らかにすること。

3. 研究の方法

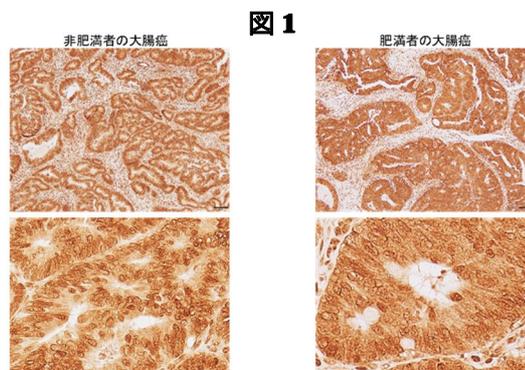
切除された大腸癌組織および大腸癌細胞株を用い、肥満環境が HuR の局在変化に与える影響を解析しました。さらに抗 HuR 抗体による RNA 免疫沈降を行い、得られた RNA の網羅的なトランスクリプトーム解析から、特に代謝異常と関連して HuR と結合する標的 mRNA を同定しました。この標的遺伝子をノックアウトしたマウスを作成し、その表現型を検討しました。

4. 研究成果

(1) 肥満環境下では HuR の細胞質への移行が促進される

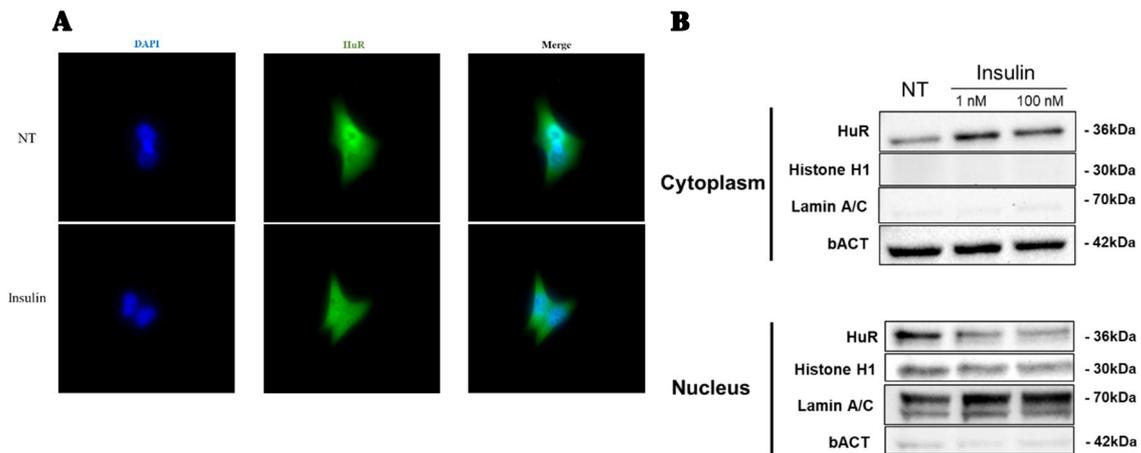
内臓脂肪面積が 100 cm² 以上の肥満者とそれ以下の非肥満者の大腸癌の HuR の発現レベルを比較したところ、肥満者の大腸癌では細胞質の HuR の発現が上昇していました (図 1)。

大腸癌細胞株を用い、蛍光免疫染色で HuR (緑



色)の局在を観察したところ、非刺激(NT)ではHuRは核内に集積していましたが、インスリン刺激を行うと核内の濃度は低下しました(図2A)。核と細胞質から分けてタンパク質を抽出し、ウスタンプロットでHuRの局在を検討すると、インスリン刺激ではHuRは核内より細胞質に増えることが分かりました(図2B)。

図2



(2) HuRの標的 mRNA の同定

インスリンを大腸癌細胞株に投与した際に **HuR** に結合する **mRNA** について **RNA** 免疫沈降を用いて検討したところ、インスリン刺激では **HuR** に結合する **mRNA** 量が非刺激細胞に比し **4** 倍以上増加 ($p < 0.001$) することが分かりました(図3)。さらに **HuR** の細胞質への移行が助長されたインスリン刺激下で **HuR** に結合した **mRNAs** を抽出し、網羅的なトランスクリプトーム解析 (**RIP**) を行いました。インスリン刺激下で **HuR** との結合レベルに **2** 倍以上の変化がある **38** の **mRNAs** を同定できました(図4)。

図3

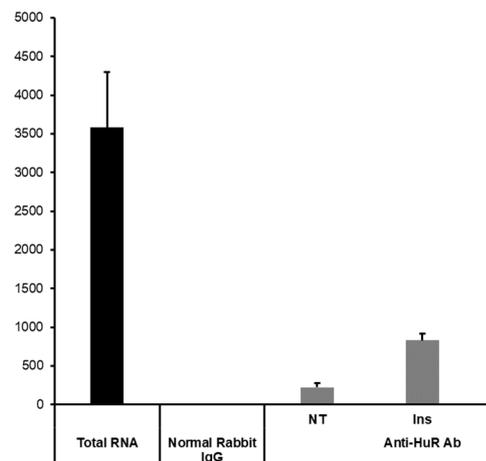
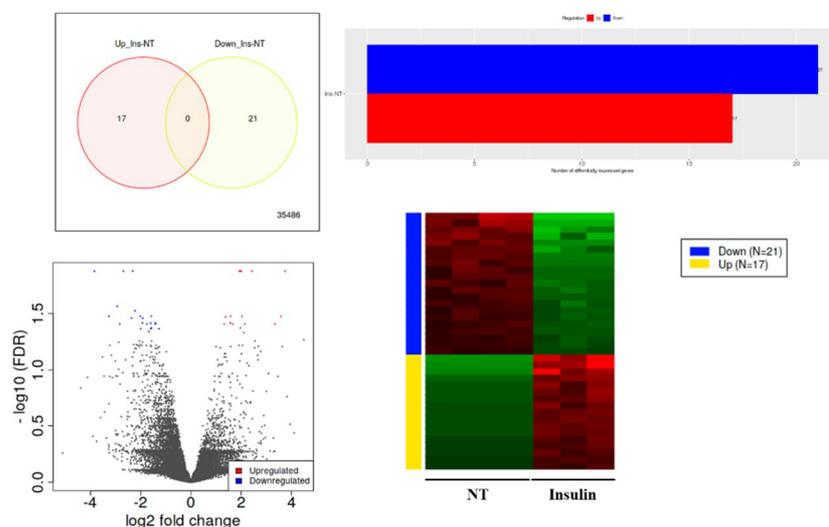


図4

Differentially expressed genes
FDR < 0.05, Min fold change:2



HuR との結合性が最も低下していた X gene の mRNA の安定性を、アクチノマイシン D を投与して転写を停止させ検討しました。X mRNA は 50% 程度低下していることが明らかとなりました (図 5)。

(3) X gene のノックアウトマウスの作製

これまで X gene の機能についての報告はほとんどなく、不明であり、大腸癌の発育進展に関わる新規遺伝子の可能性があります。そこで CRISPER/Cas9 を用いて、X gene の exon 5 と exon 8 を切断したノックアウトを作成しました。小腸のリンパ腫様の腫瘍性病変を生じたホモ欠損マウスがみられ(図 6)、高脂肪食や AOM/DSS 発癌モデルによる検討を継続して行っております。

図 5

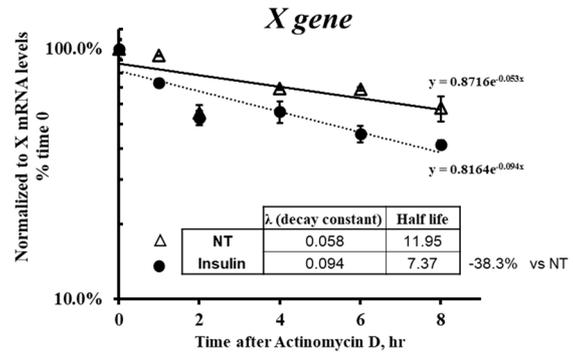
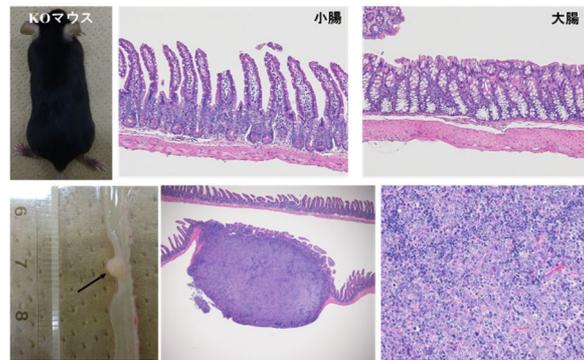


図 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Yu, Abe Yasuhiko, Kon Takashi, Sato Hidenori, Onozato Yusuke, Yagi Makoto, Mizumoto Naoko, Sakai Takayuki, Ito Minami, Umehara Matsuki, Nakamura Shuhei, Tsuchida Hidemoto, Goto Hiroki, Koseki Ayumi, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 162
2. 論文標題 Mo1108: A NOVEL HUR TARGET?THE ABTB1 GENE?IS INVOLVED IN A POTENTIAL MECHANISM OF OBESITY-RELATED COLORECTAL CARCINOGENESIS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 S~701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S0016-5085(22)61641-X	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 Sakai Takayuki, Sasaki Yu, Abe Yasuhiko, Nishise Shoichi, Sato Hidenori, Onozato Yusuke, Kon Takashi, Yagi Makoto, Mizumoto Naoko, Ito Minami, Umehara Matsuki, Nakamura Shuhei, Tsuchida Hidemoto, Goto Hiroki, Koseki Ayumi, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 162
2. 論文標題 Tu1543: CHARACTERISTICS OF THE GUT MICROBIOTA IN VISCERALLY OBESE PATIENTS WITH COLORECTAL ADENOMA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 S~1003-S-1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S0016-5085(22)62381-3	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 -

1. 著者名 Kon Takashi, Sasaki Yu, Abe Yasuhiko, Onozato Yusuke, Yagi Makoto, Mizumoto Naoko, Sakai Takayuki, Umehara Matsuki, Ito Minami, Nakamura Shuhei, Goto Hiroki, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Modulation of AMPK/ TET2/ 5-hmC axis in response to metabolic alterations as a novel pathway for obesity-related colorectal cancer development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29958-2	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 Sasaki Y, Abe Y, Nishise S, Ueno Y	4. 巻 37
2. 論文標題 Reply: Serum pancreatic amylase and colorectal adenoma: From clinical research to practice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 2189~2190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15993	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 -

1. 著者名 Sasaki Yu, Abe Yasuhiko, Nishise Shoichi, Yagi Makoto, Mizumoto Naoko, Kon Takashi, Onozato Yusuke, Sakai Takayuki, Umehara Matsuki, Ito Minami, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Low serum pancreatic amylase levels as a novel latent risk factor for colorectal adenoma in non alcohol drinkers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 660 ~ 668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15748	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 -

1. 著者名 Shoji Masakuni, Sasaki Yu, Abe Yasuhiko, Nishise Shoichi, Yaoita Takao, Yagi Makoto, Mizumoto Naoko, Kon Takashi, Onozato Yusuke, Sakai Takayuki, Umehara Matsuki, Ito Minami, Koseki Ayumi, Murakami Ryoko, Miyano Yuki, Sato Hidenori, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Characteristics of the gut microbiome profile in obese patients with colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 498 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12529	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 佐々木悠, 阿部靖彦, 東海林正邦, 堺貴之, 上野義之	4. 巻 42
2. 論文標題 大腸がんの発生・進展と腸内細菌の関わり	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Progress in Medicine	6. 最初と最後の頁 47 ~ 52
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 Takashi Kon, Yu Sasaki, Yasuhiko Abe, Yusuke Onozato, Makoto Yagi, Naoko Mizumoto, Takayuki Sakai, Matsuki Umehara, Minami Ito, Ayumi Koseki, Yoshiyuki Ueno	4. 巻 160
2. 論文標題 Insulin and glucose altered AMPK-TET2-5hmC axis toward on the obesity-related colorectal cancer development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 S737 ~ S738
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 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 -

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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 佐々木悠
2. 発表標題 腸内細菌を"診る" -肥満と大腸腫瘍の解析から健康長寿への道を探る
3. 学会等名 日本消化器病学会第214回例会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、上野義之
2. 発表標題 新たな大腸腺腫のリスク因子：血清膵アミラーゼ値の低下～大腸腺腫患者における非アルコール性脂肪肝・膵の解析～
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 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 肥満関連大腸がんにおける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 東海林正邦, 佐々木悠, 阿部靖彦, 矢尾板孝夫, 八木周, 水本尚子, 小野里祐介, 今孝志, 堺貴之, 伊藤南, 梅原松樹, 佐藤秀則, 西瀬祥一, 上野義之
2. 発表標題 肥満関連大腸癌における腸内細菌叢の解析
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 梅原松樹, 佐々木悠, 阿部靖彦, 八木周, 水本尚子, 小野里祐介, 今孝志, 堺貴之, 伊藤南, 上野義之
2. 発表標題 若年発症大腸癌 (EOCRC) の臨床的特徴の検討
3. 学会等名 第63回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堺貴之, 佐々木悠, 阿部靖彦, 西瀬祥一, 東海林正邦, 八木周, 水本尚子, 小野里祐介, 今孝志, 梅原松樹, 伊藤南, 上野 義之
2. 発表標題 大腸腺腫患者における腸内細菌叢の解析
3. 学会等名 第63回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Sasaki, Yasuhiko Abe, Shoichi Nishise, Takao Yaoita, Makoto Yagi, Naoko Mizumoto, Masakuni Shoji, Yusuke Onozato, Takashi Kon, Takayuki Sakai, Yoshiyuki Ueno
2. 発表標題 Ectopic fat accumulation in the liver and pancreas in patients with colorectal adenoma
3. 学会等名 American Gastroenterological Association, DDW2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masakuni Shoji, Yu Sasaki, Yasuhiko Abe, Shoichi Nishise, Takao Yaoita, Makoto Yagi, Naoko Mizumoto, Yusuke Onozato, Takashi Kon, Takayuki Sakai, Ayumi Koseki, Hidenori Sato, Yoshiyuki Ueno
2. 発表標題 Changes in the gut microbiota and their effect on pathogenesis in obese patients with colorectal cancer
3. 学会等名 American Gastroenterological Association, DDW2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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 American Gastroenterological Association, DDW2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東海林正邦, 佐々木悠, 上野義之
2. 発表標題 大腸癌患者における腸内細菌叢と肥満・代謝異常との関連性
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木悠, 阿部靖彦, 上野義之
2. 発表標題 早期胃癌の異時性再発を予測する分子マーカーの同定
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
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