

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462009

研究課題名(和文)CACの発癌過程におけるSirtuinの関与

研究課題名(英文)Role of Sirtuins in the carcinogenesis of colitis-associated cancer

研究代表者

倉地 清隆 (Kurachi, Kiyotaka)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20397384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞株における炎症性サイトカイン刺激下のSirtuinファミリーの発現レベルの解析と下流蛋白のアセチル化解析では、各種Sirtuinの発現量に有意な変動はみられなかった。CAC発癌マウスモデルにおける大腸粘膜内Sirtuin発現レベルの解析では、各種Sirtuinの発現量に有意な変動はみられなかった。

ヒトCAC切除標本を用いた大腸粘膜内Sirtuin発現レベルの解析では、Sirt-1～7まで免疫染色にてSirt-1および7の発現がCAC症例において有意に低下していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：First, we assessed the Sirtuins expression level and acetylation level of its downstream target proteins in colorectal cancer cell lines after cytokine stimulation. However, these levels were not detected. In CAC mouse model, we analyzed the Sirtuins expression levels. However, the Sirtuins expression levels were not significantly different. Next, we analyzed the Sirtuins expression levels in surgically resected human CAC samples by immunohistochemistry. We found that the expression level of Sirt-1 and -7 were significantly suppressed in CAC.

研究分野：下部消化管外科

キーワード：炎症性腸疾患 発癌 低酸素 Sirtuin

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病など IBD の長期経過症例において、CAC の発生率が高くなってきており、IBD 患者の予後を左右する重要な合併症として临床上大きな問題となっている。

CAC 特有の発癌過程の中で、最も重要な役割を担っている因子は背景粘膜の炎症に起因する低酸素状態と言われている。炎症によって組織低酸素が発生する原因として、細胞の代謝亢進による代謝基質減少や、血栓症、組織間質圧上昇による酸素供給の低下、さらに組織内病原微生物の増殖による酸素分圧の低下などが考えられており、実際に IBD 切除検体における HIF1a、HIF2a の発現増加が確認されている。すなわち HIF1a、HIF2a の誘導により oncogenic signaling が活性化し、発癌に至る経路が CAC 発癌における最も重要な鍵となっていると考えられている。

低酸素下における HIF1a、HIF2a の転写活性調節にヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase :HDAC) が重要な役割を担っていることが報告されている。HDAC はクロマチン構造において主要な構成因子であるヒストンの脱アセチル化を行うことにより遺伝子の転写制御を行う酵素群である。Class III に属するものは Sirtuin ファミリーと呼ばれ、Histone だけでなく p53、HIF1a、NFkB、 β catenin など様々なタンパク質の脱アセチル化を行い、その機能を制御していることが知られている。近年この Sirtuin と低酸素、炎症、癌との関連に関する基礎的研究が進んでおり、Sirtuin は HIF1a に対して抑制的に働き、tumor suppressor として機能していることが示されている。散発性大腸癌の発癌過程において、sirt1 が tumor suppressor として機能していることや、Sirt1 による β catenin の脱アセチル化によって、腫瘍増殖が抑制されることが報告されている。

これらの報告から、Sirtuin の不活性化が発癌過程において重要な役割を担っていることが示唆される。CAC では背景粘膜に強い炎症が既に存在し、低酸素や代謝ストレス状態にあるため NAD⁺/NADH 比が低下し、Sirtuin が不活性化され、結果 β catenin や HIF1a、NKkB の活性化を誘導し発癌に至るといった経路が推測される。しかし、これまでに CAC の発癌における Sirtuin の関与について詳細に解析された報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、CAC 発癌過程において低酸素誘導因子 HIF1a、HIF2a の転写活性を負に制御するヒストン脱アセチル化酵素 Sirtuin が、低酸素下において腫瘍抑制的に機能している、という仮説のもと、Sirtuin の CAC 発癌における役割を明らかにすることを目的とする。さらに新しい治療標的としての Sirtuin の有用性を明らかにし、CAC に対す

る新たな発癌予防戦略の構築を目標とする。

3. 研究の方法

- ① 大腸癌細胞株における炎症性サイトカイン刺激下の Sirtuin ファミリーの発現レベルの解析と下流蛋白のアセチル化解析
- ② CAC 発癌マウスモデルを用いた、大腸粘膜内 Sirtuin 発現レベルの解析と上記下流蛋白のアセチル化解析
- ③ CAC 切除標本を用いた大腸粘膜内 Sirtuin 発現レベルの解析と上記下流蛋白のアセチル化解析
- ④ 動物モデルを用いた、Sirtuin activator による CAC の発癌予防効果の検証

4. 研究成果

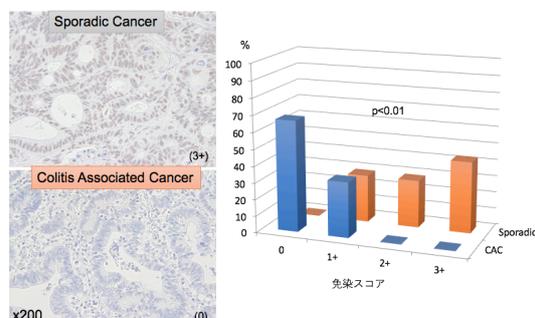
1) まず、大腸癌細胞株における炎症性サイトカイン刺激下の Sirtuin ファミリーの発現レベルの解析と下流蛋白のアセチル化解析を行った。大腸癌細胞株 (DLD1, SW480, HCT116) を培養し、TNF α 、LPS により一定期間刺激した後、細胞を回収。タンパク質、RNA、DNA を抽出。各種 Sirtuin の蛋白発現と mRNA 発現レベルをウェスタンブロット法および定量的 RT-PCR 法にて解析した。その結果、各種 Sirtuin の発現量はサイトカイン非刺激コントロールと比較して有意な変動はみられず、炎症性サイトカイン刺激下での Sirtuin ファミリーの有意な減弱は確認できなかった。

2) CAC 発癌マウスモデルにおける大腸粘膜内 Sirtuin 発現レベルの解析と上記下流蛋白のアセチル化解析を行った。6~8 週齢の C57BL/6 マウスを用い、azoxymethane (AOM; Sigma) を 10mg/kg の濃度で腹腔内投与。その後間欠的に 5 日間、2.5%DSS 含有水を 5 日間摂取させ、140 日後に犠死。大腸を採取、PBS にて洗浄後腫瘍数を測定後、正常粘膜、dysplasia および癌部を採取。蛋白、RNA、DNA 用に検体を分けてそれぞれ抽出を行い、各 Sirtuin の発現および標的蛋白のアセチル化の評価を行った。その結果、各種 Sirtuin の発現量は AOM 単独コントロール群と比較して有意な変動はみられず、マウスモデルでの Sirtuin 発現低下は確認できなかった。

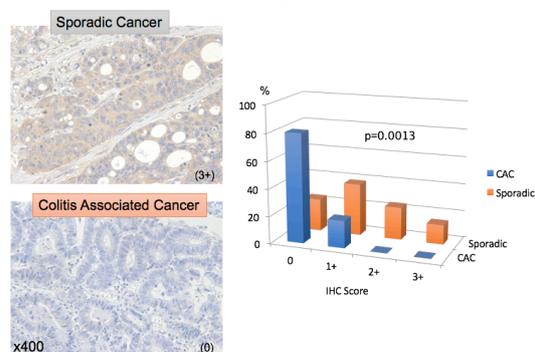
3) ヒト CAC 切除標本を用いた大腸粘膜内 Sirtuin 発現レベルの解析を行うため、浜松医科大学外科学第二外科および関連施設において過去に切除された CAC 症例の FFPE sample を用いて実験を行った。通常発癌による大腸癌症例 (Sporadic cancer) を対照とした。まず切除標本の HE 染色標本を詳細に観察し、正常粘膜、dysplasia、癌部を同定した。各部位における Sirtuin の蛋白発現レベルを免疫組織化学染色にて行った。Sirt-1~7 まで免疫染色を行ったところ、Sirt-1 および 7 の発現が CAC 症例において有意に低下

していることが確認された。また、HIF1 α の上皮細胞における核染色率を同様に免疫組織化学染色によって解析したところ、Sporadic Cancerと比較してCAC症例で有意な各染色陽性率の上昇がみられた。これらの結果から、CACの粘膜上皮は低酸素状態にあり、Sirt1,7の発現低下がHIF1 α の安定化、活性化に関与している可能性が示唆された。

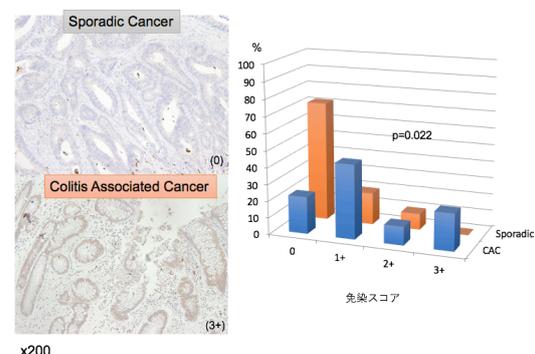
Sirt1 免疫染色



Sirt7 免疫染色



HIF1 α の上皮細胞における核染色



4) 次にSirtuin activatorによるCACの発癌予防効果の検証を試みた。Sirtuin activatorとして、レスベラトロールを用いた。上記CAC発癌モデルマウスを用いて、レスベラトロールを腹腔内投与。投与開始はAOM投与後70日目とし、140日目まで連日経口投与を行った。結果、レスベラトロールによる明らかなCAC発癌予防効果は確認することができていない。よりSirtuin1,7に特異的なSirtuin activatorを用いた発癌予防実験を行う必要があると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Colitis Associated Cancer における Sirtuin の発現解析.
第 115 回日本外科学会総会 2015.4. 名古屋
- ② Colitis Associated Cancer(CAC)の発癌過程における Sirtuin の関与.
第 69 回日本消化器外科学会総会 2014.07. 福島
- ③ Colitis Associated Cancer における Sirt7 の発現解析.
第 23 回日本がん転移学会学術集会 2014.7. 金沢
- ④ Colitis Associated Cancer (CAC)における Sirt7 の発現解析.
第 22 回日本消化器関連学会週間 2014.10. 神戸
- ⑤ Colitis Associated Cancer における Sirtuin の関与.
第 25 回消化器癌発生学会総会 2014.11. 福岡
- ⑥ Colitis Associated Cancer における Sirtuin の発現解析.
第 69 回日本大腸肛門病学会学術集会 2014.11. 横浜

[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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉地 清隆 (KURACHI, Kiyotaka)

浜松医科大学医学部・助教

研究者番号：20397384

(2) 研究分担者

今野 弘之 (KONNO, Hiroyuki)

浜松医科大学医学部・学長

研究者番号：00138033

山本 真義 (YAMAMOTO, Masayoshi)

浜松医科大学医学部附属病院・診療助教

研究者番号：70397420

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし