

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15477

研究課題名（和文）NSAIDsによるABCC3とROSを介した家族性大腸腺腫症の発癌抑制機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism for suppression of carcinogenesis in familial adenomatous polyposis mediated by ABCC3 and ROS with NSAIDs.

研究代表者

小林 実 (Minoru, Kobayashi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40885547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：FAPの臨床検体、ならびに公開されているデータベースを用いて実験を行った結果、FAPの腺腫においてABCC3の発現が低下していることを明らかにした。次に、ABCC3の発現変化が細胞内のDCA濃度に与える影響を検証した結果、ABCC3の発現変化に伴って蛍光標識したDCAの細胞内濃度が変化することを明らかにした。さらに、DCAによって発癌シグナルであるMAPKシグナルが活性化されること、その活性化はABCC3の発現によって影響を受けることを示した。また、FAPの発癌抑制効果が示唆されているNSAIDsがABCC3の発現を亢進させることを確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、FAPの腺腫においてABCC3の発現が低下することで、細胞内にDCAが蓄積し、それにより発癌シグナルであるMAPKシグナルが活性化することが示唆された。大腸癌の発癌過程におけるこれらの変化は、これまで報告されておらず、新規発癌機構の解明に繋がることが期待される。また、NSAIDsはABCC3の発現を亢進させることで、DCAの細胞内濃度の低下を介して発癌を抑制する働きをする可能性がある。この結果は、NSAIDsのFAPに対する新たな発癌抑制機構の存在を示唆するものであり、今後この機構を詳細に解明することによって新規発癌抑制戦略に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We here explored the role of ABCC3 in the progression of colorectal cancer-in particular, focusing on the regulation of bile acid export. Gene expression analysis of colorectal adenoma isolated from FAP patients revealed that ABCC3 were downregulated as early as at the stage of adenoma formation. Knockdown or overexpression of ABCC3 increased or decreased intracellular concentration of deoxycholic acid, a secondary bile acid, respectively, in colorectal cancer cells. Forced expression of ABCC3 suppressed deoxycholic acid-induced activation of MAPK signaling. Finally, we found that nonsteroidal anti-inflammatory drugs increased ABCC3 expression in colorectal cancer cells, suggesting that ABCC3 could be one of the targets for therapeutic intervention of familial adenomatous polyposis. Our data thus suggest that downregulation of ABCC3 expression contributes to colorectal carcinogenesis through the regulation of intracellular accumulation of bile acids and activity of MAPK signaling.

研究分野：大腸癌、家族性大腸腺腫症

キーワード：ABCC3 MRP3 大腸癌 家族性大腸腺腫症 デオキシコール酸 Wntシグナル MAPKシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) FAP(familial adenomatous polyposis; 家族性大腸腺腫症)は APC 遺伝子に変異を有する常染色体優性遺伝病であり、未治療であれば 60 歳までにほぼ 100%の患者が進行大腸癌を発症する。FAP に対する標準的な治療方針は進行大腸癌の発症前に予防的大腸切除術を行うことであり、多くは 10 代から 20 代の若年期に手術が必要となる。大腸切除後の QOL の低下はその後の生活に多大な影響を与えるため、癌化を抑制し手術を回避するための新規治療法が切望されている。

(2) 申請者はこれまで大腸正常組織と癌組織のトランスクリプトームを調べ、様々な基質を細胞内から排出するポンプとして機能する ABCC3 の遺伝子の発現が大腸癌で低下していること、また、免疫組織化学により大腸癌組織において ABCC3 タンパクの発現も低下していること、さらには Wnt シグナルの活性化によって ABCC3 の発現が抑制されることを明らかにした。FAP 患者の腺腫では APC 遺伝子の変異によって Wnt シグナルが恒常的に活性化しているため、大腸癌と同様に ABCC3 の発現が低下していることが示唆される。そこで、Wnt シグナルによる ABCC3 の発現抑制が FAP の腺腫からの発癌に関わっているのではないかと着想し、それを解明することが FAP 患者の発癌抑制に繋がる可能性があると考えた。

(3) 大腸において ABCC3 は主に上皮細胞の基底膜側に存在し、細胞内の様々な基質を細胞外に排出する働きを持つとされている。ABCC3 の発現低下は、基質の細胞内濃度の上昇に繋がり、生体に対して何らかの影響を与えたと考えられる。また、ABCC3 は主に肝臓において胆汁酸を基質として排出する胆汁酸トランスポーターとしての働きを持つことが過去の研究で示されているため、ABCC3 の発現低下は細胞内の胆汁酸濃度の上昇に繋がる可能性がある。さらに、二次胆汁酸である DCA(deoxycholic acid; デオキシコール酸)は、MAPK シグナルなどの各種発癌シグナルを活性化することによって発癌を促進することが過去に報告されている。もし、ABCC3 が大腸において DCA を基質としているのであれば、ABCC3 の発現低下が DCA の細胞内蓄積を介して発癌を促進させる可能性がある。この未知の発癌機構の存在を証明できれば、FAP 患者の腺腫からの癌化を予防し得る新規治療法に繋がることを期待される。

(4) また、NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs; 非ステロイド系抗炎症薬) は Wnt シグナル経路の抑制効果などにより FAP の癌化を抑制することが期待されてきた。しかし、これまで NSAIDs を用いた数多くの基礎研究・臨床研究が行われてきたが、副作用など種々の理由で未だ臨床応用には至っていない。この課題を克服するためにも、上述の様な FAP における未知の発癌機構を解明することが一つの鍵になると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は ABCC3 の胆汁酸トランスポーターとしての機能に着目し、上記仮説に基づき、FAP の腺腫における ABCC3 の発現低下を確認したうえで、ABCC3 の発現変化が DCA の細胞内濃度に与える影響を解明し、DCA によって大腸癌の発癌シグナル経路が活性化することを明らかにすることを目的とする。

(2) NSAIDs が上記で解明されたメカニズムに与える影響を検証することを副次的な目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 5 例の FAP 患者の手術標本から、腺腫組織とその対照となる正常組織の 2 種類の検体を採取し、そこから抽出した RNA より ABCC3 の発現を RT-qPCR にて確認した。また、大腸癌を合併していた 3 例の FAP 患者について、正常組織、腺腫組織、癌組織における免疫組織化学をそれぞれ行い、発癌過程における ABCC3 の発現変化を確認した。

(2) レンチウイルスベクターを用いて、大腸癌細胞株である HT-29 と SW620 における ABCC3 のノックダウン細胞株および過剰発現細胞株を作製した。これらの細胞株に ABCC3 の既知の蛍光基質である CDFDA(5 [and 6] -carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate)を添加して、ノックダウンならびに過剰発現によって ABCC3 のトランスポート機能が変化していることを検証した。また DCA を蛍光基である NBD(nitrobenzoxadiazole)で標識した DCA-NBD(DCA-[NBD]-lysine methyl ester)を用いて、上記細胞株において ABCC3 の発現が細胞内 DCA 濃度に与える影響を検証した。

(3) HT-29 と SW620 に DCA を添加することで、発癌シグナルである MAPK シグナルが活性化するかどうかを Western blotting によって検証した。さらに、ABCC3 ノックダウン細胞株および過剰発現細胞株を用いて、ABCC3 の発現変化が DCA による MAPK シグナルの活性化に与える影響を検証した。

(4) NSAIDs である aspirin、celecoxib、sulindac sulfide を HT-29 と SW620 に添加し、添加後に ABCC3 の発現が変化するかどうか RT-qPCR で検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 最初に、過去に大腸癌で確認された Wnt シグナルによる ABCC3 の発現抑制が、FAP の腺腫において起こっていることを確かめる実験を行った。その結果、いずれの症例においても腺腫での ABCC3 の発現低下が認められた(図 1)。また、公開されている RNA-seq のデータベースを用いて、FAP モデルマウス由来のオルガノイドにおける Abcc3 の発現を解析した結果、FAP 患者の結果と一致して、正常粘膜と比較して腺腫において有意な Abcc3 の発現低下を認めた。さらに、当院で手術を施行した大腸癌を合併した 3 例の FAP 患者の大腸正常粘膜、腺腫、癌について免疫組織化学を行ったところ、正常粘膜に比べて腺腫で Wnt シグナルの活性化を示す  $\beta$ -カテニンの発現が亢進し、対照的に ABCC3 の発現が低下していた。また、同一患者の癌組織でも同様の発現変化を示した。さらに、TCGA に登録されている結腸癌・直腸癌の RNA-seq のデータを解析した結果、結腸癌で正常粘膜に比べて ABCC3 の有意な発現低下がみられた。これらの結果から、Wnt シグナルによる ABCC3 の発現抑制が、前癌病変である FAP の腺腫の段階で既に生じており、その発現変化は大腸癌に至る発癌過程において維持されることが示された。

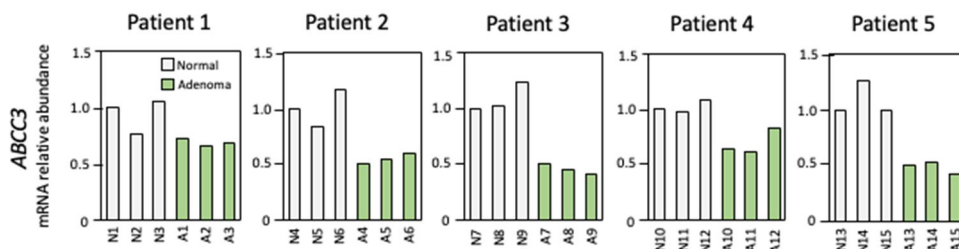


図1 FAPの大腸腺腫におけるABCC3の発現変化

(2) ABCC3 の既知の蛍光基質である CDFDA を HT-29 の ABCC3 ノックダウン細胞株に投与した結果、コントロール群と比較して、ABCC3 をノックダウンした 2 種類の細胞株において CDFDA の蛍光強度の増強を認めた。このことから、ABCC3 のノックダウンによってトランスポーターとしての機能も低下していることが確認できた。次に、これらのノックダウン細胞株を用いて、ABCC3 の発現低下が細胞内の DCA 蓄積に繋がるかどうかを確かめる実験を行った結果、コントロール群と比較して、2 種類の ABCC3 ノックダウン細胞株において DCA-NBD の蛍光が増強することが観察された。以上の実験結果より、ABCC3 の発現低下に伴って DCA-NBD の細胞内濃度が上昇することを確認した(図 2)。

CDFDA を HT-29 ならびに SW620 の ABCC3 過剰発現細胞株に投与した結果、コントロール群と比較して CDF の蛍光強度が低下しており、ABCC3 の発現が上昇するとトランスポーター機能も上昇することを確認した。これらの過剰発現細胞株を用いて、ABCC3 の発現上昇が DCA の細胞外への排出に影響を与えるかどうかを確かめる実験を行った。DCA-NBD を上述の 2 種類の ABCC3 過剰発現細胞株に投与した結果、コントロール群と比較して、DCA-NBD の蛍光が減弱することが観察された。以上の実験結果から、ABCC3 の発現上昇に伴って DCA-NBD の細胞内濃度が低下することを確認した。ここまでの結果から、ABCC3 の発現によって DCA の細胞内濃度が変化すると考えられた。

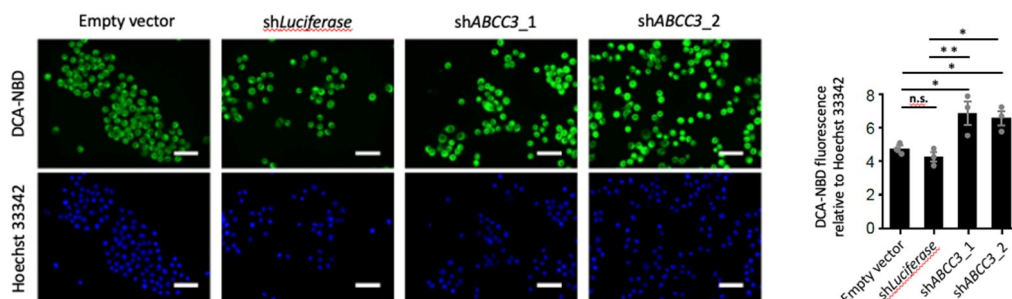


図2 ABCC3の発現変化によるDCA濃度の変化

(3) 次に、ABCC3 の発現変化が DCA による MAPK シグナルの活性化に影響を与えるかどうかについて検証する実験を行った。上述の 2 種類の ABCC3 過剰発現細胞株とそれぞれの陰性コントロールとなる細胞株に DCA を投与した結果、DCA の投与によって MAPK シグナル活性化の指標となるリン酸化 ERK の発現が亢進することが Western blotting において確認できた。また、ABCC3 を過剰発現することによって、DCA によるリン酸化 ERK の発現亢進が緩やかではあるが有意差を持って抑制されることが示された(図 3)。前述の DCA-NBD の実験結果を踏まえると、ABCC3 の発現上昇によって DCA の細胞内濃度が低下することで、DCA による MAPK シグナルの活性化が抑制された可能性が示唆された。

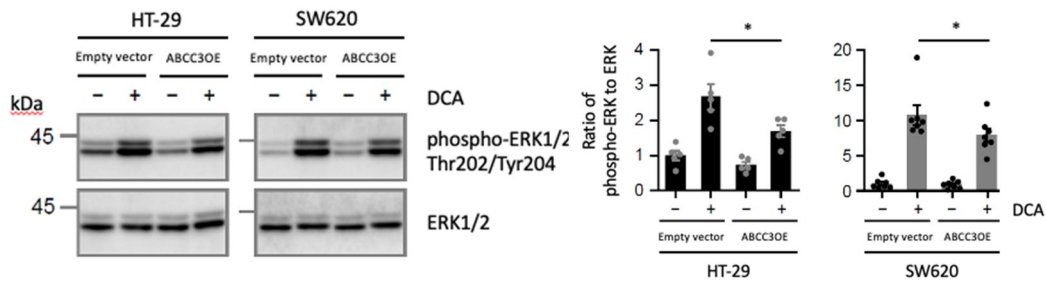


図3 DCAによるMAPKシグナルの活性化

(4) これまで多くの研究によって FAP に対する腫瘍抑制効果が示唆されている NSAIDs が胆汁酸トランスポーターの発現に与える影響を検討した。HT-29 と SW620 に 3 種類の NSAIDs (aspirin, celecoxib, sulindac sulfide) を投与し、ABCC3 の発現量を RT-qPCR で解析した。その結果、NSAIDs の濃度依存的に ABCC3 の発現量が増加する傾向を認めた。この結果から、NSAIDs は大腸において ABCC3 の発現を促進する作用が示唆された。

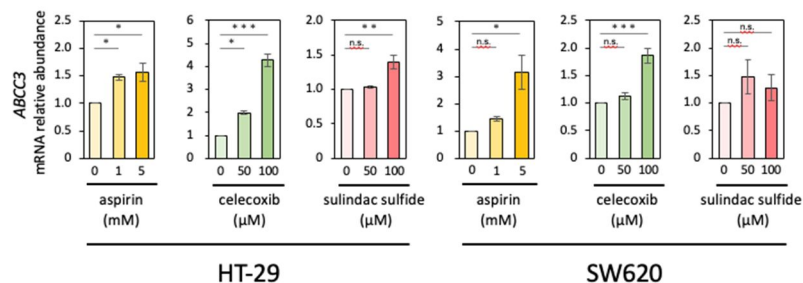


図4 NSAIDsによるABCC3の発現変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sato Yukihiro, Kobayashi Minoru, Ohira Masahiro, Funayama Ryo, Maekawa Masamitsu, Karasawa Hideaki, Kashiwagi Ryosuke, Aoyama Yayoi, Mano Nariyasu, Ohnuma Shinobu, Unno Michiaki, Nakayama Keiko	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Downregulation of <sc>ABCC3</sc> activates <sc>MAPK</sc> signaling through accumulation of deoxycholic acid in colorectal cancer cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.16132	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 0件）

1. 発表者名 Sato Yukihiro, Kobayashi Minoru, Ohira Masahiro, Funayama Ryo, Maekawa Masamitsu, Karasawa Hideaki, Ohnuma Shinobu, Unno Michiaki, Nakayama Keiko
2. 発表標題 ABCC3 (MRP3)-mediated export of deoxycholic acid regulates MAPK signaling in colorectal adenoma and adenocarcinoma
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2024
4. 発表年 2024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
研究協力者	山村 明寛 (Yamamura Akihiro)  (30814678)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	
研究協力者	中山 啓子 (Nakayama Keiko)  (60294972)	東北大学・医学系研究科・教授  (11301)	

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