

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460978

研究課題名(和文)大腸癌における上皮細胞増殖因子および腫瘍壊死因子関連新規分子標的遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of relationship between EGF and TNF-alfa-related novel gene in colon cancer cells

研究代表者

小笠原 尚高 (OGASAWARA, NAOTAKA)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00433219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍壊死因子(TNF-a)前駆体の細胞内ドメイン(TNF-a-NTF)の核移行抑制をターゲットとした潰瘍性大腸炎の抑制に関する検討を行った。IL-8によるADAM17の活性を介してTNF-a前駆体のsheddingが惹起されるが、酢酸によりADAM17の発現は抑制された。ADAM17の活性化によりTNF-a-NTFの核内移行が誘発されるが、アンジオテンシンII受容体拮抗薬の投与によりTNF-a-NTFの核内移行は阻止された。潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜組織においてTNF-a-NTFならびにADAM17は大腸上皮細胞に発現しており、潰瘍性大腸炎における炎症抑制に関するメカニズムの1つと推察された。

研究成果の概要(英文)：The translocation of tumor necrosis factor alpha (TNF-a) amino terminal fragment (TNF-a-NTF) in colon cells and tissues obtained from patients with ulcerative colitis was investigated. IL-8 induced ADAM 17 activation, resulting the shedding of proTNF-a, and acetate suppressed the activation of ADAM 17. The translocation of TNF-a-NTF into the cell nucleus was caused by the activation of ADAM 17. However, angiotensin II receptor blocker (ARB) suppressed the translocation of TNF-a-NTF into the cell nucleus. TNF-a-NTF and ADAM 17 were expressed in colon epithelial cells. The expression of ADAM 17 in colon epithelial cells of patients with ulcerative colitis were higher than that in normal colon epithelial cells. The inhibition of TNF-a-NTF nuclear translocation signaling will comprise a new strategy against the development of ulcerative colitis. TNF-a-NTF might become one of the targets of future strategies to treat ulcerative colitis.

研究分野：消化管

キーワード：腫瘍壊死因子 大腸癌 shedding ADAM 17 アンジオテンシンII受容体拮抗薬 潰瘍性大腸炎

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞増殖因子 (EGF) の前駆体 (heparin-binding EGF; HB-EGF) の shedding (細胞膜から放出) には ADAM10 の活性化が重要であり、ADAM10 の活性化は、IL- β や IL-8 などの炎症性サイトカインによって惹起されることが報告されているが、これまでの検討から酢酸などの短鎖脂肪酸によって ADAM10 の活性は抑制されることが判明した。また、過去の文献的報告などから、短鎖脂肪酸は大腸癌の発癌・進展を抑制する可能性が示唆されているが、その詳細なメカニズムについては現在まで証明されていなかった。短鎖脂肪酸が ADAM10 の活性を抑制することで、HB-EGF の shedding を停止させ HB-EGF の細胞内ドメイン (Carboxyl terminal fragment; HB-EGF-CTF) の核内移行を制御し、その結果として大腸癌の進展に関与する転写抑制遺伝子 ZFP-BA の発現を維持することが大腸癌の進展抑制に重要であると推察された。昨今、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患に対する治療として腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor α ; TNF- α) をターゲットとした分子標的治療がさかに行われるようになったが、TNF- α 前駆体の shedding を誘導し TNF- α の放出に深く関与する因子の一つが ADAM17 である。ADAM の活性化により、HB-EGF の shedding が惹起され HB-EGF-CTF が ZFP-BA を介し大腸癌の進展を誘導するのみならず、TNF- α 前駆体の shedding も惹起され、TNF- α を放出すると同時に TNF- α 細胞内ドメイン (TNF- α amino terminal fragment; TNF- α -NTF) が核内に移行する結果、その下流において炎症性サイトカイン等を誘導する因子が活性化されるものと推察される。近年、短鎖脂肪酸の受容体である G 蛋白質共役型受容体 43 (GPR43) による炎症制御機構が解明され注目されているが、現在までのところ、GPR43

を介した炎症制御機構は抑制的と促進的との両側面からの報告があり、特に大腸における炎症制御には GPR43 のみならず、ADAM の関与も推察される。

2. 研究の目的

ADAM 活性化経路における TNF- α -NTF の核移行抑制メカニズムを検討するとともに、TNF- α -NTF をターゲットとした炎症性腸疾患を制御する因子を検索する。また、潰瘍性大腸炎患者における炎症惹起と本経路との関連について検討する。

3. 研究の方法

(1) 【短鎖脂肪酸による ADAM 活性抑制の検討】

大腸癌培養細胞 (CaCo2, HT29) において、短鎖脂肪酸 (酢酸) による ADAM17 活性に対する影響を Western blot 法ならびに定量的 PCR 法で検討を行った。

(2) 【TNF- α -NTF の核内移行の解析】

大腸癌培養細胞 (CaCo2, HT29) 内での TNF- α -NTF の局在、IL-8 による shedding 誘導後における TNF- α -NTF の核内移行について蛍光免疫染色法を用いて検討した。

(3) 【DNA microarray による解析】

TNF- α -NTF 関連する転写抑制遺伝子の標的遺伝子を同定するため、大腸癌培養細胞 (CaCo2, HT29) において IL-8 により ADAM17 を活性化させた状態で mRNA を抽出した。また、その一方で、CaCo2 および HT29 において ADAM17 を siRNA によりノックダウンさせた状態で mRNA を抽出した。ADAM17 活性化状態とノックダウン状態の mRNA を microarray にて各種の遺伝子発現を検討した。

(4) 【マウスにおける ADAM17、TNF- α 細胞内ドメインならびに関連転写抑制遺伝子の検討】

マウス腸管における ADAM17 および

TNF- α -NTF の発現を検討するため、前処理をしていない C57BL/6 マウス（コントロールマウス）の大腸を摘出し、組織標本作製するとともにタンパクと mRNA を抽出した。また、C57BL/6 マウスに対し、2%DSS (Dextran sulfate sodium) を 5 日間自由飲水させ潰瘍性大腸炎モデル (DSS 腸炎マウス) を作成し、同様に大腸を摘出し、組織標本作製するとともにタンパクと mRNA を抽出した。

(5) 【特異抗体によるヒト大腸粘膜上皮における発現の検討】

TNF- α -NTF モノクローナル抗体ならびに ADAM17 モノクローナル抗体を用い、下部消化管内視鏡検査時に採取した潰瘍性大腸炎患者の生検ヒト大腸粘膜組織および手術摘出大腸組織において免疫染色を行い、大腸組織内における TNF- α -NTF と ADAM17 の局在について検討した。また、TNF- α -NTF および ADAM17 の発現と潰瘍性大腸炎患者の病勢との関連について検討を行った。

(6) 【TNF- α -NTF の核内移行抑制の検討】

大腸培養細胞 (CaCo2、HT29) を用い、ADAM 活性化因子である 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 20nM により ADAM17 を活性化させた後、TNF- α -NTF 抗体を用いて TNF- α -NTF の細胞内局在を蛍光顕微鏡で確認した。また、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (Angiotensin II Receptor Blocker ; ARB) の投与後、TPA 刺激を行い、TNF- α -NTF の細胞内局在を蛍光顕微鏡で確認した。

4. 研究の成果

(1) 【短鎖脂肪酸による ADAM 活性抑制の検討】

CaCo2 および HT29 に酢酸 (50mM、100mM) を投与したところ、Western blot 法にて ADAM17 の発現が容量依存的に抑制された (図 1)。また、定量的 PCR 法においても同様に ADAM17 の発現が容量依存的に抑制

されることが確認された。CaCo2 および HT29 に酢酸 (50mM、100mM) を投与したのち、IL-8 を投与したところ、IL-8 による ADAM17 の活性は、酢酸により発現抑制された (図 2)。また、定量的 PCR 法においても同様に ADAM17 の発現が容量依存的に抑制されることが確認された。

図 1

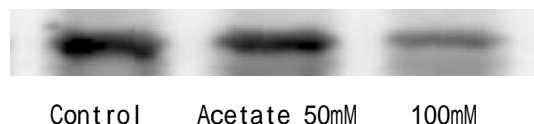
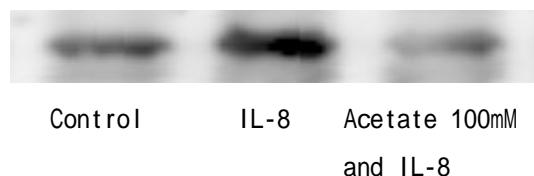


図 2



(2) 【TNF- α -NTF の核内移行の解析】

前処理のない状態での CaCo2 ならびに HT29 における TNF- α -NTF の局在は細胞膜であるが、IL-8 により ADAM17 の活性を亢進させ TNF- α 前駆体の shedding 誘導したところ、TNF- α -NTF は核内へ移行することが蛍光顕微鏡にて確認された (図 3)。CaCo2 および HT29 に酢酸 (100mM) を投与したのち、IL-8 を投与したところ、TNF- α -NTF の核内移行が抑制された (図 4)。

図 3

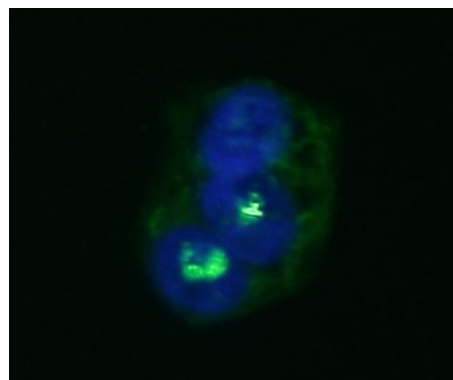
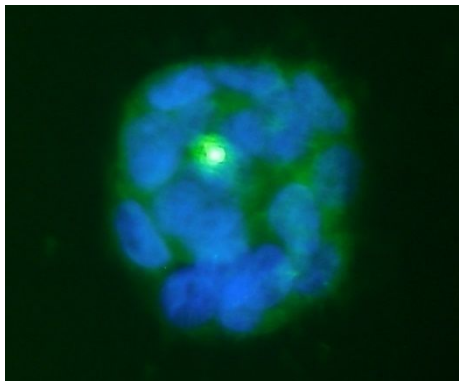


図 4



(3) 【DNA microarray による解析】

ADAM17 のノックダウン状態では、CDKN2A (サイクリン依存性キナーゼ阻害 2A;p16) と MCL1 の 2 つの遺伝子の発現が著明に増加していた。CDKN2A は、癌抑制遺伝子の一つである。また、MCL1 は、アポトーシス抑制遺伝子の一つであるが、いずれの遺伝子においても、炎症のメカニズムにおけるその役割は今のところ不明な点が多く、今後の研究により、炎症のメカニズムにおける CDKN2A ならびに MCL1 の機能を解明する必要があるものと考えられるが、今回の検討の結果から、MCL1 はアポトーシス抑制以外に、炎症の発生・増悪に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(4) 【マウスにおける ADAM17、TNF- α 細胞内ドメインならびに関連転写抑制遺伝子の検討】

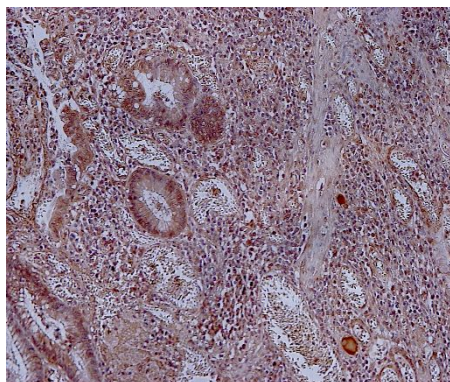
DSS 腸炎マウスでは、コントロールマウスに比べ、ADAM17 の mRNA およびタンパク発現が増加していたが、TNF- α -NTF の mRNA およびタンパク発現に両群で差を認めなかった。また、マウス大腸組織において、ADAM17 および TNF- α -NTF の免疫染色を行い、それらのマウス大腸上皮細胞における局在を検討したところ、ADAM17 および TNF- α -NTF のいずれにおいても、それらの細胞内および腸管壁での局在に両群で差を認めなかった。Microarray による解析の結果から TNF- α -NTF に関連する因子 CDKN2A ならびに

MCL1 の mRNA 発現を検討したところ、コントロールマウスと比べ DSS 腸炎マウスにおいて CDKN2A および MCL1 の mRNA 発現は有意に増加していた。

(5) 【特異抗体によるヒト大腸粘膜上皮における発現の検討】

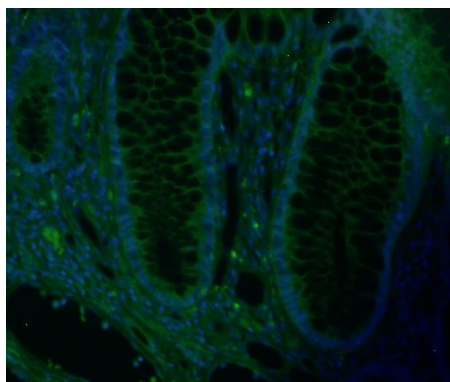
下部消化管内視鏡検査あるいは手術にて採取された潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜組織において、TNF- α -NTF ならびに ADAM17 は大腸上皮細胞に発現していた (図 5)。

図 5



一方、下部消化管内視鏡検査時に採取したヒト正常大腸粘膜上皮における免疫染色では、TNF- α -NTF ならびに ADAM17 は、潰瘍性大腸炎患者と同様に大腸上皮細胞の細胞膜に発現していたが、その発現レベルは、潰瘍性大腸炎患者の大腸癌組織と比べ、きわめて微弱な発現であった (図 6)。

図 6



潰瘍性大腸炎患者における活動指数の一つである Mayo Score と、TNF- α -NTF ならびに ADAM17 の発現との関連を検討したところ、Mayo Score が高いほど ADAM17 の発現が強い傾向があったが、統計学的な有意差は認められなかった。また、今回の検討では、TNF- α -NTF の発現と Mayo Score との関連性は認められなかった。さらに、同様に採取された大腸粘膜組織を用い、ADAM17 の mRNA とタンパク発現を比較したところ（定量 PCR およびウェスタンブロット法）、潰瘍性大腸炎患者における大腸粘膜組織における ADAM17 の mRNA とタンパク発現に比べ、正常大腸粘膜組織では有意にその発現の低下が認められた。

(6) 【TNF- α -NTF の核内移行抑制の検討】
12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 20nM により ADAM17 を活性化させた後、TNF- α -NTF 抗体を用いて TNF- α -NTF の細胞内局在を蛍光顕微鏡で確認したところ、TNF- α -NTF は核内において発現していた（図7）。一方、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（Angiotensin II Receptor Blocker ; ARB）の投与後、TPA 刺激を行った場合、TNF- α -NTF は、細胞膜あるいは細胞質に発現しており、ARB にて TNF- α -NTF の核内移行が抑制された（図8）。

図7

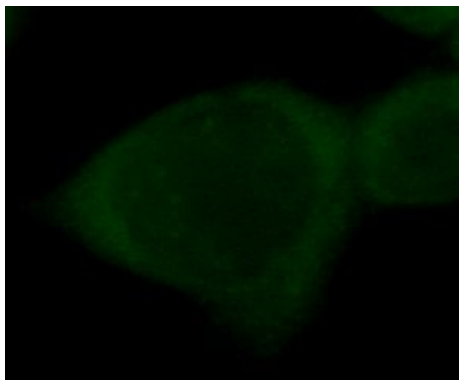
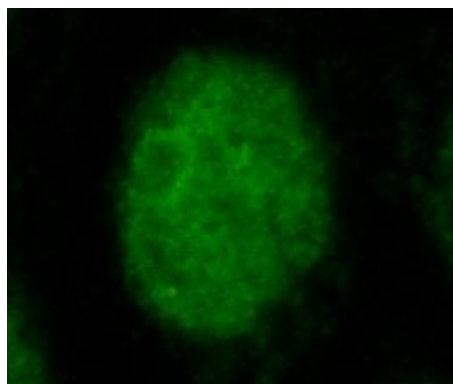


図8



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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 尚高 (OGASAWARA Naotaka)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00433219