

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05500

研究課題名(和文) MIF抑制物質としてのコーヒーポリフェノールは炎症性発癌を抑制するか？

研究課題名(英文) Does coffee polyphenol inhibit the level of MIF and the development of inflammatory carcinogenesis.

研究代表者

大川原 辰也 (Ohkawara, Tatsuya)

北海道大学・薬学研究院・研究員

研究者番号：00374257

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)：炎症性大腸腫瘍モデルマウスにおいて、大腸組織においてマクロファージ遊走阻止因子の発現が増強していた。アズキシメタン及びデキストラン硫酸ナトリウム投与による炎症性大腸腫瘍でマクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスにおいて腫瘍発生が抑制されていた。抑制機構として酸化ストレスやシクロオキシゲナーゼ活性抑制の可能性が考えられた。コーヒーポリフェノールの成分であるクロロゲン酸はマウス組織のマクロファージ遊走阻止因子の発現を抑制した。またクロロゲン酸は単球系細胞株のMIF分泌を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は未だその役割が解明途上のマクロファージ遊走阻止因子の新たな機能解析が明らかになったこと、特に炎症・発癌機構での役割の機能解析が進んだことが学術的な意義である。マクロファージ遊走阻止因子は未だその活性や発現を制御するような臨床開発が進まず、その中で本研究によりコーヒー成分の一つがその候補となる可能性を示唆することができたのは社会的な意義を持つといえる。

研究成果の概要(英文)：The role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in inflammatory colorectal carcinogenesis and the effects of coffee polyphenol components on the regulation of MIF expression were analyzed. We found that the expression of MIF was enhanced in colorectal tissue in colorectal cancer model. Especially, it was extremely high expression in colorectal tumor cells. MIF-deficient mice presented the reduction of colon tumors in this model compared with wild type mice. Moreover, there was a tendency to decrease oxidative stress and cyclooxygenase expression in the colon tissues of MIF-deficient mice compared with wild type mice. Chlorogenic acid also suppressed MIF secretion in murine macrophage cell-line.

研究分野：免疫学

キーワード：マクロファージ遊走阻止因子 コーヒーポリフェノール クロロゲン酸 炎症 大腸腫瘍

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症から発生する癌は通常の癌の発生とは異なり近年注目されてきている。しかし、その発生機序は十分に解明されず、診断・治療・予防法については未だ確立されていない。さらに炎症性腸疾患は慢性炎症が持続する難治性の消化管疾患であり、本邦でも炎症性腸疾患患者は増加し、合併症である炎症性大腸癌も増えている。炎症性大腸癌の発生機序について様々な議論が交わされているが予防・治療法の見当がつかないのが実情である。

コーヒーによる健康増進・病状の改善は近年盛んに報告されてきており、その科学的根拠を示すためコーヒーの成分の解析も進んできた。コーヒーにはポリフェノールが多く含まれており、特にクロロゲン酸やカフェイン酸の効果が注目されている。クロロゲン酸やカフェイン酸は癌発生の抑制、病原性細菌の増殖抑制、そして炎症抑制の作用が細胞・動物実験で明らかにされた。さらに抗酸化ストレス作用、抗変異原性作用およびメタロプロテイナーゼ活性の抑制作用も報告され、クロロゲン酸やカフェイン酸による炎症性発癌の抑制効果も期待される。消化器疾患の研究においてはクロロゲン酸やカフェイン酸が食道炎や肝炎を改善することが報告されている。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患や炎症性大腸癌においてマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割を解明するとともにコーヒーポリフェノールの主要成分であるクロロゲン酸、カフェイン酸に注目し、それらが MIF を含めた炎症・発癌因子にどう影響し、そして炎症性発癌を抑制する可能性があるかを調べた。

3. 研究の方法

(1) マウスにおける炎症性大腸癌モデルでの MIF の役割の解析

マウスに 20mg/kg のアズキシメタンを 1 回腹腔内投与した後、2%DSS 水溶液を一週間経口摂取 (自由飲水) させ、2~3 ヶ月後に大腸組織を採取した。そこで腫瘍の最大径、数を計測し組織標本を作製した。組織標本はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、組織学的所見 (炎症、異形成、腫瘍増殖) を観察した。このモデルについて MIF ノックアウトマウスで上の項目について解析した。また腫瘍発生部位の MIF 免疫染色や免疫細胞の染色を行った。マウス大腸組織を摘出し、酸化ストレスマーカーであるニトロチロシンで標本を染色した。凍結組織からシクロオキシゲナーゼ発現をウエスタンブロッティング法で解析した。凍結組織から Affimetrix Gene Tip にて網羅的に遺伝子発現の解析を行った。さらにクロロゲン酸およびカフェイン酸の投与による MIF 抑制効果の検証を行った。40mg/kg 体重の量のクロロゲン酸、カフェイン酸を腹腔内投与し組織を採取後 MIF 発現を ELISA 法にて解析した。

(2) 炎症性大腸癌モデル細胞培地におけるクロロゲン酸およびカフェイン酸添加による炎症関連因子・癌関連因子および MIF の解析

単球系細胞株 (RAW263.4 細胞) を 96well プレートで数日培養した後、30 mg/well のクロロゲン酸を添加した。その 1 時間後に様々な濃度のリポポリサッカライドを添加し、24 時間培養した。その状態の培地を回収し、MIF 及び TNF α の濃度を ELISA 法で解析した。

4. 研究成果

(1) アズキシメタン及びデキストラン硫酸ナトリウム水溶液投与による大腸組織における MIF の発現

MIF 活性をコントロールすることで他の炎症や発癌に関与する分子が変化することを検証した。MIF を欠損させたノックアウトマウスにおいて大腸組織に発生した腫瘍では腫瘍径は小さくなり、単一の腸管からの発生数 (図 1) も少なかった。また、炎症発生および進展とともに野生型マウスではみられる単球系、リンパ球系の免疫細胞の腸管粘膜への浸潤がほとんど見られなくらい抑制されていたが、その後の経過で炎症性発癌を起こした腸管組織の腫瘍部位の根部に単球の浸潤が著明にみられていたのが、ノックアウトマウスのがん発生部位においてはそれらの浸潤の程度の差は有意な差ではなかった。炎症性発癌物質を投与したマウスの腸管においてシクロオキシゲナーゼ発現の程度をタンパクレベルで検証した。COX-1 については発現の差は見られなかったが、COX-2 においては野生型と比べてノックアウトマウスの腸管組織では発現の抑制傾向がみられた。そして酸化ストレスであり、本モデルにおいて炎症性発癌の補助的な判断基準として用いられるニトロチロシンのタンパクレベルでの発現および局在は、野生型マウスのモデルにおいては腸管上皮および発生した腫瘍に強く発現がみられた (図 2) が、ノックアウトマウスにおいてはその発現は減弱していた。さらにデキストラン硫酸ナトリウム水溶液投与によってマウス大腸組織への誘導が抑制された分子を網羅的に解析したが、10 倍以上の変化を示したのが 1532 種の因子も認められた。特に 1000 倍近くの変化を見せた遺伝子として Beta-microseminoprotein、Palmitoyl protein thioesterase-like protein (Vpp1)、Experimental autoimmune prostatitis antigen 1 (Eapal)、Apolipoprotein F、Cytochrome P450 であった。

また、コーヒーポリフェノールとして認識されているクロロゲン酸を腹腔内投与し MIF 発現への影響を解析したところマウスにおいてその発現誘導を抑制する傾向がみられた。

図1. 肉眼的所見

	Wild type	MIF KO
Incidence(%)	100	16
Multiplicity (mean \pm SD) (no. of tumors)	7.6 \pm 3.8	0.7 \pm 0.7


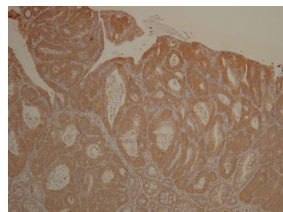


図2. Nitrotyrosine染色



AOM+DSS投与18週後 大腸組織(腫瘍部)

(2) LPS 刺激下での単球系免疫細胞へのクロロゲン酸投与による MIF 分泌の変化

LPS を様々な濃度で投与し 24 時間後の培養液の MIF 濃度を ELISA にて測定した。LPS 投与により MIF はやや安定を欠きながらもその分泌が増加しているように見えた。クロロゲン酸を LPS 投与 1 時間前に投与したところ、投与群では培養液中の MIF 濃度が低下していた。クロロゲン酸容量依存性かどうか解析したが実験毎のデータに安定性を欠き容量依存性を断定できなかった。LPS を様々な濃度で投与し 24 時間後の培養液の TNF- α 濃度を ELISA にて測定した。LPS 投与により TNF- α 濃度は著明に上昇した。クロロゲン酸を LPS 投与 1 時間前に投与したところ、クロロゲン酸投与群では培養液中の TNF- α 濃度が有意に低下していた。またクロロゲン酸投与量を増やすことにより TNF- α 濃度はさらに低下傾向を示した。

本研究により、MIF が炎症性大腸癌モデルにおいて、その発症に促進的に貢献している可能性が示された。さらにクロロゲン酸投与によって体内の MIF 発現を抑えることも示唆された。MIF は以前より炎症進展、腫瘍増殖に対してそれぞれ促進的であることが多くの臓器、疾患および疾患モデルで明らかにされてきた。今回、MIF が炎症性大腸癌に強く関与している可能性が示唆され、また大腸において MIF が酸化ストレスや種々のサイトカインに影響しながら大腸炎症性発癌に寄与している可能性も考えられた。本研究により我々の仮説の一部は実証された。しかしながらまだ未解明な部分も多く今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka H, Watanabe A, Konishi M, Nakai Y, Yoshioka H, Ohkawara T, Takeda H, Harashima H, Akita H.	4. 巻 4
2. 論文標題 The delivery of mRNA to colon inflammatory lesions by lipid-nano-particles containing environmentally-sensitive lipid-like materials with oleic acid scaffolds.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2018.e00959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohkawara T, Okubo N, Maehara O, Nishihira J, Takeda H.	4. 巻 339
2. 論文標題 Protective effect of ISO-1 with inhibition of RIPK3 up-regulation and neutrophilic accumulation on acetaminophen-induced liver injury in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 51-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2020.12.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	武田 宏司 (Takeda Hiroshi) (60261294)	北海道大学・薬学研究院・特任教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------