

平成22年2月21日現在

研究種目：	基盤研究 (C)
研究期間：	2007～2008
課題番号：	19590727
研究課題名 (和文)	PPAR γ 大腸上皮特異的 KO マウスを用いた炎症性腸炎と腸炎後腫瘍発生機序の解明
研究課題名 (英文)	Targeted disruption of PPAR γ gene in colonic epithelium aggravates colorectal inflammation and carcinogenesis associated with chronic colitis in mice.
研究代表者	
	足立 雅広 (Adachi Masahiro)
	九州大学・大学病院・医員
	研究者番号：00419516

研究成果の概要：

PPAR γ は脂肪分化を促進し、PPAR γ リガンドは、糖尿病治療薬として汎用されている。大腸は PPAR γ の高発現部位であるが、その機能は不明である。PPAR γ 大腸特異的 KO マウスに、腸炎後腫瘍発生を誘導した結果、正常マウスと比較して、有意に腫瘍の発生を認めた。このことより、大腸上皮の PPAR γ の活性化は、腸炎後の腫瘍発生を抑制すると考えられ、今後、炎症性腸疾患患者における大腸がん発生抑制の標的となると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内分泌代謝学、糖尿病学、消化器病学

科研費の分科・細目：医歯薬学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、大腸がん、PPAR γ 、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性腸疾患は慢性の難治性疾患であり、近年我が国での著しい増加傾向を認めているが、その病因は不明で、根治治療も確立されていない。核内受容体である peroxisome proliferators activated receptor γ (PPAR γ) は、主に脂肪組織に発現しており、脂肪細胞の分化や脂質・糖代謝に関する遺伝子を制御しているが、さらに、PPAR γ の活性化は、nuclear factor κ B (NF κ B) の抑制を通して炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られて

いる。最近、DSS (dextran sodium sulfate) などを用いた炎症性腸疾患の動物モデルにおいて、PPAR γ のアゴニストである Thiazolidinediones (TZDs) の投与により、症状や粘膜の障害が軽減したと報告されている。また、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織では、PPAR γ の発現が低下していることが報告された。さらに、潰瘍性大腸炎の治療薬である 5-aminosalicylic acid (5-ASA) の作用の一部は、PPAR γ を介していることが報告され、PPAR γ の活性化が炎症性腸疾患の治療となりうることが示唆されて

いる。

(2) また、PPAR γ リガンドの投与により、大腸癌細胞株の細胞分化やアポトーシスが誘導され、PPAR γ の活性化がアポトーシスを誘導し、大腸癌発生に抑制的に働くと報告されている。マウスにPPAR γ リガンドを投与することにより、azoxymethane (AOM) 誘発による大腸癌の発生が抑制されている。

(3) 一方、PPAR γ は脂肪組織に次いで大腸上皮細胞に多く発現しているが、PPAR γ の大腸での機能については不明であった。我々は、PPAR γ -floxマウスと、villinプロモーターの制御下にCre Recombinaseを発現するトランスジェニックマウスとの交配により、小腸・大腸の上皮細胞特異的にPPAR γ の発現を完全に欠失するconditionalノックアウトマウス(PPAR γ Δ IEpC)を作成した。PPAR γ のheterozygous欠損(PPAR γ (+/-))マウスを用いた、炎症性腸疾患や大腸癌の研究においては、大腸上皮細胞のPPAR γ か、腸粘膜内の免疫細胞のPPAR γ が関与しているのかが明らかにならない。そこで、PPAR γ Δ IEpCマウスを用いて炎症性腸疾患や大腸癌の発生進展に対して、大腸上皮細胞に発現するPPAR γ の機能を解明する。

2. 研究の目的

(1) PPAR γ Δ IEpCマウスの大腸粘膜は、炎症巣が散在しており、非炎症部では、コントロールマウス(PPAR γ F/F)と比較してムチンの増加を認めていた。PPAR γ の欠失が大腸粘膜の持つhomeostasis機構の障害を来していると考えられた。また、PPAR γ Δ IEpCマウスは、DSSにより腸炎を誘発した結果、コントロールと比較して炎症の程度が重度であった。腸炎の重症化のメカニズムについて解明する。

(2) 潰瘍性大腸炎患者の予後を左右する合併症として大腸癌がある。また、PPAR γ と大腸癌に関するノックアウトマウスを用いた研究は、heterozygous欠損(PPAR γ (+/-))マウスを用いた研究のみである。同マウスはPPAR γ の発現が完全に消失していないことなどから、PPAR γ と大腸癌の発生に関しては未だ一定の見解を得ていない。本研究において、PPAR γ Δ IEpCマウスに発癌剤とDSSを投与することにより、大腸上皮細胞におけるPPAR γ の完全な欠失が、炎症性腸炎後の腫瘍発生の頻度と関係するかを検討する。腫瘍発生にPPAR γ の関与が認められた場合、さらにそのメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) PPAR γ -floxマウスとvillin-transgenicマ

ウスとの交配により、PPAR γ 大腸特異的conditionalノックアウト(PPAR γ Δ IEpC)マウスとコントロールのPPAR γ F/Fマウスを作成する。

(2) PPAR γ 大腸特異的conditionalノックアウト(PPAR γ Δ IEpC)マウスとコントロールのPPAR γ F/Fマウスの大腸上皮細胞を単離する。両群の細胞よりmRNAを調整しcDNAを合成する。DNAマイクロアレイ法を用いて、大腸上皮細胞においてPPAR γ の欠失により変化する遺伝子群を網羅的に検索する。得られた遺伝子はReal time PCR法にてmRNAの発現量を比較し、抗体入手が可能な遺伝子については、Western blot法や免疫組織染色にて、蛋白レベルの発現量を比較する。

上記の結果にて、PPAR γ のサブタイプのPPAR β の発現が低下していたことより、PPAR β ノックアウトマウスとコントロールのC57/BL6マウスに5%のDSSを7日間投与し、腸炎を誘導し、腸炎の重症度、大腸内のサイトカインの発現について検討する。

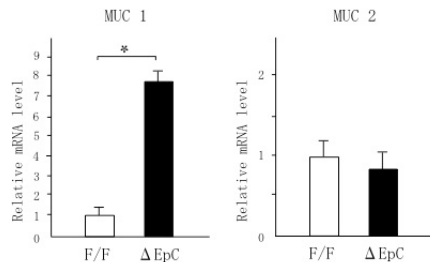
(3) PPAR γ 大腸特異的conditionalノックアウト(PPAR γ Δ IEpC)マウスとコントロールのPPAR γ F/Fマウスにazoxymethane (AOM)

(10.0mg/kg)を腹腔内に注射後5日目から、0.8%のdextran sodium sulphate(DSS)を5日間投与し、次に14日間普通の水を投与する。その後5日間を0.8%のDSSを5日間投与し、その後普通の水を投与する、腸炎後大腸癌発生病モデルを施行する。AOM投与後56日目にPPAR γ Δ IEpCマウスとPPAR γ F/Fマウスの大腸における腫瘍の発生頻度大きさを比較し、炎症性腸炎後の大腸癌発生病態について解析を行う。腫瘍病変はホルマリン固定後組織標本を作成し、組織学的検討を行う。

4. 研究成果

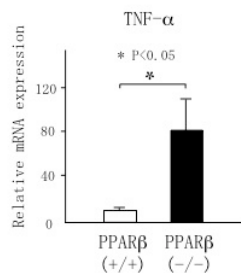
(1) PPAR γ Δ IEpCマウスとPPAR γ F/Fマウスの大腸上皮細胞において、DNAマイクロアレイ法にて、約40000個の遺伝子発現の違いについて検討した。PPAR γ Δ IEpCマウスの大腸上皮におけるGoblet細胞において、ムチンの産生が亢進していたことより、Goblet細胞の分化に関与すると報告のある遺伝子について検討した。PPAR γ Δ IEpCマウスにおいて、Hes1の発現の低下を認めた。Gfi1、Rac1、Klf4の発現に有意差を認めなかった。Hes1は消化管上皮細胞の分化に重要な働きをしており、Hes1のノックアウトマウスにおいて、Goblet細胞の増加を認めている。今後、大腸上皮におけるPPAR γ がHes1の発現に関与するメカニズムを検討する。次に、mucin遺伝子について検討したところ、PPAR γ Δ IEpCマウスにおいて、mucin(MUC)1の発現が優位に増加してい

た(図1)。MUC2、MUC3、MUC10、MUC13、MUC15に有意差を認めなかった。MUC1はヒトの大腸癌に発現していることが報告されている。後述する PPAR γ Δ IEpC マウスにおける大腸癌発生促進の重要な因子と考えられる。今後、MUC1は PPAR γ 活性化による炎症性腸炎の大腸癌発生抑制の標的遺伝子となると考えられる。図1 PPAR γ Δ IEpCマウス(Δ IEpC)と PPAR γ F/Fマウス(F/F)における MUC1と MUC2の発現の比較



(2) PPAR γ Δ IEpC マウスの大腸上皮では、コントロールの PPAR γ F/F マウスと比較して、PPAR β の発現が低下していた。マクロファージにおいて、PPAR γ のリガンドは、PPAR β を介する機構も存在することが報告されている。PPAR γ 活性化による腸炎の抑制効果が、PPAR β を介している可能性が考えられ、PPAR β の腸炎の抑制効果の有無を PPAR β ノックアウトマウスを用いて検討した。PPAR β ノックアウトマウスは、体重変化、Diarrhea score、Colon length、Bleeding Score、Histopathology score すべてにおいて腸炎の重症化を示した。PPAR β ノックアウトマウスの大腸組織においてコントロールマウスと比較して、INF- γ 、TNF- α 、IL-6の発現の増加を認めた(図2)。内因性リガンドと、外因性リガンドによる PPAR γ の活性化による腸炎抑制効果は、PPAR β を介していると考えられる。この結果をふまえて、今後、PPAR β の合成リガンドや、PPARファミリーの共通リガンドの開発後、腸炎患者への検討が考慮されると期待される。また、今後、大腸における PPAR β の発現量や、PPAR β の遺伝子多型と、炎症性腸疾患の発症や重症化との関連性に関する研究も行われる可能性が考えられる。

図2 DSS誘導性腸炎後の PPAR β ノックアウトマウスの大腸における TNF- α の発現



(3) AOM投与後、0.8%DSSを5日間投与したあと、普通水で飼育し、56日目に評価を行った。56日目の体重は、PPAR γ Δ IEpCマウスの方が PPAR γ F/Fマウスと比較して、低下していた。大腸ポリープの発生について検討した結果、PPAR γ Δ IEpCマウスの方が、大腸ポリープの発生個数が有意に多かった(図3)。大腸ポリープは、組織学的には、dysplasiaを認めた(図3)。以上より、炎症性腸疾患後の大腸癌発生において、大腸上皮に発現する PPAR γ が抑制的に働くことが証明された。今後、炎症性疾患患者において、大腸における PPAR γ の活性化が大腸癌発生の抑制になると考えられる。症性疾患患者への PPAR γ リガンドの投与など臨床応用への糸口となると考えられる。

図3 PPAR γ Δ IEpCマウス(Δ IEpC)と PPAR γ F/Fマウス(F/F)における大腸腫瘍発生の比較

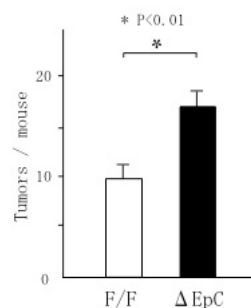
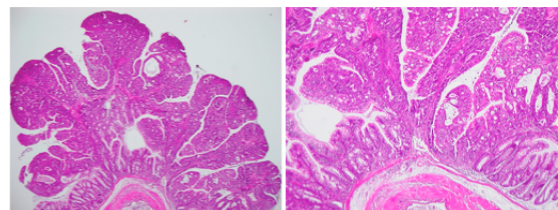


図4 PPAR γ Δ IEpCマウスにおける大腸腫瘍の組織(H.E.染色)



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 8件)

Hollingshead HE, Morimura K, Adachi M, Kennett MJ, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ, Peters JM.

PPARbeta/delta protects against experimental colitis through a ligand-independent mechanism.

Dig Dis Sci. 52:2912-2919, 2007 査読あり

Ohnaka K, Yamamoto K, Nakamura K, Adachi M, Kawate H, Kono S, Takayanagi R. Association of single nucleotide polymorphisms in secreted frizzled-related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women. Geriatr Gerontol Int. 9:304-309, 2009 査読あり

Yoshida D, Toyomura K, Fukumoto J, Ueda N, Ohnaka K, Adachi M, Takayanagi R, Kono S. Waist circumference and cardiovascular risk factors in Japanese men and women. J Atheroscler Thromb. 16 :431-441, 2009 査読あり

Ohnaka K, Kono S, Inoguchi T, Yin G, Morita M, Adachi M, Kawate H, Takayanagi R. Inverse associations of serum bilirubin with high sensitivity C-reactive protein, glycated hemoglobin, and prevalence of type 2 diabetes in middleaged and elderly Japanese men and women. Diabetes Res Clin Pract. 2010 In press 査読あり

Inoguchi T, Sasaki S, Kobayashi K, Takayanagi R, Yamada T. Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. JAMA. 298:1398-1400, 2007 査読あり

足立雅広、高柳涼一：骨粗鬆症治療と EBM、各薬剤のエビデンス、蛋白同化ホルモン：Clinical Calcium 18 : 1451-1459、2008年、査読なし

足立雅広、高柳涼一：高齢者認知症の知識と理解、各種疾患と認知症、メタボリックシンドロームの関わり：臨床と研究 85 : 520524、2008年、査読なし

足立雅広、高柳涼一：最新用語解説、基礎、アンドロゲン：骨粗鬆症治療 7 : 7679、2008年、査読なし

〔学会発表〕（計2件）

足立雅広：大腸上皮細胞に発現する PPAR γ の DSS 誘導性腸炎における炎症抑制効果について：第 82 回日本内分泌学会学術総会：平成 21 年 4 月 23 日：群馬

足立雅広：大腸上皮細胞に発現する PPAR γ の腸炎における作用についての検討：第 26 回日本老年医学総会：平成 21 年 6 月 19 日：横

浜

〔図書〕（計1件）

足立雅広：副甲状腺疾患：新老年医学 第3版 東京大学出版会：1053-1057、2010年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 雅広 (Adachi Masahiro)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：00419516

(2) 研究分担者

高柳 涼一 (Takayanagi Ryoichi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：30154917