

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430131

研究課題名(和文)大腸がんの発生・悪性化におけるAhレセプターの役割

研究課題名(英文)Biological function of aryl hydrocarbon receptor in colon cancer

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)・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：00262072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：緑黄色野菜に多く含まれる成分、indole-3-carbinol (I3C)は、aryl hydrocarbon receptor (AhR)のリガンドとして作用する。I3Cを含有する飼料をマウスに投与し、または大腸がん細胞の培地に添加する事によりAhRのがん抑制効果を検討した。前者では小腸の自然免疫関連遺伝子の発現低下が、後者では細胞増殖の低下が認められた。また腸上皮初代培養系で炎症性サイトカインの添加は、細胞増殖を促進した。I3Cは、その受容体を介して炎症反応を抑制することにより、細胞増殖を抑制していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：We investigated tumor suppressive effect of indole-3-carbinol (I3C), which is the bioactive component contained in cruciferous vegetables, by studying the mice fed with the diet containing I3C or by examining culture cells treated with I3C. The former resulted in suppression of innate immunity-related genes in the intestine, the latter showed growth inhibitory effect. In addition, it was shown that inflammatory cytokine promoted cell proliferation in the primary culture system of intestinal epithelia. These results suggest that I3C suppresses cell proliferation by regulating inflammatory responses through its receptor.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：大腸がん がん予防 AhR 炎症 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

我が国における大腸がん罹患率は男女共に上位を占めている。食生活の西洋化に伴って患者が増えていると言われており、大腸がんは食事によって予防できることが示唆される。小腸に腫瘍を自然発生するMin マウスは、大腸がん抑制遺伝子として知られるApc に異常があり、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである。リガンド依存性の受容体型転写因子であるAh receptor (AhR)は、大腸がん抑制遺伝子としての性質をもつことが我々の研究から明らかとなり、緑黄色野菜に多く含まれる indole-3-carbinol (I3C)をMin マウスに与えると、腫瘍形成が抑制されることを示した。トリプトファン代謝物であるI3C は、AhR に結合するリガンドとして機能し、その転写因子としての活性を促進することが示されており、前述のI3C による腫瘍抑制効果はAhR を介して発現されることが示唆されている。

I3C によるがん予防効果は、AhR 活性化を介した薬物代謝酵素の転写活性化による発がん剤の代謝・無毒化や、細胞周期の制御やアポトーシスの誘導などにより説明されてきた。近年、AhRによる腸内免疫調節機能が報告され、特にリンパ球の増殖や分化に関わることが明らかになっている。健康な腸を維持するには腸内細菌とうまくつき合う必要があり、これには生体の免疫作用が重要な役割をしている。生体防御における異物への攻撃と寛容のバランスの乱れは、大腸がんの引き金になる可能性がある。

2. 研究の目的

I3C のがん予防効果を、AhR を介した腸内免疫制御の結果として再検討したい。本研究は、緑黄色野菜の摂取が Ah レセプターを通して腸内の免疫作用を活性化し、腫瘍抑制効果を示すという仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析

正常 C57BL マウス(日本クレア)に通常の飼料(F2, フナバシファーム)または 0.1% indole-3-carbinol (Sigma)含有飼料を2週間与えた後、小腸から RNA を抽出した。自然免疫に関連する遺伝子の発現の差異を検討するため、自然免疫チップ(ジェノパール、三菱ケミカル)を用いて解析した。

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に AhR 特異的な siRNA (Ambion, 4390824) をトランスフェクトし、抽出した RNA を用いて Affymetrix GeneChip Human Gene 2.0 ST Array により解析した。

(2) 初代培養

生後1週のマウス大腸を採取し内容物を PBS で洗浄後、collagenase と dispase で細胞を分離した。10% マトリゲル(Corning)を含むコラーゲンゲル(新田ゼラチン)に細胞を懸濁し、cell culture insert(ミリポア)にまいた。培養液として Advanced DMEM/F12 (Sigma)に EGF、R-spondin1、Noggin を添加して使用した。

(3) 細胞運動

AhR 特異的な siRNA をトランスフェクトした HCT116 の運動性を Oris cell migration assay kit (Platypus Technology) またはリアルタイム細胞アナライザー(xCelligence, Roche)により解析した。Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質活性は、GST-PAK PBD を使った pull-down assay により、HCT116 中の GTP 結合型 Rac をイムノプロットで検出した。

4. 研究成果

(1) 飼料中の植物成分による自然免疫関連遺伝子の発現変化

食餌成分によるがん予防効果を検討するため、indole-3-carbinol (I3C)処理による遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。I3C処理マウス(n=2)では、未処理(n=2)と比べて、サイトカインや免疫制御に関わる遺伝子に発現抑制がみられた。中でもケモカインであるCCL5

は未処理の3割程度に抑えられた。一方STAT3の活性化を収束させることが知られるSOCS3の発現は増加した。

RT-PCRで再検討すると、野生型マウス(n=4)では、I3C投与群のうち2匹でCCL5の発現が低下した一方、AhRKOマウス(n=4)では、低下しなかった。SOCS3の発現は、マウスの遺伝子型に関わらず、I3C投与による増加の傾向が見られた。腸におけるI3Cの免疫抑制的な効果が示唆され、腫瘍抑制効果との関連が考えられた。

(2) AhR発現細胞の同定と組織内分布

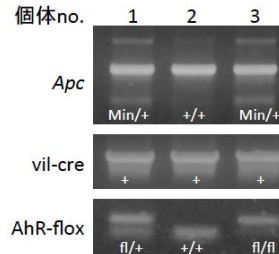
ヒト大腸がん組織の免疫染色によりAhR発現分布を検討した。非腫瘍組織のAhR発現は上皮細胞では低く、間質の細胞に発現を認めた。特に腸の内腔に近い粘膜上皮の先端部に特徴的に分布した。このAhR陽性細胞は、マクロファージのマーカーであるCD68陽性細胞と類似の分布を示した。腫瘍組織のAhR染色性は、間質と腫瘍細胞に認められ、およそ50例調べたうち1/3の割合で腫瘍細胞の核に局在した。

さらにApcMin/+マウスに生じる腫瘍のAhR発現について検討するため、マウス組織で使用可能な抗体の作成を試みた。合成ペプチドをウサギ3匹に免疫し、得られた抗血清をイムノプロットと細胞染色により抗体の性質を検討した。マウスHepa1細胞を試料に用いると、3種の抗血清のうち2つは、免疫前血清以上の強いシグナルが検出された。マウス肝臓を用いた組織染色の結果、野生型マウスとAhR欠損マウスとの間で発色に差が認められなかった。

(3) Minマウスの腫瘍形成に与えるAhRリガンドの役割

ヒト大腸がん組織、またApcMin/+マウスの腸に生じた腫瘍において、AhRは腫瘍実質細胞に多く認められた。腫瘍形成に与えるAhRリガンドの役割を検討するために必要となる実験動物を作成する目的で、腸上皮細胞特

異的にAhR発現をノックアウトされるvil-cre: AhR-floxマウスとApcMin/+マウスを交配させた。得られたマウスの遺伝子型を調べた結果、ApcMin/+: vil-cre: AhRfl/+の個体が生まれていることが示された。

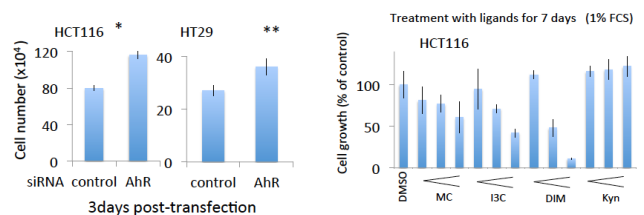


(4) AhR発現細胞の腸における機能

大腸がん細胞でAhR発現が増加していたことから、ヒト大腸がん細胞株を用いて、AhRの機能を検討した。

AhRは細胞増殖を抑制する

ヒト大腸がん細胞株HCT116ならびにHT29にsiRNAを導入してAhR発現をノックダウンさせた場合、またこれらの細胞の培地にAhRリガンド(メチルコラントレン、I3C、DIM、Kyn)を添加した場合の細胞増殖に与える影響を検討した。AhRに特異的なsiRNA導入後の細胞数は、control siRNAと比較して有意に増加した。またリガンド投与による細胞数は、濃度依存的に減少した。これらより、AhRは大腸がん細胞において細胞増殖を抑制する作用があることが示唆された。

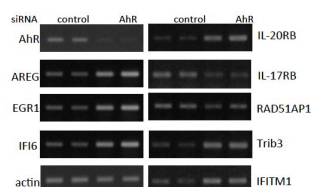
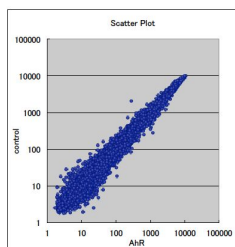


AhR標的遺伝子の検討

AhRによる細胞増殖抑制効果のメカニズムを検討するため、AhRノックダウンによって発現が変化する遺伝子をmicro arrayを用いて検討した。発現が2倍以上増加した遺伝子が17、1/2以下に減少した遺伝子が24であった。前者にはEGR1(2.64)やEGFファミリーの

amphiregulin (2.03)が含まれた。後者には heat shock protein family が含まれた。

AhR 発現抑制による遺伝子発現の変化
～RT-PCRによる解析～



AhR は細胞運動を調節する

AhR ノックダウンによる細胞増殖促進効果がみられたことから、同処理による細胞運動への影響についても検討した。AhR 特異的な siRNA を導入した HCT116 細胞を創傷治癒の実験系に用いた。この細胞はコントロールに比べて、創傷面積が速く修復された。その差は、fibronectin コートされたシャーレでより顕著にあらわれた。さらにリアルタイム細胞アナライザーを用いて検討した。AhR ノックダウン細胞は、ファイブロネクチン処理または 2.5% マトリゲル処理された基質上で、細胞運動の亢進が観察された。

細胞運動の調節に重要な Rho ファミリー分子について検討した。HCT116 細胞では、RhoA や CDC42 に比べ、Rac1 タンパクが多く検出された。GTP 結合型 Rac を検出するために GST-PAK PBD を大腸菌で発現・抽出し、GST pull-down assay をおこなった。AhR ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べて、活性型 Rac1 が多く検出された。

細胞運動を促進する要因について検討するため、細胞のシャーレへの接着性を比較した。トリプシン処理してシャーレから回収された細胞を氷上に 1 時間静置した後、ファイブロネクチンコートしたシャーレにまき、細胞の形態を経時的に観察した。AhR ノックダウン細胞は 1.5-3h 後に基質上に伸展する細胞が見られた一方で、コントロール細胞では 3h では付着する細胞はみられるものの、伸展

する細胞はわずかであった。自己リン酸化型 focal adhesion kinase は、AhR ノックダウン細胞に多く検出された。

これらより、AhR は細胞運動を負に制御する効果があることが示唆された。同時に細胞の接着や伸展にも影響がみられたことから、AhR の不活性化は Rho ファミリー分子の活性化を介して、細胞骨格の再編成を促している可能性がある。

(5) 炎症シグナルに対する腸上皮細胞の反応

IL-1 β による腸上皮細胞の増殖変化

AhR 欠損マウスに生じる盲腸腫瘍は、炎症の亢進が原因の一つと考えられた。炎症性サイトカインが腸上皮細胞の増殖に与える効果を検討するため、野生型マウスより得られた細胞の初代培養系を用いた。10% マトリゲルを含むコラーゲンゲルに細胞を懸濁し、EGF および Noggin 含有培地で 4 週間培養した後生じた organoid の大きさを ImageJ で測定した。コントロールに比べ、IL-1 β 添加培地ではオルガノイドのサイズは有意に増加し、腸上皮細胞の IL-1 β による増殖促進効果が示唆された。

I3C による CCL5 発現抑制の作用機序

緑黄色野菜に多く含まれる化学物質 (I3C) は AhR リガンドとして働く。I3C 含有飼料を摂取したマウス腸ではケモカインである CCL5 発現が低下することが示され、AhR の炎症抑制作用が示唆された。AhR による CCL5 mRNA 発現抑制の作用機序を検討した。

マウス大腸がん細胞をサイトカイン処理すると CCL5 mRNA が誘導され、I3C 前処理はこの応答を阻害した。AhR と炎症シグナルである NF κ B 経路との相互作用に着目し、この経路の阻害剤 BAY と I3C 作用を比較した。BAY 前処理は、I3C 同様に CCL5 誘導を阻害した。一方、BAY で観察された I κ B α タンパク分解の

阻害は、I3C ではみられなかった。NFκB p65 の核移行は、BAY で阻害されたが、I3C は影響しなかった。さらに NFκB レポーター活性は、BAY で低下したが、I3C 効果はなかった。マウス CCL5 遺伝子の転写開始点の 5' 上流に存在する NFκB および AhR/ARNT 結合配列を介した AhR と NFκB 相互作用の可能性について検討する必要がある。

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1件)

Ikuta T, Kurosumi M, Yatsuoka T, Nishimura Y (2016) Tissue distribution of aryl hydrocarbon receptor in the intestine: Implication of putative roles in tumor suppression. *Exp Cell Res* 343(2):126-34. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.03.012.

[学会発表](計3件)

Histochemical analysis of the intestinal aryl hydrocarbon receptor. Ikuta T., Yatsuoka T., Kurosumi M. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月(横浜)

腸における Ah レセプターの発現分布と細胞増殖に与える影響、生田統悟、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月(神戸)

Ah レセプターによる細胞運動の制御、生田統悟、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月(横浜)

6. 研究組織

(1)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・主任研究員

研究者番号：00262072

(2)連携研究者

小池亜紀 (KOIKE Aki)

量子科学技術研究開発機構

放射線医学総合研究所

加速器工学部

治療ビーム研究開発チーム

技術員

研究者番号：50415410