

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790802

研究課題名(和文) ARBはcolitic cancerを予防するか? - IBDへの臨床応用を目指して

研究課題名(英文) Angiotensin II type1 receptor blocker(ARB) Inhibits colon cancer cell proliferation

研究代表者

水島 隆史 (Mizushima, Takashi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60433223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：上皮増殖因子(EGF) familyに属する、HB-EGFを介する細胞増殖シグナルは、EGF受容体リン酸化を介する系とEGF前駆体のC末端核移行を介する細胞増殖シグナルがあることを報告してきた。今回、血圧降下剤であるテルミサルタンが、HB-EGF-C末端核移行シグナルを抑制する作用があることを見出した。テルミサルタンの細胞増殖抑制効果をin vitroにて大腸癌細胞株を使用して確認した。In vivoでは細胞増殖抑制傾向がみられた。テルミサルタンやその誘導体でHB-EGF-C末端核移行シグナルを抑制することは、新たな大腸癌治療戦略になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is known that a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) cleaves pro-heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (proHB-EGF), and the soluble HB-EGF activates EGFR. Simultaneously, the C-terminal fragment of proHB-EGF (HB-EGF-CTF) translocates into the inner nuclear membrane, and subsequently influences cell proliferation by binding nuclear promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, a transcriptional repressor, which induces its nuclear export. We found that colon cancer cell proliferation is regulated via the nuclear translocation of HB-EGF C-terminal fragments. And we also found that telmisartan and its derivatives with biphenyl tetrazole completely blocked this association. We propose that the inhibition of HB-EGF-CTF nuclear translocation with telmisartan and its derivatives may lead to novel strategies that prevent cell proliferation in the development of colon cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：IBD colitic cancer AT1R ARB telmisartan

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎とクローン病）は遺伝学的素因や環境因子が関与する原因不明の多因子疾患である。わが国においても近年罹患数が増加し、また長期経過例における大腸癌発生（慢性炎症を背景に発生する大腸癌：colitic cancer）が重大な問題となっている。このような背景のもと、申請者は1型アンジオテンシンII受容体（AT1R）を制御することで大腸炎が抑制されることをマウスの腸炎モデルで明らかにした。また、同時にAT1RがMAdCAM-1蛋白（炎症性腸疾患において、炎症腸管間質へのリンパ球浸潤、炎症の進展に重要な役割を果たしている接着分子）発現に関与しており、その本態が転写因子NF- κ Bの核内移行の制御であることを血管内皮細胞を用いた実験で明らかにした（Mizushima et al. Am J Physiol, Gastrointest Liver Physiol, 2010）。

AT1Rが炎症性腸疾患の発症・進展に重要な役割を担うことは過去の報告からも明らかであるが、その基礎研究にはまだいくつか未解明の部分が残されており、AT1R制御による大腸炎の抑制とcolitic cancer発生との関係に関する報告はない。本研究計画は、AT1Rの制御による大腸炎の抑制およびcolitic cancer発生の予防といった治療薬として臨床応用に展開していくための基盤研究を行う。計画をすすめていくうえで、申請者は潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜で、活動期には実際にAT1Rの発現が亢進していること、大腸癌細胞でもARB投与によるAT1Rの制御によってNF- κ Bの核内移行が抑制されること、細胞増殖が抑制されることを確認している。

2. 研究の目的

消化管粘膜恒常性は、細胞増殖や遊走能による消化管粘膜修復機序にて維持され、サイトカインや増殖因子により制御されている。インターロイキン(IL)-8は、好中球遊走を促進させて腸管炎症の増悪に関与している。その一方で粘膜防御因子である、上皮増殖因子(EGF)を介して増殖因子として作用する。潰瘍性大腸炎等(UC)からの発癌が知られているが、そのメカニズムは不明である。UCの腸管上皮に恒常的にみられる炎症性サイトカイン(IL-8)は、腸管上皮細胞に対する増殖効果を認め、UC関連大腸癌進展に重要な役割を演じていると考えられている。

IL-8 (GPCR アゴニスト)はG蛋白結合性受容体(G-protein coupled receptor: GPCR)結合後、 α disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10を活性化する。ADAMは細胞膜上の上皮増殖因子受容体(EGFR)リガンド前駆体からN末端の細胞外ドメイン(HB-EGF、Amphiregulin、TGF- α など)を切り出し、その後細胞外ドメインは

EGFRに結合する。EGFRはリン酸化され、細胞増殖シグナルが活性化される経路が存在する。同時に、EGFRリガンド前駆体C末端細胞内ドメイン(HB-EGF-CTFなど)が核移行する。HB-EGF-CTFは、DNAに結合している転写抑制因子 promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF)と結合しDNAとの結合を解除させ、核外にくみ出すことにより、cyclin Aやc-Mycなど細胞周期回転亢進や増殖関連分子を強力に誘導し細胞増殖促進に働く機序も存在する。IL-8によるEGFRリン酸化シグナルとHB-EGF-CTF核移行シグナルの両者が細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。また、マウス皮膚潰瘍モデルにおいて前記の両シグナルを阻害するADAM阻害剤を投与すると、潰瘍治癒が遅延する。このことからHB-EGFC末端核移行シグナルが、細胞増殖、遊走能に重要な役割を果たしていると考えられる。

の機序抑制による薬剤は臨床応用されているが、治療効果は限定的である。今回申請者はHB-EGF-CTF核移行の抑制薬を探索し、AT1Rの一つであるテルミサルタンに核移行抑制効果があることを見出した。In vitroにおいて、HB-EGF-CTF核移行シグナルが大腸癌細胞増殖に果たす役割の重要性に試験管内につき検討し、in vivoでもテルミサルタンのcolitic cancer発生の予防効果について検討した。

AT1Rが炎症を基盤としたcolitic cancer発生の予防につながるかをin vivoとin vitroで検討し、その免疫学的・分子生物学的メカニズムを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

FLAGで標識したfull length PLZFを強発現したHT1080細胞株を樹立し、PLZFと各種EGFRリガンド(HB-EGF, TGF- α , Amphiregulin, Epiregulin)のC末端(CTF)の結合を免疫沈降にて確認した。さらにHB-EGF-CTFとの結合部位を特定するために、PLZFのvariant mutationを作成し、結合部位をGST-pull down assayにて確認した。さらに、PLZFと各種EGFRリガンドCTF結合阻害薬をスクリーニングするために、今回Alpha Screen Assay Systemを新規開発した。biotin化HB-EGF-CTFをDonor beadsに、PLZFの結合部ペプチドをAcceptor beadsにそれぞれ固定した。680nmの光で励起したとき、2つが蛋白の結合距離(200Å)に近づいていれば、Donor beadsストレプトアビジンが、活性化 $^{10}O_2$ を産生し、Acceptor beadsを発光させるというシステムである。Alpha Screen Assayにより9000を超えるライブラリーより候補薬剤を探索した。

次に、大腸癌上皮細胞(HT29・HCT116)を使用して、IL-8(20ng/mL)刺激時細胞増殖

効果および候補薬剤の抑制効果を検討した。細胞増殖は、10cm 培養皿に細胞数が 500 個程度になるように播いて、10%FBS 培養液で 24 時間培養後、5%FBS 培養液(control)に IL-8、スクリーニングした chemical compound(30 μ M)を加え colony 細胞数を日毎に数え、細胞増殖カーブにて検討した。HB-EGF-CTF および PLZF の細胞内局在の変化を蛍光免疫染色にて確認した。HB-EGF-CTF と PLZF の結合を免疫沈降にて確認した。EGFR リン酸化は、抗 EGFR 抗体にて免疫沈降後、抗リン酸化抗体にてプロットし検出した。また、Short interfering RNA にて Angiotensin II type1 receptor(AT1R)ノックダウンを施行し、細胞増殖を評価した。

また、in vivo 研究では、AT1R を阻害するために AT1R 受容体阻害剤であるテルミサルタンを自由飲水によりマウスに摂取させることにより腫瘍発生抑制効果を in vivo にて検討した。9w 齢の雄の C57BL/6J を使用した。AOM(10mg/kg, i.p)を day0 に投与して 2%DSS を 2 週目に自由飲水にて投与した。その後 4 週目からテルミサルタンや DMSO などの投与を行った。17 週目にマウスを安楽死して腫瘍発生抑制効果を判定した。

- ・ A AOM(10mg/kg, i.p)+2%DSS 投与群
- ・ B AOM(10mg/kg, i.p)+2%DSS+5 mg/kg/day テルミサルタン投与群
- ・ C AOM(10mg/kg, i.p)+2%DSS+5 mg/kg/day DMSO 投与群
- ・ D 5 mg/kg/day テルミサルタンのみ投与群

評価は、マウスの体重変化、腸管長にて腸管炎症の評価と腫瘍発生個数と平均腫瘍径を 17w 後に評価した。

4. 研究成果

FLAG-PLZF を強発現した HT1080 細胞株において、Full length の PLZF と各種 EGFR リガンド CTF との結合を確認できた。PLZF の valiant mutation での GST-pull down assay にて、PLZF zing finger(ZnF)ドメイン 5-8 セグメントが特に結合に必要な部位であることが判明した。

ZnF5-8 を acceptor beads に HB-EGF-CTF を donor beads に結合させた Alpha Screen Assay System を構築して、9000 種類の chemical compound のスクリーニングを行った。その結果、No.8016 を含む 12 種類の化合物候補が得られた。高い細胞増殖抑制効果を示した No.8016 に類似構造をもったテルミサルタンとカンデサルタンを見出した。さらに Alpha Screen Assay System で、テルミサルタンもカンデサルタンも強い結合阻害効果をもつことを確認した。

HT29・HCT116 細胞を使用した細胞増殖カーブでの検討では、IL-8 はコントロールに比べて有意に細胞増殖を亢進させた。テル

ミサルタンは、濃度依存的に IL-8 による細胞増殖を完全に抑制した。一方、カンデサルタンは、IL-8 による細胞増殖を抑制しなかった。HB-EGF-CTF と PLZF の局在は、コントロールでは HB-EGF-CTF は細胞膜に PLZF は核内に存在した。IL-8 刺激により HB-EGF-CTF は核移行し、PLZF は核外にくみだされた。テルミサルタンとカンデサルタンで前処置後 IL-8 刺激を行うと、IL-8 による HB-EGF-CTF 核移行は、テルミサルタンのみで阻害でき、カンデサルタンでは阻害されなかった。テルミサルタン、カンデサルタン共に EGFR リン酸化を阻害しなかった。また、細胞増殖抑制効果はテルミサルタンのみにもみられ、AT1R のノックダウンをしても細胞増殖抑制効果は見られた。

In vivo では、それぞれ、マウスの体重変化や腸管長には差はなかった。A 群(テルミサルタン非投与群)と B 群(テルミサルタン投与群)において、腫瘍の発生個数と平均腫瘍径について B 群でやや発生個数の低下傾向は認められたが、統計学的な有意差は認められなかった。

今回、9000 種類の chemical compound をスクリーニングし HB-EGF-CTF 核移行阻害効果をもつ薬剤を見出し、テルミサルタンが、IL-8 に対する細胞増殖、細胞遊走能に対する抑制効果をもつことを初めて明らかにした。Alpha Screen Assay System は、結合阻害候補薬剤を大量にスクリーニングすることを可能にし、非常に有効な方法である。

テルミサルタンとカンデサルタン HB-EGF-CTF と PLZF 結合阻害、細胞増殖の違いは、各薬剤の細胞内への浸透効果の差によると考えられた。In vivo による、テルミサルタンの腫瘍発生抑制効果については有意差はなく、発生個数が少なく有意差が出現しない可能性もありマウスの個体を増加したり、腫瘍の前病変といわれている ACF (Aberrant crypt foci) は 100 前後発生するといわれており、ACF の発生抑制効果の検討も施行すべきであると考えられた。

テルミサルタンによって HB-EGF-CTF 核移行シグナルを特異的に阻害することが可能となったため、IL-8 による細胞増殖・遊走作用は、HB-EGF-CTF 核移行シグナルを介した経路が関与していることが明らかになった。HB-EGF-CTF 核移行シグナルが、大腸癌細胞増殖に重要な役割を果たしていると思われる。HB-EGF-CTF 核内移行シグナル抑制は、新たな大腸癌治療戦略になりうると思われた。

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 1 件)

Ozeki Keiji, Tanida S, Morimoto C, Inoue Y, Mizoshita T, Tsukamoto H, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Nishiwaki E, Ishiguro H, Higashiyama S, Joh T.

Telmisartan inhibits cell proliferation by blocking nuclear translocation of ProHB-EGF C-terminal fragment in colon cancer cells. PLoS One.2013;8(2):e56770 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579940/>

〔学会発表〕(計 3 件)

大腸癌増殖シグナル HB-EGF-C 末端核移行をターゲットとした新規薬剤探索
尾関 啓司
第50回日本癌治療学会学術集会 2012年10月25日 横浜市西区 パシフィコ横浜

炎症性サイトカイン(IL-8)によるHB-EGF-C 末端核移行シグナルを介した大腸細胞増殖機序 尾関啓司、谷田論史、塚本宏延、片岡洋望、城卓志 第40回日本潰瘍学会 2012年7月14日 東京都新宿区 京王プラザホテル

Nuclear Translocation of proHB-EGF C-Terminal Fragment Regulates IL-8-Induced Cell Proliferation in Colon Epithelial Cells. Keiji Ozeki, Satoshi Tanida, Tsutomu Mizoshita, Hironobu Tsukamoto, Takaya Shimura, Hiromi Kataoka, Takeshi Kamiya, and Takashi Joh DDW2012 San Diego 2012年5月21日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 隆史 (MIZUSHIMA, Takashi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60433223

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

尾関 啓司 (OZEKI Keiji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医