

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16994

研究課題名（和文）Osteopontin制御機構を用いた炎症性大腸癌発癌機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of role of osteopontin in colitis-associated cancer by the gene regulation system

研究代表者

我妻 康平（Wagatsuma, Kohei）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10809065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Osteopontin（以下OPN）骨髄キメラマウスを作製することで上皮細胞由来OPNに焦点を当て、上皮細胞由来OPNと大腸炎、腸炎関連大腸癌ならびに腸内細菌叢との関連を検討した。上皮細胞由来OPNが腸内細菌叢の制御と関連していることが示唆された。急性大腸炎誘導モデルでは、上皮細胞由来OPNがknockoutされている群において大腸炎がより高度であった。炎症性大腸癌誘導モデルでは、上皮細胞由来のOPNがknockoutされている群において、腫瘍の数は多いもののサイズは小さかった。以上より、上皮細胞由来OPNが大腸炎や腸炎関連大腸癌、また腸内細菌叢の制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis、以下UC）は、若年者に好発する病因不明の炎症性腸疾患であり、近年本邦においてその患者数は増加の一途をたどっている。UCの原因ははまだ不明であり、現時点で根治治療は存在しない。また、長期罹患のUC患者の増加と共に、腸炎を背景としたdysplasiaや炎症性発癌が臨床上的の問題となっている。我々の研究結果により、上皮細胞由来OPNが大腸炎や炎症性大腸癌ならびに腸内細菌叢の制御に関与することが示唆された。今後ヒトサンプルを用いて潰瘍性大腸炎におけるOPNの役割を更に検討することが、増加し続ける潰瘍性大腸炎患者の治療方針決定につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate that the relationship between epithelial cell-derived OPN and colitis, colitis associated cancer, and gut microbiota by using OPN bone marrow chimeric mice. It was suggested that epithelial cell-derived OPN is associated with the regulation of gut microbiota. In the acute colitis-induced model, colitis was more severe in the group in which epithelial cell-derived OPN was knockout. In the colitis associated cancer model, the group in which epithelial cell-derived OPN was knockout had a large number of tumors but a small size. These data indicate that epithelial cell-derived OPN is involved in the regulation of colitis, colitis associated cancer, and gut microbiota.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：osteopontin 大腸炎 炎症性大腸癌 腸内細菌叢 骨髄キメラマウス

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis、以下 UC)は、若年者に好発する病因不明の炎症性腸疾患であり、近年本邦においてその患者数は増加の一途をたどっている。現在、長期罹患の UC 患者の増加と共に、腸炎を背景とした dysplasia や炎症性発癌が臨床上の問題となっている。腸炎関連大腸癌 (Colitis associated cancer、以下 CAC)は形態が多彩であり背景粘膜に炎症性変化があることから、必ずしも発見が容易ではない<sup>1)</sup>。したがって、CAC の発癌機序の解明は発癌予防や早期発見のため重要な課題である。

近年、osteopontin (以下 OPN)が炎症や各種の癌と関連しているという報告が散見される。OPN の発現は、腸上皮細胞、およびマクロファージ・樹状細胞・T リンパ球などの免疫細胞において観察されるとされている。OPN の欠失が腸内細菌叢とマクロファージの貪食能に影響を与えることによって腸炎発症につながる事が報告されているが<sup>2)</sup>、特に慢性炎症においては OPN が腸炎の悪化に関与しているという報告もある<sup>3)</sup>。また、近年、散発性大腸癌にて前癌病変や粘膜内癌を有する症例に特徴的な腸内細菌が同定され、メタボローム解析により病期に伴う腸内代謝物質の変動も報告されている<sup>4)</sup>。

しかし、現在まで CAC における OPN の発現およびその機能解析については全く検討がなされていない。また、CAC を発症する際の経時的な腸内細菌叢の検討もなされていない。

### 【引用文献】

- 1) Hata K, et al. Surveillance colonoscopy for colitis-associated dysplasia and cancer in ulcerative colitis patients. *Dig Endosc.* 2016; 28:260-265.
- 2) Toyonaga T, et al. Osteopontin Deficiency Accelerates Spontaneous Colitis in Mice with Disrupted Gut Microbiota and Macrophage Phagocytic Activity. *PLoS One.* 2015; 10:e0135552.
- 3) Heilmann K, et al. Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation. *J Cell Mol Med.* 2009;13:1162-1174.
- 4) Yachida S, et al. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nat Med.* 2019 ;5:968-976.

## 2. 研究の目的

我々は現在までの検討結果から、(i)OPN が腸管炎症の急性期と慢性期で役割が異なること、(ii)OPN の役割が細胞により異なること、(iii)腸内細菌や代謝産物の経時的な変化、が CAC の臨床像に大きな影響を及ぼす可能性が高いと推測した。

上皮細胞における OPN の役割が CAC 発癌に重要であると考え、上皮細胞由来 OPN に焦点を当てて CAC と OPN の関連を検討する。また、発癌時の腸内細菌のみではなく経時的な腸内細菌の変化と OPN の関連についても検討する。

## 3. 研究の方法

(1) C57BL/6 WT-type (以下 WT)マウスと OPN-knockout (以下 KO)を用いて、生後 4,8,16 週の便を採取し腸内細菌叢の経時的な変化を比較する。また、生後 16 週における遠位大腸の組織学的所見、炎症性サイトカイン、代謝産物の比較を行う。

(2) WT マウスと OPN KO マウスを用いて骨髄移植を行うことで OPN 骨髄キメラマウスを作製し、各キメラマウスの腸内細菌叢を比較する。

(3) OPN 骨髄キメラマウスに対し、3.0% dextran sulfate sodium (以下 DSS)を 5 日間経口投与し急性大腸炎を誘導する。各骨髄キメラマウスにおいて臨床症状の経過を比較し、7 日目に大腸の組織学的所見、炎症性サイトカインの比較を行う。

(4) OPN 骨髄キメラマウスに対し、Azoxymetane(以下 AOM) 2.5mg/kg を腹腔内投与後、3.0 %DSS の経口投与(1 週間投与、2 週間休薬)を 3 サイクル繰り返すことにより、約 9 週間後に炎症性大腸癌を誘導することができる。各骨髄キメラマウスにおいて、大腸における腫瘍の数、大きさ、粘膜下浸潤癌の数、非隆起性腫瘍の数を比較する。

#### 4. 研究成果

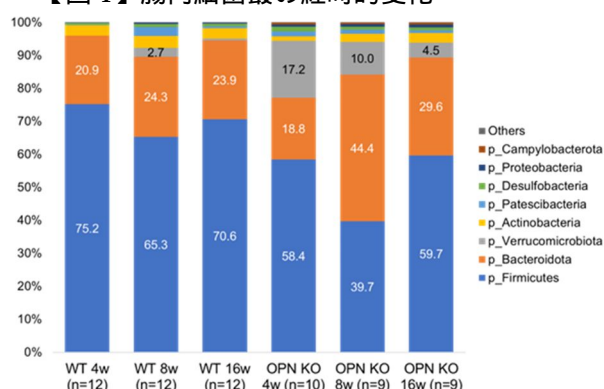
##### **(1) OPN-KO マウスの腸内微生物叢は炎症誘発性環境に対して代償的な変化をしている可能性がある。**

腸内細菌叢を生後 4,8,16 週目で検討したところ、OPN-KO マウスの腸内細菌叢は経時的に変化をしていた (図 1)。OPN-KO マウスは大腸炎の臨床症状を示さないものの、組織学的過形成変化を示した。また、OPN-KO マウスの遠位結腸では、WT マウスと比較して、炎症性サイトカインの遺伝子発現が亢進していた。さらに OPN-KO マウスの結腸組織でのメタボローム解析は、腸管に悪影響を与えることが知られている長鎖脂肪酸の豊富さを示した。これらの結果は、OPN-KO マウスの結腸における潜在的な炎症誘発環境を示唆していた。

一方、OPN-KO マウスの腸内微生物叢は、

多様性の増加など腸管にとって有益な組成であり、炎症誘発性環境に対する代償的な変化を示唆する結果であった。

【図 1】腸内細菌叢の経時的変化



##### **(2) OPN 骨髄キメラマウスにおける検討で、上皮細胞由来 OPN と腸内細菌叢の関連が示唆された。**

OPN-KO マウスと WT マウスを用いて骨髄移植を行うことにより、OPN 骨髄キメラマウスモデルを作製した。WT WT(以下 WW 群)、OPN-KO WT(以下 OW 群)、WT OPN-KO(以下 WO 群)、OPN OPN(以下 OO 群)(donor recipient)の 4 種類の骨髄キメラマウスを作製した。各キメラマウスの便を用いた腸内細菌叢解析では、多様性解析の結果により、WO 群と OO 群の菌種は似ていること、WW 群と OW 群の菌種は似ていることが示唆された。以上から、上皮細胞由来 OPN と腸内細菌叢の関連が示唆された。

##### **(3) 急性大腸炎モデルにおいて、上皮細胞由来 OPN は急性大腸炎に対して保護的に機能していることが示唆された。**

上述の各 OPN 骨髄キメラマウスに 3% DSS を経口投与することにより急性大腸炎を誘発した。WO 群、OO 群の 2 群は、WW 群、OW 群の 2 群と比較して、Disease activity score で示す臨床症状が高度であり、組織学的にも大腸に高度の炎症所見を認めた。また、WO 群、OO 群の 2 群は、WW 群、OW 群の 2 群と比較して、大腸組織での IL-1、IL-6、IL-10 の遺伝子発現が亢進していた。したがって、上皮細胞由来 OPN は急性大腸炎に対して保護的に機能していることが示唆された。

##### **(4) 炎症性大腸癌モデルにおいて、上皮細胞由来 OPN は大腸腫瘍の数やサイズと関連していた。**

上述の各 OPN 骨髄キメラマウスに AOM、DSS を投与して炎症性大腸癌を誘導した。WO 群は WW 群や OW 群と比較して、大腸腫瘍の数は多かったものの、最大腫瘍径が小さかった。しかし、粘膜下浸潤癌の数や、非隆起性腫瘍の数においては、各キメラマウス群に有意な差は認めなかった。ただし、WO 群や OO 群は薬剤投与初期に死亡するマウスが多く、十分な検討ができていない可能性がある。薬剤投与スケジュールの変更などを行い、現在も検討を続けている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kohei Wagatsuma, Hiroshi Nakase	4. 巻 21
2. 論文標題 Contradictory Effects of NLRP3 Inflammasome Regulatory Mechanisms in Colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 8145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life11121375	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 Kohei Wagatsuma, Kotaro Akita, Masayo Motoya, Yasutoshi Kimura, Shintaro Sugita, Takehiro Hirano, Yujiro Kawakami, Yasunao Numata, Keisuke Ishigami, Yoshiharu Masaki, Ayako Murota, Masahiro Shitani, Noriyuki Akutsu, Shigeru Sasaki, Hiroshi Nakase	4. 巻 100
2. 論文標題 Mixed neuroendocrine non-neuroendocrine neoplasm of the gallbladder complicated by a pancreaticobiliary maljunction of a non-dilated biliary duct: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e27336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000027336	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 Kohei Wagatsuma, Yoshihiro Yokoyama, Hiroshi Nakase	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of Biomarkers in the Diagnosis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life (Basel)	6. 最初と最後の頁 1375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life11121375	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takehiro Hirano, Kohei Wagatsuma, Tsukasa Yamakawa, Yoshihiro Yokoyama, Yuki Hayashi, Daisuke Hirayama, Hiroshi Nakase
2. 発表標題 OSTEOPONTIN CONTRIBUTES COLON HOMEOSTASIS BY AFFECTING GUT MICROBIOTA COMPOSITON
3. 学会等名 Digestive Disease Week（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------