

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590162

研究課題名(和文)大腸がん新規薬物療法を目指したAhRリガンドの探索

研究課題名(英文) Investigation of AhR ligand for the new pharmacotherapy for prevention of colorectal cancer

研究代表者

椎崎 一宏 (Shiizaki, Kazuhiro)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：20391112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん発生に重要な役割を持つカテニンが、AhRによってリガンド依存的に分解されることが報告された。様々な大腸癌細胞株を用いてこれを検証したところ、AhRリガンド処理によるカテニンの分解は再現できなかった。AhRとカテニン、およびCUL4Bの結合はレポーターアッセイやツーハイブリッドアッセイによって確認できなかった。

一方、動物実験ではAhR-KOマウス盲腸での自然発がんは再現され、何らかのリガンドがAhRを活性化して発がんを抑制していると考えられた。改良酵母アッセイ系により、野生型マウスの盲腸内容物からAhRリガンド様活性が検出され、HPLCによる分析では複数の画分に活性が見出された。

研究成果の概要(英文)：It was reported that beta-catenin, which plays a critical role in the development of colorectal cancer, was degraded by aryl hydrocarbon receptor (AhR) in a ligand dependent manner. Confirmatory experiments of the relationship between AhR and beta-catenin were carried out in various colon cancer cell lines, but the beta-catenin degradation by AhR ligand treatment could not be observed. Furthermore, reporter assay and two-hybrid assay failed to identify the interaction between beta-catenin, CUL4B, and AhR.

On the other hand, the spontaneous tumorigenesis in AhR-deficient mouse cecum was reconfirmed. It was speculated that some kind of ligand activated AhR and prevented tumorigenesis in cecum. The AhR ligand-like activities were detected in cecal contents of wild-type mice by using improved yeast reporter assay system. By the HPLC analysis, AhR ligand-like activity was found in several fractions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学

キーワード：AhR -catenin 大腸がん リガンド CUL4B 盲腸

### 1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン受容体としても知られる核内受容体 AhR は、化学物質に対するセンサーであると考えられてきた。近年、核受容体を始めとした様々なタンパクと AhR とのクロストークが注目されており、その一つとして E3 ユビキチンリガーゼ構成因子としての AhR の働きが大竹らによって報告された (Ohtake F. et al. 2007 Nature)。また、AhR ノックアウト (AhRKO) マウスにおいて生後 8-10 週で全ての個体に盲腸がんが発生することが川尻らによって報告された (Kawajiri K. et al. 2009 Proc Natl Acad Sci U S A)。この報告 (以下、既報と呼ぶ) では大腸がんの発症に深く関係する  $\beta$ -catenin に対し、AhR はユビキチンライゲースである Cullin4B と共役して、その分解に寄与することが示された。この AhR による  $\beta$ -catenin 分解はリガンド依存的に行われることから、この経路を薬物で制御することで、大腸がんの新規薬物療法や予防法を開発できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

AhR を介した新規  $\beta$ -catenin 分解のメカニズムを大腸がんの予防・治療へ臨床応用するためには、安全で効果の高い AhR リガンドの開発が必要不可欠であると考えられる。そこで AhR による  $\beta$ -catenin 分解を測定する簡便な測定系を作成し、臨床応用可能な生体内または天然物由来の「安全な」物質から AhR リガンドを探索する。最終的に AhR リガンドを用いた大腸がんに対する新規薬物治療の道を拓くことを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) AhR リガンドによる  $\beta$ -catenin 分解系を western blot 法および、核に蓄積した  $\beta$ -catenin による TCF/LEF シグナルの変化を検証する。次に AhR の転写因子としての機能と、 $\beta$ -catenin 分解能にそれぞれ対応するヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系を構築する。これらのアッセイ系を用いて候補物質のそれぞれの AhR 機能に対する力価の比較を行う。

(2) AhR リガンドを検出する簡便な酵母レポーターアッセイを作成し、安全なリガンド候補物質を選出する。植物成分等の天然物、トリプトファン代謝物、既存医薬品等から AhR リガンド様活性を測定する。また、生体内物質として、マウス盲腸内容物から AhR リガンド様活性を持つ物質を分離し、動物細胞に対する効果を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 既報に従い大腸がん細胞、DLD-1 を用い、AhR リガンド曝露による  $\beta$ -catenin の分解を western blot 法にて、TCF/LEF シグナルの変化を TOPflash assay にて検討した。しかし、3-methylchoranthren (3-MC) やインドール酢酸 (IAA) を始めとした様々な AhR リガンドを

試行したものの、 $\beta$ -catenin の分解は全く再現できなかった (図 1)。

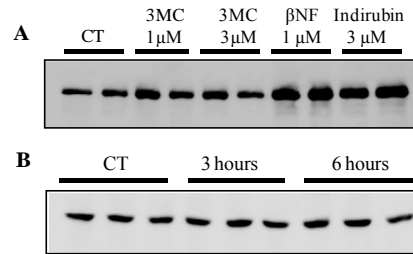


図1. DLD1細胞の $\beta$ カテニン量へのAhRリガンドの影響  
A) 様々なリガンドを曝露した3時間後の変化  
B) 3-MC 1 $\mu$ Mを曝露した後の継続的变化

次に、 $\beta$ -catenin 分解に先立って起こる AhR と CUL4B および  $\beta$ -catenin の結合を Yeast two-hybrid 法にて行ったところ、bait タンパクと prey タンパクの交換を含めた、全ての組み合わせにおいてこれらタンパクの結合を示す結果は得られなかった。Mammalian two-hybrid 法では恒常的活性化した変異  $\beta$ -catenin (S37A) の発現により bait ハイブリッドタンパクである AhR の転写活性化を高めた。しかし、これは従来から知られている  $\beta$ -catenin による AhR シグナルのエンハンサー様作用であると考えられた。また、免疫共沈法により  $\beta$ -catenin による AhR の結合を検討したが、リガンド依存的な結合を示すデータは得られなかった。 $\beta$ -catenin 分解に寄与するユビキチンリガーゼ、CUL4B への AhR 結合について Mammalian two-hybrid 法を用いて検討を行ったが結合を示すデータは見られなかった。CUL4B/AhR 結合の関連因子と考えられる DDB1、Arnt の付加的な共発現についても検討を行ったが、結合は認められなかった。

既報でのデータが全く再現できない原因は、DLD-1 細胞ロット間の AhR 発現量の差異に起因する可能性が考えられた。そこで、これら既報の in vitro における  $\beta$ -catenin 分解に関するデータを川尻要博士に提供した、大竹史明博士に使用した DLD-1 細胞の供与を求めたところ、既に廃棄したとの報告を受けた。このため、複数ロットの DLD-1 細胞を新たに入手し、AhR への応答性を XRE 依存的レポーターアッセイで検証したところ、全てのロットの細胞において AhR リガンドによるレポーター遺伝子の誘導が起こらず、誘導には外因性の AhR および Arnt の強制発現を必要とした (図 3)。ウェスタンブロット法による検討では、DLD-1 細胞ライセートからは AhR のバンドを検出することは出来なかった。これらのことから、本細胞は機能する AhR を発現しておらず、AhR リガンド曝露による  $\beta$ -catenin の分解という現象を本細胞で再現することは不可能であると考えられた。

そこで DLD-1 細胞以外の AhR を発現する大腸がん細胞 8 種 (HCT116、SW480、LoVo、Caco-2、Colo201、WiDr、LS174T、HT-29) について、 $\beta$ -catenin の分解について検討した。これら

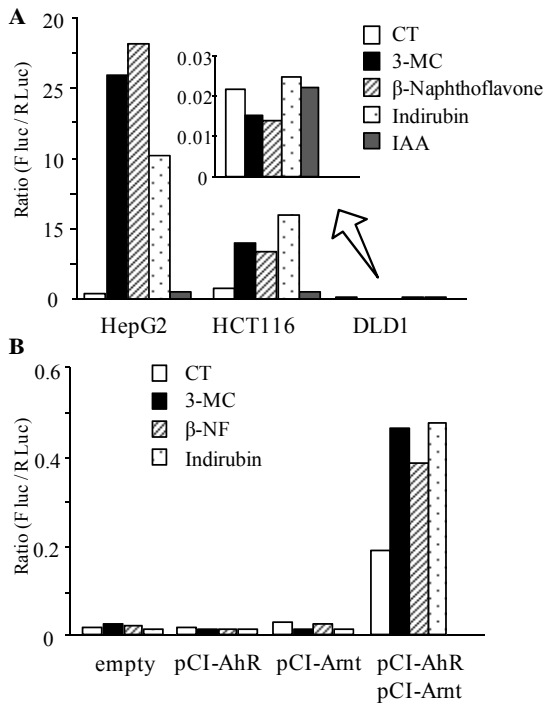


図2. XRE 依存性レポーターアッセイ (A) DLD1、HepG2、HCT116細胞での相違 (B) DLD1細胞におけるAhRおよびArntの発現の効果

の細胞は AhR を発現しており、AhR リガンド曝露による CYP1A1 の誘導が認められたが、 $\beta$ -catenin の分解は観察されなかった。DLD-1 細胞および HCT116 細胞から Tet-on 法による AhR 強制発現株を樹立して実験に用いたが、AhR リガンドによる  $\beta$ -catenin の分解は見られなかった。

これらの検証実験を行う過程で、AhR リガンド曝露による  $\beta$ -catenin の変化のデータを含む、複数の論文が発表されたが、その全てにおいて AhR リガンド曝露による  $\beta$ -catenin の減少は報告されていない (Braeuning A, et al.(2011) Toxicol Sci., Kasai S. et al.(2013) Biochim Biophys Acta., Jin U.H. et al.(2014) Mol Pharmacol.)。既報で効果の認められたインドール酢酸 (IAA) については、図 2 で示す通り、HepG2 細胞および HCT116 細胞においても AhR リガンドとしての作用が認められなかった。また、これら既報における  $\beta$ -catenin 分解のデータを作成した大竹史明博士が所属していた、東京大学の核内情報研究分野研究室は研究不正により 2013 年に閉鎖されてしまったことから、本現象を再現することは極めて難しいと考えられた。

(2) AhR-KO マウス盲腸での自然発がんを検証したところ、盲腸での腫瘍形成は既報どおりに再現された。盲腸内では何らかの AhR リガンドが産生されている可能性があり、それが AhR の活性化を介して発がんを抑制している可能性が高い。そこで、腸内細菌代謝物を対象にマウス盲腸内容物から AhR リガンドを単離することを試みた。また、腸内細菌叢を死

滅または変化させる目的で野生型マウスに 3 種の抗菌剤、クロラムフェニコール、カナマイシン、オメプラゾール (OME) を投与したところ、OME 投与群では盲腸で CYP1A1 が誘導される動物が認められた。他の抗生物質投与動物では CYP1A1 の上昇は見られなかった。そこで、通常飼育マウスおよび、オメプラゾール投与マウスの盲腸内容物を逆相カートリッジにて固相抽出した。これら生体サンプルのアッセイには転写共役因子の導入や細胞壁成分の改変等による高感度化を行った酵母レポーターアッセイを用いた。その結果、これらの盲腸内容物には AhR リガンド様活性が認められたため、HPLC による分画を行ったところ、通常動物盲腸内容物では複数の画分に活性がみられた。また、OME 投与動物盲腸からは OME 代謝物と考えられる活性が認められた。これら酵母アッセイで活性が認められた分画は、動物細胞 HepG2 や、OME に不応性である Hepa-1c1c に対しても AhR リガンドとしての活性を示した。

(3) AhR リガンドの探索材料として、トリプトファン代謝物のアッセイを改変酵母レポーターアッセイで行った。近年、トリプトファン代謝物であるキヌレニンが AhR リガンドとして T 細胞の分化に影響を与えることが報告されている。そこで、中間代謝物を含めたキヌレニン経路の各物質についてアッセイを行った。結果、キヌレニンは AhR リガンドとしての活性はトリプトファンと同程度しかなく、キヌレン酸およびキノリン酸に活性が認められた (図 3)。

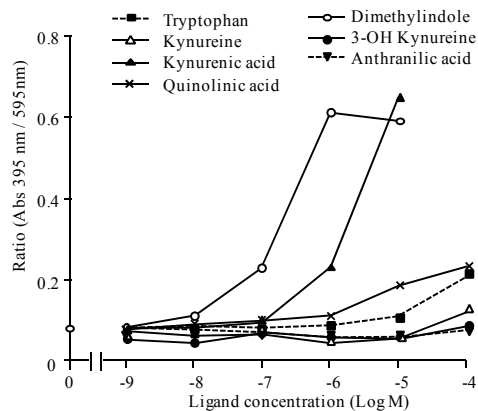


図3. 酵母レポーターアッセイによるトリプトファン代謝物のAhRリガンド活性

キヌレニン経路は Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) が律速酵素とされており、IDO は AhR の標的遺伝子であることから、この経路の制御にはキヌレニン酸を介する正のフィードバック機構のみが存在することになる。一方、組み換え CYP1A1 を含むミクロソームでキヌレニン酸を処理すると、リガンド活性は消失した。これらの結果により、キヌレニン経路の制御には CYP1A1 のキヌレニン酸代謝による負のフィードバック機構の存在が示唆された。

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 4 件)

1. Shiizaki K., Yoshikawa T., Takada E., Hirose S., Ito-Harashima S., Kawanishi M., Yagi T.. Development of yeast reporter assay for screening specific ligands of retinoic acid and retinoid X receptor subtypes. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 2014, 69 (3): 245-252. 査読有り

2. Shiizaki K., Ohsako S., Kawanishi M., Yagi T. Identification of amino Acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands. Mol Pharmacol. 2014 85(2):279-289. 査読有り

3. Ikuta T., Kobayashi Y., Kitazawa M., Shiizaki K., Itano N., Noda T., Pettersson S., Poellinger L., Fujii-Kuriyama Y., Taniguchi S., Kawajiri K. ASC-associated inflammation promotes cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. Carcinogenesis (2013) 34(7):1620-1627. 査読有り

4. Shiizaki K., Kawanishi M, Takashi Y. Dioxin suppresses benzo[a]pyrene-induced mutations and DNA adduct formation through cytochrome P450 1A1 induction and (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inactivation in human hepatoma cells. Mutation research (2013) 750(1-2):77-85. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 変異機構研究会 第 26 回夏の学校  
「アリール炭化水素受容体 (AhR) とキヌレニン経路でのトリプトファン代謝」  
椎崎一宏  
(2013 年 6 月愛知県一宮市アイプラザ一宮)

2. 変異機構研究会 第 25 回夏の学校  
「アリール炭化水素受容体 (AhR) とキヌレニン経路でのトリプトファン代謝」  
椎崎一宏  
(2012 年 7 月愛知県小牧市小牧勤労センター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称: 形質転換酵母、それを用いた分析方法および分析キット

発明者: 西本幸史、八木孝司、川西優喜、椎崎一宏 ほか

権利者: 長瀬産業株式会社 大阪府立大学

種類:

番号: 特許第 5226353 号

取得年月日: 平成 25 年 3 月 22 日

国内外の別: 国際特許

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎崎 一宏 (Shiizaki Kazuhiro)

独立行政法人 国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 20391112

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

生田 統語 (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

川尻 要 (Kawajiri Kaname)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・客員研究員

研究者番号: 50142112