

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290049

研究課題名(和文) 膵臓及び大腸発がんにおけるメラノコルチン受容体経路の関与とそのがん予防への応用

研究課題名(英文) Involvement of the melanocortin receptor pathway in pancreatic and colorectal carcinogenesis and its application to cancer prevention

研究代表者

高橋 真美 (Takahashi, Mami)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90214973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：AyアレルはPt11a-KrasG12Dマウスの膵臓発がん及び糖尿病 KK マウスにおけるアゾキシメタン誘発大腸発がんを促進した。その促進のメカニズムの一つとして、アグーチ高発現がMCRの活性化を抑えることによりAdipogenesis に関与する遺伝子Xの発現が上昇し、遺伝子X産物がCSF1の発現を上昇させ、マクロファージの集積を起こすことが示唆された。MCR経路の下流を活性化するcAMP刺激剤のフォルスコリンは、遺伝子Xの発現を抑制したが、炎症関連因子の発現は細胞によって抑制する場合と上昇させる場合があり、発がんへの影響は一定ではないと推察された。

研究成果の概要(英文)：The Ay allele promoted pancreatic carcinogenesis in Pt11a-KrasG12D mice and azoxymethane (AOM)-induced colorectal carcinogenesis in diabetic KK mice. Increased expression of CSF1 and accumulation of macrophages was observed in pancreatic carcinoma tissues in Pt11a-KrasG12D-Ay mice and AOM-induced colorectal carcinoma tissues in KK-Ay mice. The agouti overexpression in pancreatic cancer cell lines established from Pt11a-KrasG12D mice increases the expression of adipogenesis-related gene X via antagonizing MCRs. The gene X product significantly elevated CSF1 expression. Expression of the gene X was decreased by treatment with forskolin, which elevates intracellular cAMP and stimulates downstream pathways of MCRs. However, effects of forskolin on inflammatory factors were different among cell lines and the effects on carcinogenesis was supposed to be not consistent.

研究分野：腫瘍学 がん化学予防

キーワード：メラノコルチン受容体 膵臓がん 大腸がん がん予防 アグーチ

1. 研究開始当初の背景

肥満や運動不足、糖尿病、慢性炎症等が大腸がんや膵臓がんのリスクを上昇させることが示唆されている。メラノコルチン受容体 (MCR) は、様々な臓器で発現し、皮膚でのメラニン合成と中枢での摂食調節、脂肪・筋肉でのエネルギー代謝、免疫や炎症、性行動等に関わっており、内因性ブロッカー Agouti / Agouti 関連蛋白質 (AgRP) とメラノコルチン経路のバランスが崩れると、様々な臓器の代謝が変化し、肥満や糖尿病につながる可能性がある。実際、ヒトにおいて、MC4R や AgRP の SNPs と肥満症との関連が示されており (Farooqi I.S., et al, 2003; Wen W., et al, 2012; Mayfield D.L., et al, 2001; Bonilla C., et al, 2006)、肥満や糖尿病患者では血中 AgRP 値が高いことが報告されている (Katsuki A., et al, 2010)。脂肪組織で発現する ASIP (ヒトの Agouti homolog) のレベルが女性において BMI と相関するという報告もある (Voisey J., et al, 2002)。しかしながら、肥満や糖尿病との関連が示唆されている大腸がんや膵臓がんにおける Agouti / AgRP-MCR 経路の関与は明らかではない。

肥満モデルの *A<sup>y</sup>* マウスでは、Agouti が全身で高発現しており、皮膚においてはメラニンの合成に関わる MC1R を阻害して毛色が黄色を呈し、中枢においては摂食抑制に関わる MC4R を阻害して、過食・肥満を起こす。同様に、MC4R 欠損マウスや MC3R 欠損マウスにおいても肥満が起こることが示されている (Moussa N.M., et al, 1999)。*A<sup>y</sup>* マウスでは、肺がんの自然発症率が高く、また、化学発がん物質や遺伝子操作による乳がんや肝臓がん、皮膚の扁平上皮がんの発生が高いことが報告されている (Reviewed by Wolff G.L., et al, 2003)。一方、Agouti を肝臓特異的に発現させたマウスでは、肥満・糖尿病を起こさずに、肝臓の化学発がんを促進することから、

Agouti / AgRP-MCR 経路の異常が直接的に発がん促進に寄与する可能性がある (Kuklin A., et al, 2004)。

大腸がんや肝臓がんにおいて、 $\beta$ -catenin/Wnt シグナル経路の変異による活性化が重要であることが知られているが、本来 Wnt シグナル経路は発生や分化の制御に関わっており、筋肉や骨への分化促進、脂肪細胞分化阻害等の作用を有し、Wnt10a/b は *A<sup>y</sup>* マウスの肥満を抑制し (Cawthorn W.P., et al, 2012)、Wnt10b の変異がヒトの肥満に関与する (Christodoulides C., et al, 2006)。このように、Wnt 経路と Agouti / AgRP-MCR 経路は、筋肉や脂肪の分化とエネルギー代謝を通して密接な相互関係があると考えられるが、発がんにおける両者の関係は不明である。

我々はこれまでに、肥満モデルの *A<sup>y</sup>* マウスと糖尿病モデルの KK マウスを掛け合わせた 2 型糖尿病モデルの KK-*A<sup>y</sup>* マウスを用いてアゾキシメタン (AOM) 誘発大腸発がん実験を行い、このマウスが非常に大腸発がん高感受性であることを見いだした (Teraoka N, et al, 2011)。KK-*A<sup>y</sup>* マウスに発生する大腸腫瘍は、腫瘍径も大きく、通常の肥満でないマウスに発生する大腸腫瘍とは病理組織像もやや異なることから、肥満関連大腸がんを研究するための良いモデルであると思われる。また、我々は、ヒトの膵管がん に似た膵臓化学発がんの動物モデルである *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発ハムスター膵管発がん系を用い、高脂肪食による発がん促進における膵臓の脂肪浸潤の関与 (Hori M, et al, 2011) や抗高脂血症剤による膵臓発がん抑制作用 (Takeuchi Y, et al, 2007) について検討を行ってきた。シリアンゴールデンハムスターも毛色は黄色であり、通常食においても高脂血症状態を呈し、加齢とともに、多くの皮下脂肪と内臓脂肪を蓄える。ハムスターは自然界において冬眠する動物であり、冬眠前に AgRP の発現

が上昇することが報告されていることから、ハムスターの肥満にも MCR の阻害が関わりと考えられる。

一方、最近、膵臓特異的 K-ras 変異体発現マウスが膵臓発がんマウスモデルとして開発されており、腺房細胞から膵管細胞への化生から初期病変が発生する点がヒトやハムスターとは異なるが、遺伝子の変異や欠損の組み合わせによる発がん機構の解明に用いられている。我々はこのモデルを導入して、肥満モデル  $A^y$  マウスとの交配実験を行なったところ、 $A^y$  遺伝子の導入された膵臓特異的 K-ras 変異体発現マウスでは、膵臓がんの発生及び浸潤・転移が有意に増加することがわかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、Agouti 過剰発現による発がん促進モデルに発生したがん組織において発現が変化している増殖・浸潤関連因子を調べ、MCR のアゴニスト・アンタゴニストやノックダウン法を用いることによりそれらががん細胞において Agouti/AgRP-MCR 経路に直接的に制御されているかどうかを明らかにすることを第一目的とした。Agouti 高発現発がんモデルとしては、膵臓特異的 K-ras 変異体発現マウスと  $A^y$  マウスの交配モデル、及び、AOM 誘発 KK- $A^y$  マウス大腸発がんモデルを用いた。さらに、*in vivo* でも Agouti の発現抑制や MCR の活性化によってそれらの因子を抑えることにより発がんや浸潤・転移を抑制できるかどうかを検証し、がん予防のターゲットとしての有用性を示すことを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) Agouti の過剰発現による膵臓発がん促進メカニズムに関する検討

1 マウスの膵臓発がんモデルと肥満  $A^y$  マウスの交配実験における組織サンプルを用い、cDNA アレイ解析及びリアルタイム RT-PCR

法によって、がん組織で発現が上昇し、さらに Agouti 過剰発現マウスで発現が変化している遺伝子を抽出し、免疫組織染色により、それらの遺伝子が膵臓のどの細胞で発現しているのかを調べた。

2 Agouti の過剰発現によるがんの微小環境における MCR 阻害の直接的影響については、これらのモデルより樹立化したマウス膵臓がん細胞株の MCR (MC1R~MC5R) の発現の有無を調べ、MCR のアゴニスト活性やアンタゴニスト活性を持つ化合物を作用させたり、Agouti 遺伝子を高発現させたりして、細胞の増殖・浸潤能を調べるとともに、肥満モデルマウスのがん組織で発現が上昇している遺伝子群の発現変化を検討した。また、MCR や下流の候補遺伝子をノックダウンすることにより、Agouti/AgRP-MCR 経路によって制御される浸潤・転移関連因子を検索した。

3 Agouti の過剰発現による脂肪蓄積を介した高レプチン・高インスリン・高脂血症等の全身的・間接的影響については、マウス膵臓がんモデルより樹立した膵臓がん細胞株を肥満  $A^y$  マウス及びその対照マウスに皮下移植し、腫瘍形成に対する宿主側の影響を調べることにより検討した。

4 MCR 活性化剤の発がん抑制/浸潤・転移阻害効果を検証するため、cAMP の刺激剤としてフォルスコリン(FK)(50 ppm)を  $A^y$  及び WT マウスに混餌投与し、膵臓に同所移植した膵臓がん細胞の増殖・転移に及ぼす影響を検討した。

### (2) Agouti の過剰発現による大腸発がん促進及びそのメカニズムに関する検討

1 KK- $A^y$  マウス及び KK マウスの AOM 誘発大腸発がん実験で得られた正常大腸粘膜及び AOM 誘発大腸がん組織を用い、Agouti/AgRP-MCR 経路の遺伝子・蛋白質の発現解析を行ない、大腸発がんに関与する MCR 経路を調べた。KK- $A^y$  マウスの大腸がんにおけ

る カテニンや K-ras 遺伝子の変異についても解析し、KK-*A<sup>y</sup>* マウス由来の大腸がん培養細胞株の樹立も試みた。

2 Agouti/AgRP の受容体である MCR および炎症関連因子である colony-stimulating factor (CSF1) は大腸発がん重要な役割をしていると考えられる。そこで、21 種類のヒト大腸がん細胞株の mRNA を用い、MCR および CSF1 の発現量を相対的に比較した。

3 Human agouti signaling protein (ASIP) の炎症関連因子、特に CSF1 への影響を確かめる為に ASIP を強発現する細胞を作成した。CMV プロモーターの下流で ASIP を発現させるプラスミドベクターを作製し、DLD-1 細胞に遺伝子導入した。

4 ASIP の作用を抑制した場合の炎症関連因子への影響を確かめる目的で cAMP の刺激剤の添加実験を行った。ASIP は MC1R を介して cAMP の活性を抑制し、CREB の下流にある cyclooxygenase-2 (COX2)、CSF1 及び遺伝子 X の発現を減少させた可能性が考えられたため、cAMP の刺激剤として FK(10 μM) を 24 時間 ASIP 強発現 DLD-1 細胞のサブクローン株化後の各種細胞に作用させた。

5 これら cAMP の刺激剤の *in vitro* における結果をふまえて、発がん予防効果の検討及びメカニズム解明を計画した。腸腫瘍を多数生成する、家族性大腸腺腫症のモデルマウス、Min マウスを用いて FK のがん予防効果に対する検討を行った。具体的には、雌性 Min マウスに対し、対照群には基礎食 (AIN-76A) のみ、FK 群には 5 ppm FK 混餌飼料を 8 週間与え、両群の生成した腸ポリープの数を計測した。

#### 4. 研究成果

(1) Agouti の過剰発現による膵臓発がん促進メカニズムに関する検討

1 マウスの膵臓発がんモデル *Ptf1a-Kras<sup>G12D</sup>* マウスでは、肥満 *A<sup>y</sup>* マウスとの交配によって

45 週齢における膵臓がんの発生個数が約 3 倍増加した。*Ptf1a-Kras<sup>G12D</sup>* マウスの膵臓腫瘍に比べ、*Ptf1a-Kras<sup>G12D-A<sup>y</sup></sup>* マウスで発現が高かった遺伝子群のうち、KK-*A<sup>y</sup>* マウスの大腸腫瘍でも KK マウスより発現が高かった遺伝子として、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) を見出した。マクロファージマーカーの F4/80 の発現も *A<sup>y</sup>* アレルを有するマウスの腫瘍で有意に高かった。また、肥満の脂肪組織で発現が高いことが知られている遺伝子 X が膵臓がん細胞においても発現しており、*Ptf1a-Kras<sup>G12D-A<sup>y</sup></sup>* マウスの腫瘍組織で発現が高いことを見出した。

2 *Ptf1a-Kras<sup>G12D</sup>* 及び *Ptf1a-Kras<sup>G12D-A<sup>y</sup></sup>* マウス由来の膵臓がん細胞株を樹立した。これらの細胞株において、発現レベルは低いものの、MC1R, MC3R, MC4R の発現が認められた。*Ptf1a-Kras<sup>G12D</sup>* マウス由来膵がん細胞株に Agouti を cDNA 発現ベクター導入により高発現させると、Adipogenesis 関連遺伝子 X の発現が上昇し、一方、*Ptf1a-Kras<sup>G12D-A<sup>y</sup></sup>* マウス由来膵臓がん細胞株を MCR の下流を活性化する cAMP 刺激剤で処理すると、遺伝子 X の発現が抑制された。FK は 2 μM 以上で細胞の形態をフラットに変化させたが、細胞増殖への影響は認められなかった。興味深いことに、遺伝子 X の転写産物は CSF1 や COX2 の発現を顕著に上昇させた。これらの結果より、アグーチ高発現が MCR の活性化を抑えることにより遺伝子 X の発現が上昇し、遺伝子 X 産物が CSF1 の発現を上昇させることが示唆された。

3 *Ptf1a-Kras<sup>G12D</sup>* マウス由来の膵臓がん細胞を *A<sup>y</sup>* マウスおよびそのコントロールの野生型マウスに皮下移植して腫瘍の増殖を比較した結果、*A<sup>y</sup>* マウスの方が腫瘍の成長が早かった。また、*A<sup>y</sup>* マウスの皮下移植腫瘍における M-CSF の発現が上昇していた。これらの結果より、*A<sup>y</sup>* アレルによる発がん促進のメカニズムの一つとして、CSF1 発現上昇によるマクロファージ活性化の関与が示唆された。

4 MCR の下流を活性化する cAMP 刺激剤の FK の膵がん細胞増殖に対する影響をマウス同種同所移植モデルにより検討した。マウス膵臓がん細胞を移植した膵臓重量は *A<sup>y</sup>* マウスにおいて WT マウスより有意に高く、50 ppm FK 混餌投与により *A<sup>y</sup>* マウスでは有意差は無いもののやや低い傾向が見られたが、WT ではやや高くなる傾向が見られた。腹腔内脂肪量は *A<sup>y</sup>* マウスで WT より高く、FK 投与によりいずれも低下する傾向が見られた。宿主の状態によって FK の腫瘍増殖への作用が異なる可能性が示唆された。

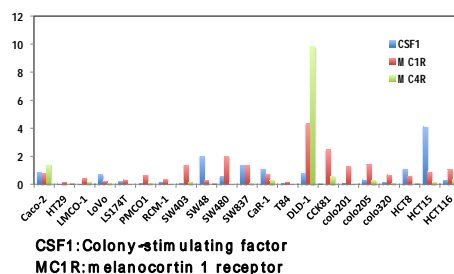
## (2) Agouti の過剰発現による大腸がん促進及びそのメカニズムに関する検討

1 2 型糖尿病モデルマウスである KK-*A<sup>y</sup>* マウスにおいては、*A<sup>y</sup>* アレルが糖尿病 KK マウスの大腸がん感受性をさらに増進させ、AOM で誘導される大腸腫瘍の発生個数が KK マウスの 2 倍以上多いことが見出された。リアルタイム RT-PCR 解析の結果、KK マウスの AOM 誘発大腸腫瘍に比べ、KK-*A<sup>y</sup>* マウスの大腸腫瘍では MCP1 や CSF1 の発現が高く、マクロファージマーカーの F4/80 の発現も高かった。がん細胞が発現する MCP1 や CSF1 が腫瘍内へのマクロファージの集積をもたらしていることが示唆された。また、膵がんモデルマウスの場合と同様に、遺伝子 X の発現も高いことを見いだした。

2 KK-*A<sup>y</sup>* マウス由来の大腸がん培養細胞株の樹立を試みたが成功しなかったため、21 種類のヒト大腸がん細胞株の mRNA を用い、MCR および CSF1 の発現量を相対的に比較した。その結果、MC4R は、ほとんどの細胞で発現が低かったが、DLD-1 細胞のみ、突出して発現量が高いことがわかった。また、MC1R の発現は DLD-1 細胞が一番高く、SW48 細胞及び HCT15 細胞は中等の発現量であった。これらの結果より、大腸がんにおけるメラノコルチン受容体経路の関与に関する研究を進めるに適

した細胞は DLD-1 細胞であることが分かった。

DLD細胞におけるMC1R,MC4Rの強い発現

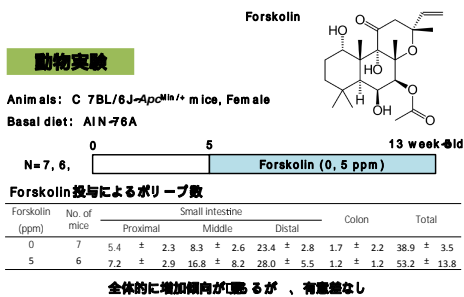


3 恒常的に ASIP を発現する DLD-1 細胞 (サブクローン化前) を得た後、mock を導入した細胞を比較すると、ASIP の著明な発現と CSF1 の有意な発現抑制が確認できた。更に炎症関連因子の発現を検討すると ASIP の強発現により inducible nitric oxide synthase および COX2 の発現の変化が見られた。ASIP 発現 DLD-1 細胞のサブクローンを選別し、ASIP 発現量の異なるサブクローン株 3 つにおける COX2、CSF1 及び遺伝子 X の発現への変化を判定量的 PCR にて検討した。その結果、膵臓がん細胞とは異なり、それぞれの因子は 50% 以上抑制された。

4 cAMP の刺激剤として FK を用い、各種細胞における COX2、CSF1 及び遺伝子 X の発現への効果を検討した。その結果、COX2 は予想通り発現上昇したが、CSF1 及び遺伝子 X の発現は更に減少した。他の炎症関連因子、IL-1beta, IL-6 及び TNF alpha は COX2 と同様に上昇した。

5 これら cAMP の刺激剤の *in vitro* における結果から、FK は炎症関連因子に対し、正の方向と負の方向の両方に作用する可能性が示された。そこで、個体閉鎖空間におけるがん予防の総合判定を行うことにした。雌性 Min マウスに対し、対照群には基礎食のみ、FK 群には 5 ppm FK 混餌飼料を 8 週間与えた。その結果、FK 混餌飼料を与えた Min マウスにおいて腸ポリープ数に増加傾向がみられた (38.9 vs 53.2 個)。

## フォルスコリン投与による動物実験



個体閉鎖空間における総合判定では腫瘍が増加方向に傾いたが、Min マウスは高脂血症を呈するものの肥満状態ではないため、ASIPの過剰な状態である肥満状態などのモデルを用いた詳細な検討が課題として残った。

## 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 2 件)

- Hori, M., Mutoh, M., Imai, T., Nakagama, H., Takahashi, M. Possible involvement of pancreatic fatty infiltration in pancreatic carcinogenesis. JOP. J. Pancreas (Online), 17: 166-175, 2016. 査読有り。http://pancreas.imedpub.com/
- Ito, K., Ishigamori, R., Mutoh, M., Ohta, T., Imai, T., Takahashi, M. The A<sup>y</sup> allele promotes azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis via macrophage migration in hyperlipidemic/diabetic KK mice. Cancer Sci., 104: 835-873, 2013. 査読有り。doi: 10.1111/cas.12162

[学会発表](計 7 件)

- Takahashi, M., Ishigamori, R., Mutoh, M., Fujii, G., Miyamoto, S., Imai, T. Increase of pancreatic cancer development in pancreas-specific K-ras mutant mice by crossing with obesity Ay mice and involvement of the M-CSF. Tenth AACR-JCA Joint Conference, Maui, Hawaii (USA), Feb. 19, 2016.
- 高橋真美、石ヶ守里加子、藤井元、武藤倫弘、今井俊夫。Agouti によるマウス膵臓発がん促進メカニズム。第 73 回日本癌学会、パシフィコ横浜(横浜) 2014 年 9 月 27 日。
- 高橋真美、石ヶ守里加子、藤井元、武藤倫弘、今井俊夫。マウス膵臓発がんモデルにおける A<sup>y</sup> アレルによる発がん促進とそのメカニズム。NCC-NCGM 合同リトリート、

セミナーハウス常総(常総) 2014 年 8 月 28 日。

4 高橋真美、石ヶ守里加子、尾沼若奈、小宮雅美、藤井元、武藤倫弘、田中卓二、今井俊夫。A<sup>y</sup> アレルによるマウス膵臓発がん促進における M-CSF の関与。第 72 回日本癌学会、パシフィコ横浜(横浜) 2013 年 10 月 3 日。

5 高橋真美、石ヶ守里加子、中西るり、尾沼若奈、小宮雅美、藤井元、武藤倫弘、田中卓二、今井俊夫。A<sup>y</sup> アレルによる膵臓発がん及び大腸発がんの促進におけるマクロファージコロニー刺激因子の関与。第 24 回日本消化器癌発生学会、石川県立音楽堂(金沢) 2013 年 9 月 6 日。

6 高橋真美、石ヶ守里加子、武藤倫弘、田中卓二、今井俊夫。マウス膵臓発がんにおける A<sup>y</sup> アレルによる発がん促進。第 28 回発癌病理研究会、ユインチホテル南城(沖縄) 2013 年 8 月 26 日。

7 高橋真美、伊藤久美子、石ヶ守里加子、中西るり、武藤倫弘、藤井元、太田敏博、今井俊夫。アゾキシメタン誘発大腸発がん高感受性の II 型糖尿病モデルマウスにおける A<sup>y</sup> アレルによる腫瘍形成促進。第 20 回日本がん予防学会、日本薬学会長井記念館(東京) 2013 年 7 月 5 日。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 真美 (TAKAHASHI Mami)  
国立研究開発法人 国立がん研究センター  
研究所 動物実験支援施設 ユニット長  
研究者番号: 90214973

### (2) 研究分担者

武藤 倫弘 (MUTOH Michihiro)  
国立研究開発法人 国立がん研究センター  
社会と健康研究センター 予防研究部 予防研究室 室長  
研究者番号: 30392335