

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460958

研究課題名(和文) Hsp27とSPARC蛋白質の同定・機能解析と大腸癌における意義解明

研究課題名(英文) Role of Hsp27 and SPARC in the carcinogenesis of colorectal cancer

研究代表者

内藤 裕二(Naito, Yuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00305575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌におけるバイオマーカータンパク質の研究を展開し、3年間の研究期間において、1)メチルグリオキザール修飾熱ショック蛋白質(Hsp27)と骨格筋で同定されたマイオカイン蛋白質(SPARC)の大腸発癌における細胞生物学的、2)大腸癌微小環境、特に炎症病態におけるHsp27蛋白質とSPARC蛋白質の相互作用、3)臨床検体を用いたMG修飾Hsp27蛋白質、SPARC蛋白質の予防・診断マーカーとしての意義を明らかにした。特に、SPARC蛋白質が骨格筋だけでなく、腸管炎症病態においてリンパ球の分化誘導に重要な役割を果たしていることを解明できた点は新知見である。

研究成果の概要(英文)：The present study has demonstrated that 1) methylglyoxal-modified Hsp27 protein (MG-Hsp27) and secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) secreted from muscle play a crucial role in the carcinogenesis of colorectal cancer, 2) SPARC protein could reduce intestinal inflammation via the inhibition of inflammatory cytokines and activated T lymphocytes, and 3) serum levels of MG-HSP and SPARC did not change in the clinical stages of colorectal cancers.

研究分野：消化器内科、下部消化管

キーワード：翻訳後修飾熱ショック蛋白質 SPARC バイオマーカー 腸管粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 早期大腸癌に対する内視鏡診断、治療は近年著しい進歩を見せ、画像強調内視鏡による診断、内視鏡的粘膜切除術 (EMR) や内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) による治療が積極的に応用され、有用な結果を得ている。しかし、わが国の大腸癌罹患率は急増しており、世界的にみてもわが国の大腸癌死亡率は極めて高く、大腸癌対策は緊喫の臨床的課題である。早期診断・治療に加え、大腸癌予防に向けた取り組みは極めて重要な国家戦略である。

(2) 大腸癌、大腸腺腫の危険因子についての最近のコホート研究は、身体的不活発、肥満、糖尿病が確実な危険因子であることを明らかにし、わが国の成績でもアルコール、肥満がリスク要因であり、身体活動、食物繊維、牛乳、カルシウムなどがほぼ確実な予防要因と位置づけられている。しかしながら、集団レベルでの肥満・糖尿病予防対策や日常的運動推進は今のところ成功しているとは言えず、世界の成人の 31% と青少年の 80% は推奨される量の身体活動を行っていない。よって、大腸癌予防戦略上、肥満・糖尿病と大腸発癌に關与する分子機構の詳細を理解し、それらに及ぼす日常的身体活動の影響を解明していくことは極めて重要である。これまでに、インスリンシグナル異常、増殖シグナル (IGF や EGF など)、酸化ストレス、がん微小環境、抗がん遺伝子の DNA メチル化等が注目されているものの、その詳細は明らかとなっていない。

(3) 研究代表者らは一貫して酸化ストレスと各種生活習慣病との関わりについての研究を続けている。なかでも、蛋白質の量的変化ではなく、活性酸素や活性窒素種による蛋白質の酸化的翻訳後修飾が種々の生命現象へ關与している可能性を考え、主に消化器疾患の病態解析や発症予防に向けたプロテオミクス解析を推進してきた。特に、酸化反応や活性アルデヒド体による翻訳後修飾蛋白質のプロテオミクス解析技術においては、ソフト、ハードともに、われわれを含めたわが国の研究者が世界をリードする分野である。最近では、小腸粘膜上皮タイトジャンクション蛋白質 ZO-1、カプサイシン感受性受容体 TRPV1、細胞骨格蛋白質 tropomyosin-1 などの酸化的翻訳後修飾体を検出・同定し、その意義を明らかにしてきた。

(4) 高血糖状態や酸化ストレスの亢進により生体内生成が増加するメチルグリオキザール (methylglyoxal、以下 MG と省略する) に注目し、培養大腸癌細胞、ヒト大腸癌組織に MG により翻訳後修飾を受けた Heat shock protein 27 (Hsp27) 蛋白質を検出、同定した。この MG 修飾は正常腸管上皮培養細胞株やヒト大腸正常粘膜には検出されず、腫瘍特

異的であり、MALDI-MS 解析により、Hsp27 蛋白質の特定のアルギニン残基と MG による特異なアルグピリミジン付加体を形成することを世界に先駆けて見いだした。さらに蛋白質の機能解析を進め、MG 修飾を受けた部位は Hsp27 蛋白質のシャペロン機能に重要であり、MG 修飾によりその機能が亢進・維持され、結果的に Hsp27 蛋白質に MG 修飾を受けた細胞はアポトーシス刺激に抵抗性を獲得することを明らかにした。

日常的運動による大腸癌予防に向けた実験モデルを用いて、その有効性を示すバイオマーカーを世界で初めて同定した。運動により変動する骨格筋遺伝子の発現解析から、アゾキシメタン誘発大腸腫瘍の発生を抑制する新規マイオカイン SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine) を同定した。SPARC は運動刺激により骨格筋細胞で合成・分泌され、腫瘍組織に対して増殖抑制・アポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示すことを、SPARC 欠損マウス等を用いた実験などにより明らかにした。

2. 研究の目的

基盤研究 C (H22-H24) の成果である MG 修飾 Hsp27 と基盤研究 B (H17-H19) の分担を契機に開始した運動科学の研究により発見した SPARC という 2 つのシーズを基盤に、これら蛋白質の大腸癌に關連する機能解析を進め、大腸癌予防戦略に有用なバイオマーカー確立を目指す研究計画を着想し、立案した。3 年間の研究により明らかにしたい点は 1) 大腸癌細胞のアポトーシス抵抗性、増殖能、運動能などに MG 修飾 Hsp27 は促進的に、SPARC は抑制的に作用していること。

2) *in vivo* 大腸癌微小環境における腫瘍形成に対して MG 修飾 Hsp27 は促進的に、SPARC は抑制的に作用していること。

3) ヒト大腸癌の予防戦略上 MG 修飾 Hsp27 と SPARC は有用なバイオマーカーであること、の 3 点である。

3. 研究の方法

本研究は 3 つの研究計画、研究計画 1 : MG 修飾 Hsp27 蛋白質 (Hsp27) と SPARC 蛋白質の細胞生物学的意義、研究計画 2 : 大腸癌微小環境における Hsp27 と SPARC の相互作用、研究計画 3 : 臨床検体を用いた MG 修飾 Hsp27、SPARC の予防・診断マーカーとしての意義の検討に集約される。研究計画 1 は伊藤、研究計画 2 は内藤、研究計画 3 は内藤、高木、内山が中心になり進めていく。平成 25 年度は、研究計画 1 では、SPARC による細胞増殖抑制作用、アポトーシス、細胞老化と MG 修飾 Hsp27 の影響を進める。研究計画 2 では実験大腸癌微小環境における Hsp27 と SPARC の相互作用、研究計画 3 では臨床検体を用い、それぞれ免疫染色、免疫ブロットによる MG 修飾蛋白質の検出、SPARC 濃度の測定を進める。平成 26 年度以降は、培養筋線維芽細胞、マクロファ

ージ細胞を用いた MG 修飾 Hsp27 の意義、MG 修飾抑制剤による細胞機能の変化、動物大腸癌モデルでの有効性評価を行う。さらに、動物モデルで運動療法介入試験を実施し、SPARC の有効性に Hsp27 の MG 修飾を抑制すること、癌微小環境を改善させることが関与することを明確にしたい。

4. 研究成果

(1) MG 修飾 Hsp27 蛋白質と SPARC 蛋白質の細胞生物学的意義

SPARC 蛋白質の大腸細胞へ影響については増殖抑制効果、アポトーシス誘導を明らかにし、細胞内マトリックスとの反応では MG 修飾 Hsp27 はアクチンと結合し、がん細胞の流動的遊走能に影響を与えることを確認した。SPARC が血管新生や VEGF、MMP 発現にも影響する可能性があり、上皮細胞だけでなく間質系細胞においても検討を進め、Hsp27 と SPARC の細胞レベルでの相互作用を明らかにした。

(2) 大腸癌微小環境における Hsp27 蛋白質と SPARC 蛋白質の相互作用

SPARC 欠損マウスを繁殖飼育し、アゾキシメタン誘発大腸癌モデルでの影響を検討した。SPARC 欠損マウスの内分泌代謝系の検討から、同マウスでは全身性のインスリン抵抗性が惹起されていることを確認し、大腸発癌にも関与することを検証した。SPARC 欠損マウスを利用し、TNBS 腸炎を惹起しその腸管免疫応答を検討した。CD4 陽性 T 細胞の FACS 解析により T 細胞の分化誘導における SPARC の役割を明らかにした。

(3) 臨床検体を用いた MG 修飾 Hsp27 蛋白質、SPARC 蛋白質の予防・診断マーカーとしての意義の検討

大腸癌の診断バイオマーカーを探索するために大腸内視鏡検査受診者を対象に臨床データと付与した血清を 500 症例を超え集めた。SPARC 蛋白質の血中濃度を測定したが、一定の傾向は見られなかった。タンパク質の検出の他にペプチド断片の検出も試みており、安定同位体元素を内部標準として利用した定量的 LC-MS 分析方を確立した。ヒト大腸ポリープ、大腸癌、健常者の血清タンパク質、ペプチド断片、メタボローム解析を進め、ペプチド断片による成果を論文化した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Naito Y, Ichikawa H, Akagiri S, Uchiyama K, Takagi T, Handa O, Yasukawa Z, Tokunaga M, Ishihara N, Okubo T, Mukai J, Ohki M, Uchida K, Yoshikawa T. Identification of cysteinylated transthyretin, a predictive biomarker of treatment response to partially hydrolyzed guar

gum in type 2 diabetes rats, by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Biochem Nutr.* 2016;58:23-33. 査読有.

2. Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Ushiroda C, Ohnogi H, Kudo Y, Yasui M, Inui S, Hisada T, Honda A, Matsuzaki Y, Yoshikawa T. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310:G367-G75. 査読有.
3. Uchiyama K, Naito Y, Yagi N, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Nonaka D, Asada K, Tanaka K, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y. Peptidomic analysis via one-step direct transfer technology for colorectal cancer biomarker discovery. *J Proteomics Bioinform.* 2015;S5. 査読有.
4. Matsuyama T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Adachi S, Mizushima K, Kimura R, Okajima M, Sakai H, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Itoh Y. Tumor inoculation site affects the development of cancer cachexia and muscle wasting. *Int J Cancer.* 2015;137:2558-65. 査読有.
5. Ishikawa T, Adachi S, Okayama T, Kokura S, Mizushima K, Doi T, Matsuyama T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 inhibition increases the antitumor activity of adoptive T-cell therapy when carried out with naive rather than differentiated T cells. *Oncol Rep.* 2015;33:2545. 査読有.
6. Iida T, Takagi T, Katada K, Mizushima K, Fukuda W, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Ichikawa H, Naito Y, Itoh Y. Rapamycin Improves Mortality Following Intestinal Ischemia-Reperfusion via the Inhibition of Remote Lung Inflammation in Mice. *Digestion.* 2015;92:211-9. 査読有.
7. Wada S, Matsushita Y, Tazawa H, Aoi W, Naito Y, Higashi A, Ohshima H, Yoshikawa T. Loss of p53 in stromal fibroblasts enhances tumor cell proliferation through nitric oxide-mediated cyclooxygenase 2

- activation. Free Radic Res. 2014;49:269-78. 査読有.
8. Naito Y, Takagi T, Higashimura Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. Arch Biochem Biophys. 2014;564:83-8. 査読有.
 9. Naito Y, Takagi T, Handa O, Yoshikawa T. Lipid hydroperoxide-derived modification of proteins in gastrointestinal tract. Subcell Biochem. 2014;77:137-48. 査読有.
 10. Ishikawa T, Kokura S, Enoki T, Sakamoto N, Okayama T, Ideno M, Mineno J, Uno K, Yoshida N, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Yagi N, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Phase I clinical trial of fibronectin CH296-stimulated T cell therapy in patients with advanced cancer. PLoS One. 2014;9:e83786. 査読有.
 11. Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Tanimura Y, Mizushima K, Harusato A, Fukui A, Yoriki H, Handa O, Ohnogi H, Yoshikawa T. Preventive effect of agaro-oligosaccharides on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal injury in mice. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29:310-7. 査読有.
 12. Aoi W, Naito Y, Yoshikawa T. Potential role of oxidative protein modification in energy metabolism in exercise. Subcell Biochem. 2014;77:175-87. 査読有.

[学会発表] (計 5件)

1. 田中 信, 高木智久, 内山和彦, 堀田祐馬, 水島かつら, 東村泰希, 岡山哲也, 鎌田和浩, 堅田和弘, 石川 剛, 半田 修, 内藤裕二, 伊藤義人. 第 57 回日本消化器病学会大会. 2015 年 10 月 09 日. グランドプリンスホテル高輪 (東京).
2. 田中 信, 高木智久, 内山和彦, 豊川優希, 堀田祐馬, 水島かつら, 東村泰希, 岡山哲也, 堅田和弘, 半田 修, 石川 剛, 内藤裕二, 伊藤義人. 第 52 回日本消化器免疫学会総会. 2015 年 07 月 31 日. 京王プラザホテル (東京).
3. 田中 信, 高木智久, 内藤裕二, 内山和彦, 堀田祐馬, 水島かつら, 東村泰希, 吉田直久, 鎌田和浩, 堅田和弘, 石川 剛, 半田 修, 小西英幸, 伊藤義人. マウス実験腸炎モデルにおける SPARC の役割. 第 101 回日本消化器病学会総会. 2015 年 04 月 24 日. 仙台国際センター (仙台).
4. Uchiyama K, Naito Y, Mizushima K, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Ishikawa T, Handa O, Takagi T, Konishi H, Yagi N, Itoh Y.

Investigation of serum multiple peptides combination analysis for diagnosis of colorectal cancer. The 3rd JSGE International Topic Conference. 2015 Apr 24; 仙台国際センター (仙台) .

5. Naito Y, Nakanishi M, Suehiro A, Mukai J, Uchida K. Biological role and measurement of advanced glycation ebd products and their precursors. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2013 July 7; Osaka International Convention Center (大阪).

[図書] (計 2 件)

1. 内藤裕二. 消化管(おなか)は泣いています. ダイアモンド社. 東京. 2016. pp1-253.
2. 内藤裕二. 人生を変える賢い腸のつくり方. ダイアモンド社. 東京. 2016. pp1-253.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 大腸がんの検出方法

発明者: 内藤裕二

権利者: 内藤裕二

種類: 特許

番号: 特願 2015-26486

出願年月日: 2015 年 02 月 13 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

京都府立医科大学消化器内科消化管研究室
http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/res_eaches/shokakan.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 裕二 (NAITO, Yuji)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00305575

(2) 研究分担者

内山 和彦 (UCHIYAMA, Kazuhiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 50298428

(3) 研究分担者

高木 智久 (TAKAGI, Tomohisa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 70405257

(4) 研究分担者

伊藤 友子 (大矢 友子) (ITO, Tomoko)

名古屋大学・医学（系）研究科（研究院）・
助教
研究者番号：80329648

(5)連携研究者
なし