

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82402
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22501001
 研究課題名（和文） Ah レセプターを介するベータカテニン分解および炎症の抑制による大腸癌抑制作用
 研究課題名（英文） Suppression of colon tumorigenesis by Ah receptor
 研究代表者 生田統悟
 （IKUTA TOGO）
 埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・研究員
 研究者番号：00262072

研究成果の概要（和文）：

Ah レセプター(AhR)欠損マウスに自然発生した盲腸がんから、AhR の大腸がん抑制作用が示唆された。この AhR の役割を検討するため、炎症性サイトカインについて調べた。AhRKO に産生される IL-1β および IL-6 は、発がんが遅延した AhR^{-/-}・ASC^{-/-}より有意に高かった。マウス腸上皮細胞の初代培養系でマクロファージと共培養をおこない、産生されるサイトカインを解析した。

研究成果の概要（英文）：

Tumor suppressor function of Ah receptor (AhR) was shown by spontaneously developed cecal tumor in AhR-deficient mice. In order to investigate the role of AhR, we studied the production of inflammatory cytokines. Concentration of IL-1β and IL-6 produced in AhR^{-/-} mice was significantly higher than AhR^{-/-}・ASC^{-/-} double mutated mice which showed reduced cecal carcinogenesis. We developed co-culture system constituted with colonic epithelial cells and macrophages and examined production of cytokines into the culture medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：炎症、大腸癌、Ah レセプター

1. 研究開始当初の背景

AhR はダイオキシンやベンツピレンなどの化学物質と結合するリガンド依存性の転写因子であるとともに、E3 ユビキチンリガーゼの構成因子として機能し、リガンド依存的な蛋

白質分解にも関わっている。我々は AhR の生物機能を解明する目的で AhR ノックアウトマウス (AhRKO) を解析し、このマウスが生後 8-10 週という比較的早い時期に、全ての個体で主として盲腸にがんを自然発生させる事

を見出した。このことを端緒に、AhR の生物機能と、その破綻による発がんのしくみを明らかにしたい。

腸上皮細胞は幹細胞システムにより構築される組織であり、 β -catenin が関わる Wnt シグナル経路が幹細胞制御に重要な働きをする。AhR はリガンド依存的に β -catenin を分解する作用がある事が見出され、AhRKO にみられる発がんは、この作用が喪失された結果、増殖シグナルが異常に活性化されることが原因の一つである事が示唆された。実際に、活性型 β -catenin を高発現させた肝幹細胞は、マウスに移植すると造腫瘍性をもつことが報告されており、幹細胞における β -catenin 安定性と造腫瘍性との因果関係が示されている。正常な組織を維持するためには幹細胞の増殖の ON-OFF は厳密に管理されている必要があり、AhR は β -catenin 分解をとおして、ここに関与している可能性がある。一方、炎症性腸疾患や大腸癌の病態には、腸内細菌が影響する。無菌的に飼育された AhR KO にがんは出来なかったことから、 β -catenin 蓄積だけでなく、腸内細菌に対する生体の防御反応が盲腸がん発生に関わっていると考えられた。病原性微生物等に対する生体の防御機構は、自然免疫という特徴的な微生物認識機構として近年解明が著しく進んだ分野である。代表的な炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) は、LPS 刺激下において AhR KO では正常マウスより発現が上昇しており、AhR による発現抑制機構が示唆される。

さらに我々は、AhRKO の発がんにおける炎症性サイトカインの影響を調べるため、IL-1 β 産生が低下している ASCKO を用いて、AhR/ASC 二重ノックアウトマウス(DKO)を作製した。このマウスは AhR 単独のノックアウトマウスと同様に腸上皮に β -catenin を蓄積するが、腫瘍形成の時期が遅れがみられた。このことは、腫瘍形成には β -catenin 蓄積に加え、高レベルの炎症性サイトカインに暴露される事が重要である事を示唆している。本研究は、盲腸の場において AhR が免疫応答のみならず上皮細胞の増殖にどのように関わるのかを明らかにし、発癌に至る経路を解明したい。

2. 研究の目的

腸上皮細胞ならびに免疫担当細胞のそれぞれにおいて AhR の作用点を明らかにし、その大腸がん抑制メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) サイトカインの測定

マウス血液中の、または腸組織に含まれるサイトカインは、ELISA キットを用いて測

定した。組織は細切したのち、培地中で一晚インキュベートし、その培養上清を検体とした。

2) immunoblot

細胞を SDS を含む緩衝液で回収し、溶解した。これを 8% アクリルアミドゲルに電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。抗 AhR 抗体(Abcam, ab2770)、抗 actin 抗体 (SIGMA A2066)で一晩反応させ、それぞれの蛋白質を検出した。

3) RT-PCR

組織または培養細胞を ISOGEN (ニッポンジーン) で溶解し、抽出した RNA を RNA PCR kit (Takara) をもちいて cDNA を合成した。これを鋳型として PCR をおこない、発現する遺伝子を解析した。

4) 初代培養

生後およそ 1 週間のマウスの大腸を採取し、実体顕微鏡下で縦方向に開き、PBS 中で内容を洗った後、コラゲナーゼを含む培地中で震盪した。メッシュを通して組織塊を除き、得られた細胞を 10% Matrigel を含む collagen gel (新田ゼラチン) に懸濁し、Millicell (Millipore) にまいた。この周囲に EGF, R-spondin-1, Noggin を含む培地を入れ、37°C で培養した。

5) in situ hybridization

マウス AhR cDNA の中央部 0.5kb をプローブとし、ジゴキシゲン標識した。固定された組織をプローブとインキュベートし、アルカリフォスファターゼ標識された抗ジゴキシゲン抗体を NBT/BCIP 発色基質で検出した。

6) luciferase assay

ヒトゲノム DNA を鋳型として、c-kit 遺伝子の転写調節領域を PCR で増幅し、luciferase の発現ベクターである pGL3 basic (Promega) に連結させた。これを COS 細胞または HeLa 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

4. 研究成果

1) 炎症性サイトカインの発現に与える AhR の作用

DKO マウスの発がん遅延の原因を検討するため、炎症性サイトカインの産生を AhRKO マウスと比較した。LPS 腹腔投与後の血中 IL-1 β および IL-6 濃度は、AhRKO マウスでは野性型より有意に高く、また DKO マウスでは AhRKO マウスより低かった (図 1)。これは、盲腸組織の培養上清でも同様の結果であった。さらに、LPS 投与後の生存率を異なる遺伝子型間で比較した。AhRKO マウスの生存時間は野性型マウスよりも有意に短かく、DKO マウスでは影響は軽減された。これらより、AhRKO マウスでは LPS 刺激による炎症が野性型よりも強く、一方で DKO マウスでは軽減されていることが示された。

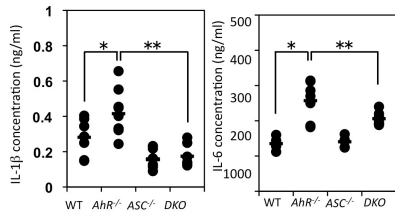


図1 血中サイトカイン濃度の比較

慢性的な炎症は、がんを促進することが知られている。マウスにデキストラン硫酸ナトリウムを飲水投与することにより、大腸炎を誘発させることができる。AhR 欠損マウスでは DSS 感受性が高いことが報告されており、遺伝子型間で、また組織別に炎症レベルを比較した。2% DSS を投与すると、野生型では体重の変化がみられなかったが、AhRKO また DKO では有意に減少した (図 2)。組織別で比較すると、形態的にも、また IL-1 β 産生量においても、盲腸に最も影響がみられた (図 3)。これは、AhRKO マウスに生じるがんが盲腸であることと一致している。

上記のような DSS による組織のダメージから、AhR の生体防御の効果が考えられる。このとき、AhR がどの細胞で機能することが重要なのだろうか。AhR の conditional knockout マウスに DSS 投与することで、この問題について検討した。マクロファージ特異的 (LysM-cre), T 細胞特異的 (Lck-cre), 腸上皮特異的 (villin-cre) なノックアウトマウスを用いて、体重変化を調べた。いずれの場合でも対照群の AhR-flox マウスと体重に差はなく、AhR^{-/-}マウスのような体重減少は観察されなかった。この方法では AhR 発現細胞について解析することはできなかった。

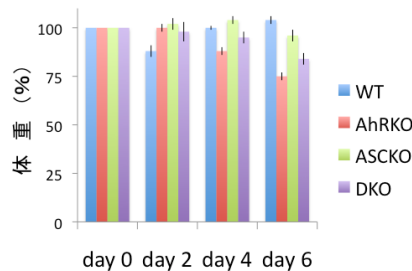


図2 DSS 投与による体重変化の比較

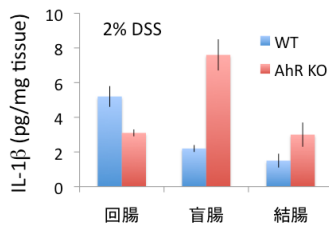


図3 組織別 IL-1 β 産生

2) 腸上皮細胞における AhR の作用

AhR 発現細胞について検討するため、野生型マウスの腸組織をもちいて、in situ hybridization をおこなった。主な発現部位は間質であるが、クリプト底部の上皮細胞にも弱いシグナルが検出された。AhRKO マウスの組織は染色されず、シグナルの特異性が示された。

ヒト大腸がん細胞株を用いて、AhR の発現を検討した。HT29 や LoVo で発現は比較的高く、SW480 や Caco-2 では低かった。RNA レベルで高い細胞では蛋白量も多かった。AhR の蛋白分解が細胞内の蛋白量に与える影響について調べた。5-10 μ M MG-132 を培地中に 8 時間処理した後の AhR 蛋白量は対照の DMSO 処理と変化がなかった。細胞内 AhR 量は、蛋白分解よりはむしろ mRNA レベルで調節されている可能性がある。

AhR の大腸がん抑制作用をヒトで検討するため、ヒト大腸がん手術材料を用いて AhR 発現を検討した。がん部と非がん部のそれぞれから蛋白質を抽出し、免疫ブロットにより AhR 発現量を検討した結果、がん部の発現量は非がん部の 2-3 倍を示す例が多く見られた。がん抑制効果を考えると、これは予想と反対の結果であった。腫瘍組織での AhR 蛋白の分布を免疫染色により検討すると、間質の細胞とがん細胞に検出された。がん細胞における AhR 発現の意義を検討した。c-kit は、マウスリンパ球で AhR により転写調節されることが報告されており、またマウスの腸ではクリプト下部の上皮細胞に発現すること、がんの悪性化と関連することが示唆されている。ヒト大腸がん細胞株を AhR リガンドであるメチルコラントレン処理すると、c-kit mRNA レベルの増加がみられた。また、ヒト c-kit 遺伝子の転写調節領域を PCR で増幅し、レポーターアッセイを行うと、AhR の co-transfection や AhR リガンド処理に応答したレポーター活性が検出された (図 4)。これらのことから、ヒト大腸がん細胞において AhR が c-kit の転写を調節する働きが示唆される。

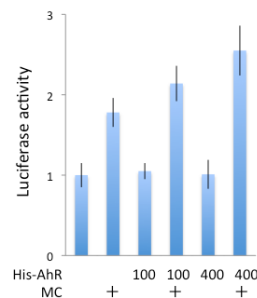


図4 c-kit-Luciferase 活性の調節

3) 大腸がん発生における免疫細胞と腸上皮細胞の相互作用

腫瘍組織には上皮性のがん細胞だけでなく、間質に存在する炎症性細胞などの多様な種類の細胞があり、異種細胞間相互作用をとおしてがん細胞の発生や悪性化が促されることが知られている。AhRKO マウスの盲腸がんの発生において異種細胞間のやりとりを検討するため、腸上皮細胞とマクロファージの co-culture する系を作製した。

① マウス腸上皮細胞の初代培養

既に報告されている方法を参考に、組織から解離された細胞の三次元培養をおこなった。培養を開始して2日目には球状の細胞塊(organoid)が見られ、次第に大きくなって2週間後には内部にクリプト様の構造をもつものが現れた。凍結切片を作製し内部構造をみると、腸管を輪切りにしたような構造があり、内腔を囲むようにクリプト様に配列された上皮細胞が確認された(図5)。

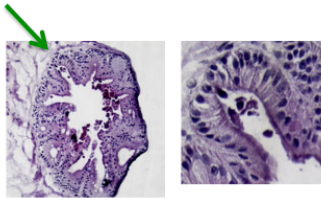


図5 再構築された腸の上皮構造

また、organoidの周縁部には組織修復等にみられる crypt fission が観察され、上皮細胞の盛んな増殖が示唆された(図6)。また、organoidは培地交換により、2ヶ月間は維持された。

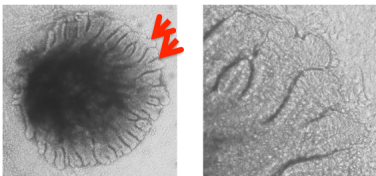


図6 crypt fission

免疫染色により内部構造を検討した。固定された organoid を E-cadherin と増殖マーカーである Ki67 抗体でインキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Ki67 のシグナルはクリプト様の突出した構造に限局して検出された(図7)。

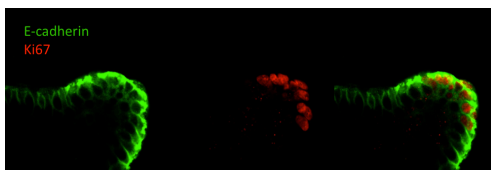


図7 organoidの免疫染色(1)

さらに、organoidの凍結切片を cytokeratin 20 (CK20) と Ki67 抗体を用いて免疫染色した。この場合でも Ki67 はクリプトの底部に相当する構造に検出された。また、CK20 と Ki67 は明確に染め分けられた(図8)。

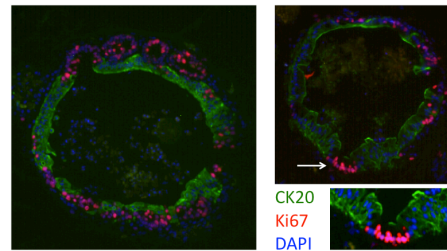


図8 organoidの免疫染色(2)

これらより、この培養方法によって、腸上皮細胞は活発に増殖し、また生体内にみられる組織構造が再構築されることが示された。

② 腸上皮細胞とマクロファージ共培養による異種細胞間相互作用の検討

野性型または AhRKO マウスの腸上皮細胞と、腹腔マクロファージ(Mφ)を組み合わせ、培地中に分泌されるサイトカインをメンブレンアレイを用いて比較した。組み合わせ方は、1) WT 上皮+WT Mφ、2) WT 上皮+AhRKO Mφ、3) AhRKO 上皮+WT Mφ、4) AhRKO 上皮+AhRKO Mφ の4とおこなった。培養器に monolayer としてマクロファージを接着させ、ミリセルの膜をはさんで上側に上皮を3次元培養した。5日に一度培地を交換し、25日培養したところで培地を回収して抗体アレイにかけた。CXCL1, CXCL5, IL-6, GCSFなどが検出されたが、組み合わせ方で差は認められなかった。培養日数等の条件に検討の余地はあると考える。マクロファージだけでなく、他の免疫細胞を用いることや、腫瘍由来の細胞を用いることにより間質とがん細胞の相互作用を解析し得る実験系であると考えられる。

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4件)

Ikuta, T., et al., ASC-associated inflammation promotes cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Carcinogenesis* in press

Sugawara W, Arai Y, Kasai F, Fujiwara Y, Haruta M, Hosaka R, Nishida K, Kurosumi M, Kobayashi Y, Akagi K, Kaneko Y., Association of germline or somatic TP53 missense mutation with oncogene amplification in tumors developed in

patients with Li-Fraumeni or
Li-Fraumeni-like syndrome. Genes
Chromosomes Cancer, 50(7):535-545, 2011

Sakuma K, Kurosumi M, Oba H, Kobayashi Y,
Takei H, Inoue K, Tabei T, Oyama T.
Pathological tumor response to neoadjuvant
chemotherapy using anthracycline and
taxanes in patients with triple-negative
breast cancer. Exp Ther Med, 2(2):257-264,
2011

Ikuta, T., et al., B lymphocyte-induced
maturation protein 1 is a novel target gene
of aryl hydrocarbon receptor. J Dermatol
Sci, 58, 211-216, 2010

[学会発表] (計 1 件)

生田 統悟、ASC-associated inflammation
promotes cecal tumorigenesis in aryl
hydrocarbon receptor-deficient mice、
チトクロム P450 発見 50 周年記念シンポジウ
ム、2012 年 12 月 3 日、九州大学コラボステ
ーション

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 統悟 (Ikuta Togo)
埼玉がんセンター・臨床腫瘍研究所・主任
研究員、研究者番号：00262072

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川尻 要 (Kawajiri Kaname)
埼玉がんセンター・臨床腫瘍研究所・研究
員・研究者番号：50142112
小林 康人 (Kobayashi Yasuhito)
埼玉県立循環器病センター・研究者番
号:80425652
小池 学 (Koike Manabu)
放射線医学総合研究所・研究員・研究者番
号：70280740