

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460568

研究課題名(和文) IL-21による炎症性大腸腫瘍発生機構の解明とその抑制

研究課題名(英文) IL-21-induced colitis-associated colorectal cancer

研究代表者

浅尾 裕信 (Asao, Hironobu)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：80250744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症は発がんの強い背景要因である。IL-21アイソフォームをT細胞特異的に発現させたマウス(Tg)に、炎症性大腸がんを誘導したところ、がんの発生が亢進した。IL-21はB細胞に対してAID発現を亢進し、抗体クラススイッチや突然変異を誘導する。そこで炎症性大腸がん発生に、IL-21によるAID誘導が関与する可能性を調べた。

発がん誘導Tgの大腸上皮細胞(IEC)において、AID発現が亢進する傾向があり、また、IL-21の直接刺激は分離したIECのAID発現を亢進させた。以上の結果より、IL-21が炎症状態にあるIECのAIDの発現を亢進させ、炎症性発がんを誘導している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is a strong background factor of carcinogenesis. When colitis-associated colorectal cancer (CAC) was induced in our Tg mice expressing IL-21 isoform specifically in T cells, the incidence of cancer increased. IL-21 enhances AID expression on B cells and induces antibody class switching and somatic hyper mutations. Therefore, the possibility that the induction of AID by IL-21 may be involved in the development of CAC was investigated. AID expression tended to increase in CAC-induced Tg colon epithelial cells (IEC) than in wild type mice, and IL-21 directly enhanced AID expression in isolated IEC. These results suggested that IL-21 may enhance the expression of AID in inflamed IEC and may induce CAC.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症性発がん サイトカイン インターロイキン21 AID

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患 Inflammatory Bowel Disease (IBD) は腸内細菌の変化や食物の欧米化などと共に近年増加傾向にある。IBD では炎症が慢性的に続く結果、大腸上皮に大腸炎関連腫瘍 (colitis-associated colorectal cancer) が発症し、この増加が問題となっている。この病態を把握し、より安全で効果的な IBD の治療法や腫瘍発生の予防法を開発することは大変重要な課題である。

抗原刺激を受けた CD4⁺ ナイブ T 細胞は、TGF- β や IL-6、IL-21、IL-23 存在下に Th17 細胞に分化し増殖する。IL-21 は活性化 CD4⁺ T 細胞や濾胞ヘルパー T 細胞などから産生されるが、活性化 CD4⁺ T 細胞の中でも Th17 細胞が IL-21 を産生し、炎症反応を促進する。事実 IBD では活性化した Th17 細胞が集積し、その組織内では IL-21 が高値を示している。

IBD の動物モデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎がある。IL-21 欠損マウスでは、DSS 大腸炎やその後の腫瘍発生が抑制されることが報告されている。私達は *in vivo* での IL-21 の機能解析のため、マウス IL-21 アイソフォーム (IL-21iso) 遺伝子導入マウス (IL-21isoTg) を作成した。IL-21iso は主に膜結合型のサイトカインで、分泌型の IL-21 とほぼ同様の機能を持つ。このマウスでは DSS 誘導性大腸炎が明らかに悪化した。さらに発がん誘発薬、azoxymethane (AOM) との併用により、大腸腫瘍の発生頻度や大きさが野生型マウス (WT) に比較して増大する。これらの結果から、IL-21 は IBD や炎症性腫瘍発生を促進させるサイトカインであることが推察された。

一方、IL-21 は活性化 B 細胞に作用し、クラススイッチや最終分化に関わるが、その際 Activation-induced cytidine deaminase (AID) を誘導することが報告されている。AID 発現は、その突然変異を導入する能力により、異所性に発現した場合、リンパ球系悪性腫瘍のみならず、IBD に伴う大腸腫瘍など、多くの炎症性腫瘍発生に関与するのではないかと注目されている。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、IL-21 は Th17 炎症細胞の分化・増殖による IBD 発症のみならず、大腸上皮細胞に直接作用し、AID の異所性発現を介して、炎症性腫瘍発生そのものに関わる可能性を考えた。そこで以下の 4 項目を研究の目的とした。

(1) 大腸上皮細胞での IL-21 受容体 (IL-21R) の発現様式を明らかにし、IL-21 が直接作用するのかどうかを明らかにする。

(2) IL-21isoTg で大腸腫瘍を誘導した際に、大腸上皮組織で AID の発現が亢進しているの

かどうかを確認する。

(3) IL-21 が大腸上皮細胞に対して直接作用し、AID の発現を亢進するのかどうかを明らかにする。

(4) IL-21/IL-21R 系を阻害することにより、IL-21isoTg での IBD や炎症性大腸腫瘍発生を *in vivo* で抑制することが出来るかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大腸上皮細胞の IL-21R 発現解析

マウス大腸癌細胞株やマウス大腸上皮細胞を分離し、IL-21R の発現を qRT-PCR 法により調べる。また、それぞれの細胞を IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-17 などの炎症性サイトカインで刺激して、IL-21R 発現におよぼす影響を調べる。なお、大腸上皮細胞を回収する方法として、大腸組織を培養液中で震盪し、上皮細胞を浮遊させ、遊離した細胞から CD45 陰性細胞をネガティブセレクションにて分離する。さらにその細胞からパーコール比重遠心法で上皮細胞分画を回収して解析する。

(2) 大腸組織や大腸上皮細胞での AID の発現解析

DSS 投与後、あるいは AOM+DSS 投与後の大腸組織や大腸上皮細胞を回収し、AID の発現を qRT-PCR 法にて解析する。

(3) 大腸上皮細胞での IL-21 による情報伝達解析

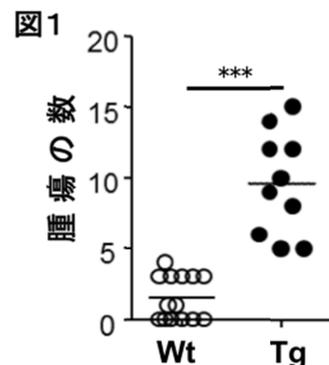
大腸上皮細胞を回収し、TNF- α 存在下に IL-21 で刺激し、細胞内情報伝達様式と AID の発現様式を解析する。また、これらの情報伝達が、マウス大腸がん細胞株でも起こるのかどうかを解析する。

(4) IL-21/IL-21R 系を阻害するために、抗マウス IL-21 中和抗体等を作成する。それらの抗体を *in vivo* に投与し、IL-21isoTg での IBD や炎症性大腸腫瘍発生を抑制することが出来るかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

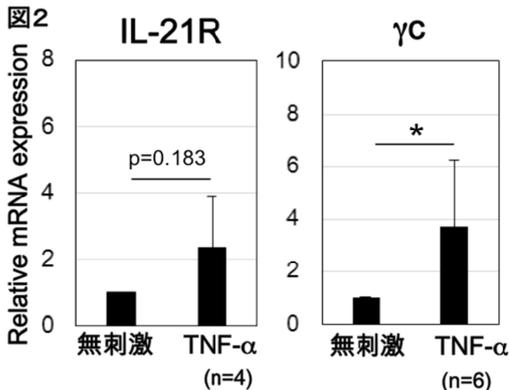
(1) IL-21isoTg での AOM+DSS による大腸腫瘍の発生

AOM を投与した後 1 週間後から DSS を 1 週間投与し、その 20 週後に大腸腫瘍の発生を確認した。IL-21isoTg では野生型と比べ、明らかに大腸腫瘍の発生頻度が上昇



していた(図1)。

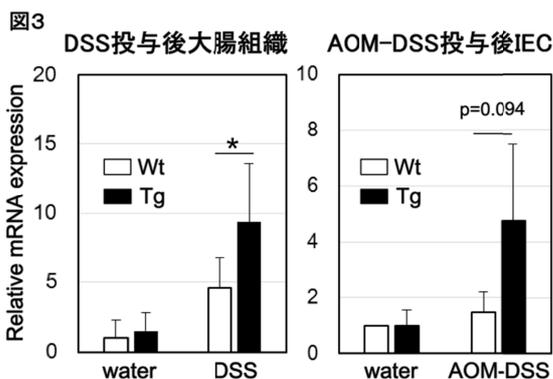
(2) 大腸上皮細胞での IL-21R 発現解析
分離したマウス大腸上皮細胞での IL-21R と c の発現を qRT-PCR 法により調べた結果、わずかに発現を認めたとが、その発現量は TNF-刺激により亢進することが確認された(図2)。



同様の結果はマウス大腸がん細胞株 Colon-38 細胞でも確認された。

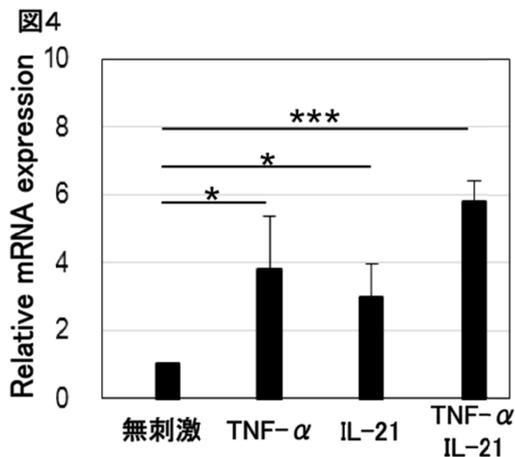
(3) 大腸組織や大腸上皮細胞での AID の発現解析

IL-21isoTg と野生型マウスに DSS を投与後、あるいは AOM+DSS 投与後の大腸組織あるいは大腸上皮細胞の AID の発現を qRT-PCR 法にて解析した結果、大腸炎発症後の IL-21isoTg において、野生型マウスよりも AID の発現が亢進していることが分かった(図3)。



(4) 大腸上皮細胞での IL-21 による情報伝達解析

大腸上皮細胞を IL-21 で刺激し、細胞内情報伝達をフローサイトメトリーで解析したところ、ERK1/2 の活性化が認められた。また、刺激後の ERK1/2 の CV 値 (Coefficient of Variation) が低下したことから、IL-21 による細胞内情報伝達分子の変化があることが分かった。この時の AID の発現を調べた結果、IL-21 は TNF- と共に直接大腸上皮細胞の AID を亢進させることがわかった。IL-21 による AID の発現亢進はマウス大腸がん細胞株の Colon-38 でも認められた(図4)。



(5) IL-21/IL-21R 系を阻害するための抗マウス IL-21 中和抗体等については、現在作成中であり、今後検討する予定である。

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7件)

Takeda Y, Shimomura T, Asao H, Wakabayashi I. Relationship between Immunological Abnormalities in Rat Models of Diabetes Mellitus and the Amplification Circuits for Diabetes. J Diabetes Res. 査読有, 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/4275851.

Akhter N, Takeda Y, Nara H, Araki A, Ishii N, Asao N, Asao H. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1/Redox Factor-1 (Ape1/Ref-1) Modulates Antigen Presenting Cell-Mediated T Helper Cell Type 1 Responses. J Biol Chem. 査読有, 291, 23672-23680, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.742353.

Takeda Y, Kato T, Ito H, Kurota Y, Yamagishi A, Sakurai T, Araki A, Nara H, Tsuchiya N, Asao H. The pattern of GPI-80 expression is a useful marker for unusual myeloid maturation in peripheral blood. Clin Exp Immunol. 査読有, 186, 373-386, 2016. DOI: 10.1111/cei.12859.

Tachibana H, Sho R, Takeda Y, Zhang X, Yoshida Y, Narimatsu H, Otani K, Ishikawa S, Fukao A, Asao H, Iino M. Circulating miR-223 in Oral Cancer: Its Potential as a Novel Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target. PLoS One. 査読有, 11(7):e0159693, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0159693.

Takeda Y, Marumo M, Nara H, Feng Z-G,

Asao H, Wakabayashi I. Selective induction of anti-inflammatory monocyte-platelet aggregates in a model of pulsatile blood flow at low shear rates. Platelets 査読有, 27, 583-92, 2016.
DOI: 10.3109/09537104.2016.1153616.

Takeda Y, Nara H, Araki A and Asao H; Human peripheral neutrophils express functional IL-21 receptors. Inflammation 査読有, 37, 1521-1532, 2014.
DOI: 10.1007/s10753-014-9879-0

Onoda T, Kanno M, Sato H, Takahashi N, Izumino H, Ohta H, Emura T, Katoh H, Ohizumi H, Ohtake H, Asao H, Dehner LP, Hill AD, Hayasaka K, and Mitsui T; Identification of Novel ALK Rearrangement A2M-ALK in a Neonate with Fetal Lung Interstitial Tumor. Genes Chromosomes Cancer 査読有, 53, 865-874, 2014.
DOI 10.1002/gcc.22199

[学会発表](計 15 件)

Nara H: Interleukin-21 has suppressive function in contact hypersensitivity. 16th International Congress of Immunology, 2016 August, Melbourne (Australia).

Akhter N: The Redox function of apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) modulates helper T cell response through antigen presenting cells. 16th International Congress of Immunology, 2016 August, Melbourne (Australia).

Takeda Y: IL-21 increases neutrophil migration into duodenum. 第 45 回日本免疫学会学術総会, 2016 年 12 月, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄.

荒木明美: 炎症性発がんにおける IL-21 の関与. 第 70 回日本細菌学会東北支部総会, 2016 年 8 月, 北里大学獣医学部, 十和田.

Takeda Y: Selective induction of monocyte-platelet aggregation in whole blood by inverting rotation. 23rd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. 2015 年 6 月, 伊藤国際学術研究センター, 東京.

Nara H: Interleukin-21 has suppressive function in contact hypersensitivity. 第 44 回日本免疫学会, 2015 年 11 月, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

Takeda Y: Selective induction of monocyte-platelet aggregate in whole

blood by inverting rotation. 第 44 回日本免疫学会, 2015 年 11 月, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

Akhter N: Apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) modulates T cell response through its redox function. 第 44 回日本免疫学会, 2015 年 11 月, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

Takeda Y: Regulation of granulocytic maturation on HL60 cell line by inflammatory cytokine combination. International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2014 年 6 月, 神戸商工会議所, 神戸.

Nara H: The role of interleukin-21 in allergic contact dermatitis. 第 43 回日本免疫学会, 2014 年 12 月, 国立京都国際会館, 京都.

Takeda Y: Regulation of GPI-80 expression and reactive oxygen species production by inflammatory cytokine combination during neutrophil differentiation. 第 43 回日本免疫学会, 2014 年 12 月, 国立京都国際会館, 京都.

[その他]

ホームページ情報:

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/lmm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅尾 裕信 (ASAO HIRONOBU)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 80250744

(2) 研究分担者

奈良 英利 (NARA HIDETOSHI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 00375338

(3) 研究分担者

武田 裕司 (TAKEDA YUJI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 90302299

(4) 連携研究者

浅尾 直樹 (ASAO NAOKI)
東北大学・理学系研究科・教授
研究者番号: 60241519

(5) 研究協力者

荒木 明美 (ARAKI AKEMI)
山形大学・医学部・技術専門職員