

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21288

研究課題名(和文) プロスタグランジントランスポーターをターゲットとした潰瘍性大腸炎の発癌リスク診断

研究課題名(英文) Diagnostics of carcinogenic risk in ulcerative colitis targeting a prostaglandin transporter

研究代表者

大谷 恒史(Otani, Koji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30597555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸の炎症発癌におけるCOX-2、PGE2代謝酵素である15-PGDH、細胞内への膜輸送担体であるPGT、外向輸送を司るMRP4の発現動態について検討した結果、発癌部位においてはCOX-2、MRP4の発現亢進および15-PGDH、PGTの発現低下が見られ、大腸癌細胞内のPGE2含有量は増加していた。PGTの発現およびPGE2含有量は炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ によって調節され、またPGTと15-PGDHの間には機能連関が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin (PG) E2 promotes gastrointestinal carcinogenesis. The total amount of active PGE2 is regulated by the PG biosynthesis and degradation pathways which include cyclooxygenase-2 (COX-2: PG synthase), 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH: catabolic enzyme of PG), PG transporter (PGT: influx transporter), and multidrug resistance associated protein 4 (MRP4: efflux transporter). We examined the expression of PGT, which transports PG into cell for its metabolic degradation, and the other molecules in colitis-associated carcinogenesis. Increased expression of COX-2 and MRP4 and decreased expression of 15-PGDH and PGT were observed in colon cancer part, and PGE2 content in colon cancer cell was elevated. PGT expression and PGE2 content were regulated by TNF- $\alpha$ , and it was suggested that there was a function linkage between PGT and 15-PGDH.

研究分野：炎症、癌、小腸、内視鏡

キーワード：炎症発癌 プロスタグランジントランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

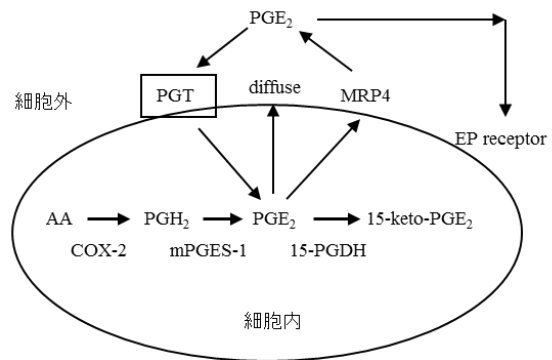
近年粘膜の慢性炎症を母地とする発癌メカニズムが注目されている。炎症性腸疾患として知られる潰瘍性大腸炎は、数ヶ月から数十年の経過で再燃と緩解を繰り返し、その間に粘膜細胞の DNA 損傷を引き起こし、最終的に大腸癌に進展していく。実際、10年以上再燃と緩解を繰り返している潰瘍性大腸炎患者の大腸癌の発生リスクは約 20 倍に上昇するとされているが、潰瘍性大腸炎からの発癌リスクや予後を推測できる有力なバイオマーカーは存在しないのが現状である。

アラキドン酸の代謝産物である prostaglandin (PG) は全身の臓器で産生され、炎症や免疫など生体防御の重要な調節分子としての役割を果たしているが、最近の研究では PG が炎症の調節分子としてのみでなく、癌の発生、増殖、浸潤および転移を促進することが知られている。さらに PG 合成酵素である cyclooxygenase (COX) が癌組織で発現していること、アスピリン、非ステロイド系抗炎症薬が COX を阻害して PG の一つである PGE<sub>2</sub> の合成を抑制し、消化管をはじめ様々な部位の癌の発生を抑制することが分かってきている。

これまで PG による発癌機序についての研究は、主に合成酵素の COX に焦点が当てられてきたが、代謝酵素である 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) の活性低下が生じても活性型 PGE<sub>2</sub> の総量が増加し、発癌を促進させると考えられる (Mann JR et al. Cancer Res, 2006)。また PGE<sub>2</sub> は細胞内で合成された後、能動的な膜輸送システムによって細胞外に放出されて一部は細胞表面の EP 受容体に結合し epidermal growth factor receptor の刺激を介して細胞増殖を活性化するが、結合しなかった PGE<sub>2</sub> については細胞内に再度取り込まれて不活化される。PGE<sub>2</sub> の細胞内への膜輸送を行うのが、細胞膜表面に存在する

prostaglandin transporter (PGT) であり、PGE<sub>2</sub> の癌における動態を説明する上で、PGT の生物学的機能の解明が不可欠である。

このように癌の発生過程においては PG 輸送・代謝経路全体が関与していることが予想されるが、大腸の炎症発癌における PGT の役割は不明である。



## 2. 研究の目的

慢性炎症からの大腸発癌において癌の発生や増殖に PGE<sub>2</sub> が中心的な役割を果たしていることを踏まえて、本研究では PG 輸送・代謝経路における PGE<sub>2</sub> のトランスポーターである PGT に焦点を当ててその発現と役割について検討し、癌における PGE<sub>2</sub> 輸送・代謝過程に関与する分子の全体像を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸炎症発癌における PGT の発現と役割

PGT の大腸炎症発癌マウスモデルを作成し、*in vivo* において腫瘍部位における PGT の発現および PGE<sub>2</sub> の含有量を検討する。8 週齢の C57BL/6J マウスを用いて azoxymethane (12 mg/kg) を腹腔内投与し、14 日目から 21 日目と 35 日目から 42 日目に 3% dextran sulfate sodium を自由飲水させて大腸炎症発癌モデルを作成し、56 日目に屠殺して腫瘍部位と正常部位において PGT の発現動態 (western blot 法、real-time RT-PCR 法、免疫組織化学染色法)、PGE<sub>2</sub> 含有量 (ELISA 法) を比較検討する。

(2) 炎症に伴うサイトカインシグナルが PGT の発現に及ぼす影響

大腸癌細胞を使用して PGT を強発現あるいはノックダウンして、*in vitro*における PGT の癌細胞の増殖に及ぼす影響について検討する。まずヒト樹立大腸癌細胞株である HT-29、SW480 を使用し、各細胞の PGT タンパクをコードする PGT mRNA の発現程度を RT-PCR によって調べる。次に PGT 遺伝子を強発現あるいはノックダウンして、15-PGDH の発現が変化するかを調べ、PGT と 15-PGDH の間に機能連関が存在するかを調べる。

炎症粘膜からの発癌経路である dysplasia-carcinoma sequence については不明な点が多いが、早期より p53 遺伝子変異が起こり、炎症に伴って産生される TNF- $\alpha$  のサイトカインシグナルによって前癌細胞からの腫瘍の発育・増殖が誘導されと考えられている。そこで大腸癌細胞の培養上清に TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) を添加し、大腸癌細胞内の PGT、PGE<sub>2</sub> 含有量、下流の NF- $\kappa$ B 経路の標的分子が TNF- $\alpha$  のサイトカインシグナルに伴ってどのように変化するかを検討する。

(3) 潰瘍性大腸炎からの炎症発癌における PGT の役割

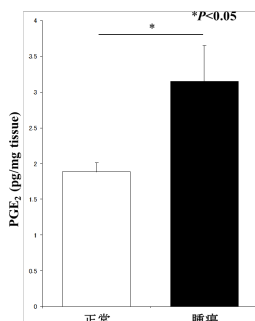
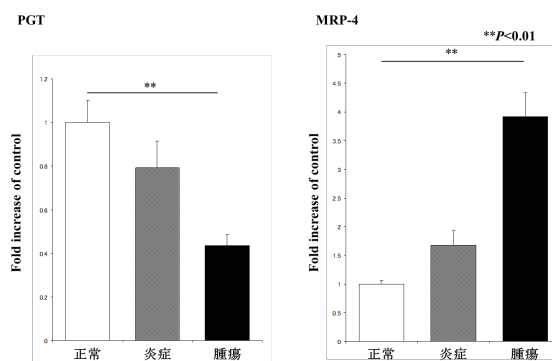
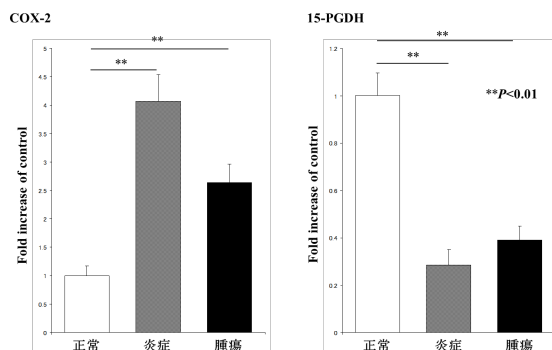
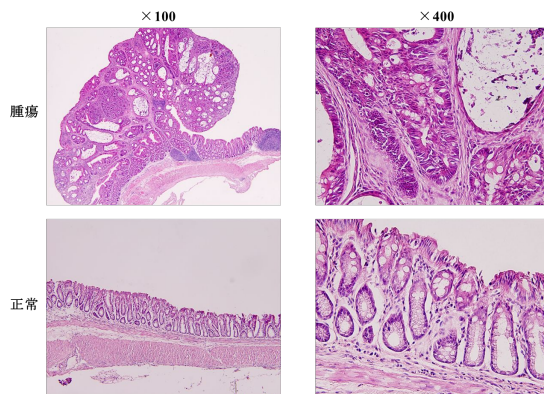
PGT 遺伝子のプロモーター領域に BGS プライマーを設計し、外科切除で得られた潰瘍性大腸炎からの炎症発癌組織を用いて、正常組織と癌組織からの PCR 産物をシークエンスし、それぞれの CpG 部位のメチル化の頻度を定量的に評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 大腸炎症発癌における PGT の発現と役割

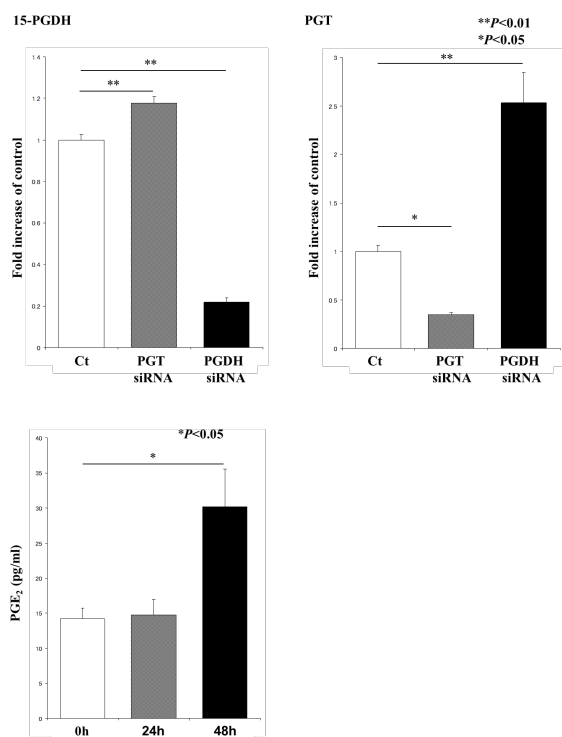
炎症部位および腫瘍部位における PGE<sub>2</sub> 誘導酵素である COX-2、PGE<sub>2</sub> 代謝酵素である 15-PGDH、細胞内への膜輸送担体である PGT、外向輸送を司る multidrug resistance associated protein (MRP) 4 の発現動態について、real-time RT-PCR 法を用いて検討した。

腫瘍部位においては COX-2、MRP4 の発現亢進および 15-PGDH、PGT の発現低下が見られた。さらに western blot 法と免疫組織化学染色法で検討した結果、大腸癌部位においては PGT の発現は低下していた。ELISA 法を用いて大腸癌部位における PGE<sub>2</sub> 含有量を測定した結果、細胞内の PGE<sub>2</sub> 含有量は増加していた。



(2) 炎症に伴うサイトカインシグナルが PGT の発現に及ぼす影響

ヒト樹立大腸癌細胞株 SW480、HT29 細胞の PGT 遺伝子を siRNA によってノックダウンすると 15-PGDH の発現は増加し、一方で 15-PGDH 遺伝子を siRNA によってノックダウンすると PGT の発現は増加した。これらのことから PGT と 15-PGDH の間には機能連関が存在することが示唆された。また SW480、HT29 細胞の培養上清に TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) を添加した結果、PGT の発現の低下とともに大腸癌細胞内の PGE<sub>2</sub> 含有量は増加し、I $\kappa$ B のリン酸化および NF $\kappa$ B の核内移行が生じた。



以上の結果より、大腸の炎症発癌部位においては COX-2 の発現上昇、15-PGDH の発現低下とともに、PGE<sub>2</sub> の不活化に働く PGT の発現低下が起こり、PGE<sub>2</sub> 量が増加することによってさらなる癌の発育・増殖が起こるものと考えられた。

また慢性炎症に伴って誘導される TNF- $\alpha$  が PGT 発現の調節分子として機能し、PGT の変化と同時に NF $\kappa$ B 経路の標的分子も変化することが示された。

本研究ではさらに外科切除で得られた潰瘍性大腸炎からの大腸癌組織を用いて、炎症発癌部位においては PGT 遺伝子のプロモーター領域に高度なメチル化が見られ、このメチル化によって PGT 遺伝子の転写がストップし、PGT の発現が抑制されていることを証明する予定であったが、潰瘍性大腸炎からの炎症発癌をきたした症例が少なく、研究期間内には間に合わなかった。今後も引き続き症例を蓄積して検討を行っていくつもりである。

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 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

大谷 恒史 (OTANI, Koji)  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
 研究者番号: 30597555

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし