

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07673

研究課題名（和文）低酸素による可溶性IL-33受容体の発現低下が大腸がん悪性進展に及ぼす影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the effect of hypoxia-induced downregulation of soluble IL-33 receptor on malignant progression of colorectal cancer

研究代表者

秋元 美穂 (Akimoto, Miho)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：60437556

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌（CRC）の腫瘍微小環境において、可溶性ST2（sST2）はインターロイキン（IL）-33の炎症性機能を抑制することにより、腫瘍抑制的に作用する。本研究では、腫瘍の悪性化に密接に関連する低酸素環境下では、CRC細胞におけるsST2発現が低酸素誘導因子（HIF）-核内IL-33-GATA3軸を介して顕著に低下することを明らかにした。また、CRC腫瘍組織中の低酸素領域限定的にsST2発現を回復させることで、炎症性腫瘍環境が改善し、腫瘍の増殖・転移が効果的に抑制されることを示した。我々の知見は、低酸素腫瘍領域を特異的に標的としたsST2増強が、悪性CRCの治療に有用である可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは本邦において罹患者数の多いがん種の一つであり、今後更なる増加が見込まれる。大腸がんの治療法は進歩を遂げているものの、転移の制御は未だ困難である。そのため、大腸がんの発生・悪性化の機序に関する新たな知見を得ることは大きな意義を持つ。本研究で得られた知見は、腫瘍組織中の低酸素腫瘍領域を標的としたsST2増強が、転移を伴う悪性大腸がんの抑制に有効であることを示すものであり、新たな大腸がん治療戦略への応用の可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the tumor microenvironment of colorectal cancer (CRC), sST2 acts in a tumor-suppressive manner by inhibiting the proinflammatory function of interleukin (IL)-33. This study demonstrates that hypoxia, which is closely associated with tumor malignancy, decreases sST2 expression in CRC cells. Hypoxia-induced sST2 depletion results from hypoxia-inducible factor-dependent nuclear accumulation of IL-33, which binds to GATA3 and blocks its access to the sST2 promoter. Most importantly, restoration of sST2 expression limited to hypoxic regions in mouse CRC tumors improves the inflammatory tumor environment, effectively suppressing tumor growth and metastasis. sST2 depletion is also observed in hypoxic regions of human CRC lesions. Our findings suggest that sST2 enhancement specifically targeting hypoxic tumor regions may be useful in the treatment of malignant CRC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 低酸素 インターロイキン-33 GATA3 転移抑制

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は以前、大腸がん細胞におけるインターロイキン - 33 の可溶性受容体 (sST2) の発現レベルが腫瘍増殖及び転移性と逆相関することを見出したことを契機に、sST2 が IL-33/ST2L 誘導性のヘルパーT 細胞の Th2 分化、M2 マクロファージ (TAM) の浸潤、腫瘍血管形成を阻害して大腸がんの増殖・転移を抑制することを明らかにし、2016 年に Nature Communications 誌上で報告した<sup>1</sup>。大腸がん腫瘍組織中にはがん間質細胞由来の多量の IL-33 が存在し、IL-33/ST2L アクシスを介した大腸がんの悪性進展には腫瘍組織中の IL-33 と sST2 の量的なバランスが大きく影響すると考えられる。興味深いことに、その後の検討で、がんの悪性度進展に深く関わる低酸素下では大腸がん細胞における sST2 の発現量が顕著に減少することが新たにわかった。このことから、大腸がん腫瘍組織中の低酸素領域における sST2 の分泌の減少により、腫瘍全体での IL-33/ST2L アクシスを介した Th2 分化、腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の浸潤、腫瘍血管形成が促進され、結果的に腫瘍増殖が増大することが予想される。しかしながら、これまで低酸素誘導性の sST2 の発現低下に関する報告は皆無であり、そのメカニズムや低酸素が sST2 発現減少を介して腫瘍内微小環境にどの程度影響するのは不明であった。

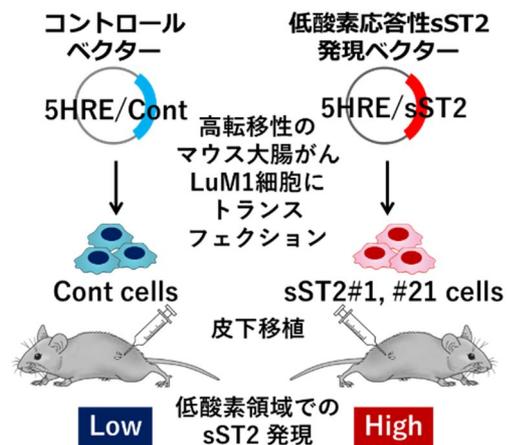
## 2. 研究の目的

本研究では、大腸がん細胞における低酸素誘導性の sST2 の発現低下に関して、どのような分子機序が働いているか、大腸がん腫瘍組織中の低酸素領域でも見られる現象か、大腸がんの炎症性微小環境にどのような影響をもたらすかを検討し、将来的な臨床応用を念頭に、腫瘍組織中の低酸素領域を標的とした sST2 の回復が増殖・転移の抑制に有効かどうかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 常酸素 (21% O<sub>2</sub>) または低酸素 (1% O<sub>2</sub>) で培養した高転移性のマウス大腸がん LuM1 細胞およびヒト大腸がん SW480 細胞を用いた。sST2 の遺伝子発現レベルと転写活性は、それぞれ qRT-PCR とルシフェラーゼレポーターアッセイで定量した。ST2 プロモーターへの GATA3 の結合は ChIP-qPCR により評価した。また、IL-33 および GATA3 の細胞内局在は免疫蛍光染色で、両者の結合はプルダウンアッセイで検出した。

(2) 低酸素応答性の sST2 発現ベクター (5HRE/sST2) を作製して高転移性のマウス大腸がん LuM1 細胞に導入し、マウスに皮下移植した (図 1)。これにより腫瘍組織中の低酸素



領域での sST2 発現低下を回復させ、腫瘍増殖、腫瘍血管形成、炎症性サイトカインの発現レベルに及ぼす影響を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸がん細胞における低酸素誘導性の sST2 発現低下の分子機序の解明

低酸素誘導性の sST2 の発現低下は LuM1 細胞および SW480 細胞で確認された。これに先行して HIF-1 $\alpha$  依存的な IL-33 の発現上昇と IL-33 タンパクの核集積が認められ、IL-33 のノックダウンにより低酸素下の sST2 の発現レベルが回復することが分かった。また、低酸素下では核 IL-33 の存在下、ST2 遺伝子の転写活性が低下した。低

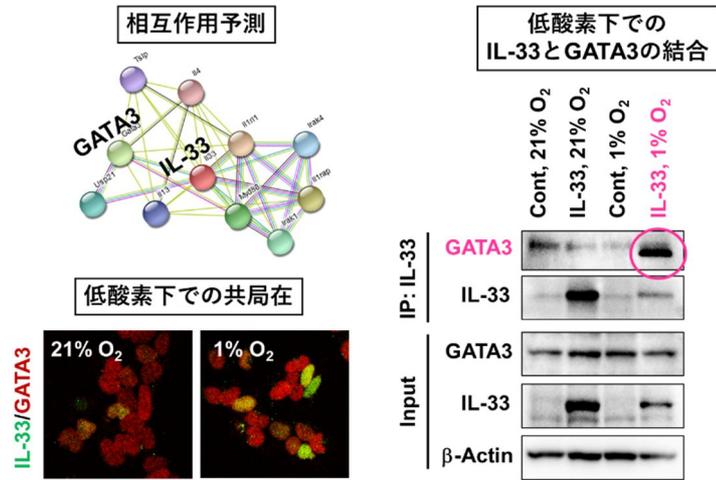


図2 低酸素下大腸がん細胞の核での IL-33 と GATA3 の結合

酸素下の大腸がん細胞では、ST2 遺伝子の転写促進に働く転写因子 GATA3 の ST2 近位プロモーターへの結合が顕著に抑制されており、これは IL-33 ノックダウンにより改善された。興味深いことに、STRING (<https://string-db.org/>) を用いた計算予測では、IL-33 は sST2 遺伝子 (ST2) 転写に關与する転写因子 GATA3 と相互作用することが示唆された。免疫蛍光染色による観察では、低酸素下の大腸がん細胞の核で IL-33 と GATA3 が共局在していることが分かった。また、プルダウンアッセイの結果、IL-33 と GATA3 は低酸素条件でのみ核内で結合することが明らかになった (図2)。以上により、低酸素下の大腸がん細胞では HIF-1 $\alpha$ -IL-33-GATA3 軸を介して sST2 発現が低下することが示された。

### (2) 腫瘍組織中の低酸素領域における sST2 発現低下の抑制が腫瘍増殖や炎症性のがん微小環境に及ぼす影響の解明

低酸素に応答して sST2 発現する LuM1 細胞を作製し、同系の BALB/c マウスに皮下移植した。その結果、LuM1 腫瘍低酸素領域のがん細胞における sST2 の発現低下が減弱された。これに伴い、腫瘍増殖および腫瘍血管形成、肺転移が顕著に抑制された (図3)。また、この腫瘍中のサイトカインの遺伝子発現を PCR アレイと定量 PCR で分析した結果、抗腫瘍的な Th1 サイトカインの発現上昇と腫瘍促進的な Th2 サイトカインの発現低下が認められた。さらに、腫瘍組織中の低酸素領域における sST2 発現低下の抑制により、腫瘍促進的な M2 マクロファージ (TAM) や制御性 T 細胞 (Treg) の腫瘍内浸潤が減少し、炎症性の微小環境の改善が認められた。

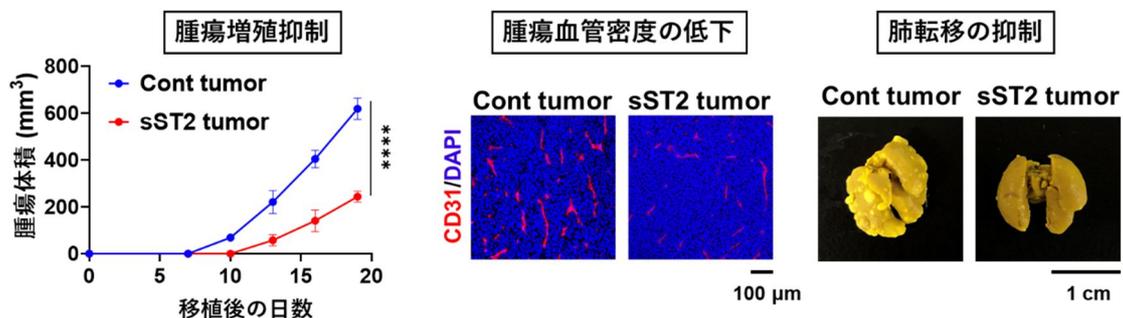


図3 大腸がん低酸素領域限定的な sST2 発現誘導に伴う抗腫瘍および抗転移効果

## 結論

- 低酸素条件下で核に蓄積された IL-33 が GATA3 と結合することによって ST2 近位プロモーター (Proximal promotor, PP) への GATA3 のアクセスを阻害し、これが sST2 の転写抑制と発現低下につながる。
- 大腸がん腫瘍組織中のがん細胞における低酸素誘導性の sST2 発現低下の回復は、炎症性微小環境を改善し、腫瘍増殖および肺転移の抑制に有効である。

本研究により、大腸がん腫瘍の低酸素領域の sST2 発現の低下を抑制することにより、炎症性微小環境が改善され、腫瘍の増殖・転移が抑制されることが示された (図4)。このことから、腫瘍の低酸素領域の sST2 に着目した治療戦略は、転移性の大腸がんにも有効であることが期待できる。本研究の成果は、2023 年の PNAS 誌上で発表された<sup>2</sup>。

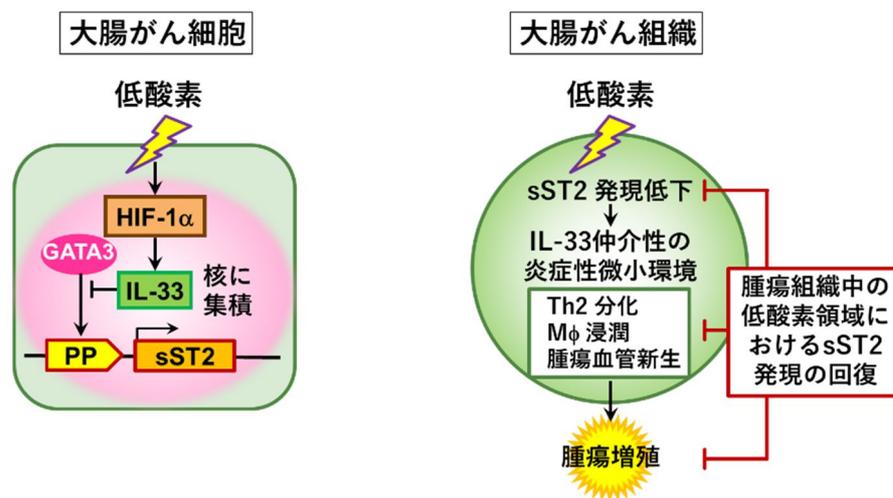


図4 本研究成果の概要

## <関連文献>

1. **Akimoto M**, Maruyama R, Takamaru H, Ochiya T, Takenaga K. Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by modifying the tumour microenvironment. *Nature Communications*. 2016;7:1-15. doi:10.1038/ncomms13589
2. **Akimoto M**, Susa T, Okudaira N, et al. Hypoxia induces downregulation of the tumor-suppressive sST2 in colorectal cancer cells via the HIF–nuclear IL-33–GATA3 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023;120(18):2017. doi:10.1073/pnas.2218033120

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Akimoto Miho, Susa Takao, Okudaira Noriyuki, Koshikawa Nobuko, Hisaki Harumi, Iizuka Masayoshi, Okinaga Hiroko, Takenaga Keizo, Okazaki Tomoki, Tamamori-Adachi Mimi	4. 巻 120
2. 論文標題 Hypoxia induces downregulation of the tumor-suppressive sST2 in colorectal cancer cells via the HIF $\alpha$ -nuclear IL-33/GATA3 pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2218033120	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 Akimoto Miho, Susa Takao, Okudaira Noriyuki, Hisaki Harumi, Iizuka Masayoshi, Okinaga Hiroko, Okazaki Tomoki, Tamamori-Adachi Mimi	4. 巻 298
2. 論文標題 A novel lncRNA PTH-AS upregulates interferon-related DNA damage resistance signature genes and promotes metastasis in human breast cancer xenografts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102065 - 102065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102065	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 Keizo Takenaga, Nobuko Koshikawa, Miho Akimoto, Yasutoshi Tatsumi, Jason Lin, Makiko Itami, Hiroki Nagase	4. 巻 11
2. 論文標題 MCT4 is induced by metastasis-enhancing pathogenic mitochondrial NADH dehydrogenase gene mutations and can be a therapeutic target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92772-1	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 Takenaga Keizo, Akimoto Miho, Koshikawa Nobuko, Nagase Hiroki	4. 巻 15
2. 論文標題 Cancer cell-derived interleukin-33 decoy receptor sST2 enhances orthotopic tumor growth in a murine pancreatic cancer model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232230	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 Takenaga Keizo, Akimoto Miho, Koshikawa Nobuko, Nagase Hiroki	4. 巻 11
2. 論文標題 Obesity reduces the anticancer effect of AdipoRon against orthotopic pancreatic cancer in diet-induced obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82617-2	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 Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Nagase H	4. 巻 15
2. 論文標題 Cancer cell-derived interleukin-33 decoy receptor sST2 enhances orthotopic tumor growth in a murine pancreatic cancer model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0232230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232230	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 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋元 美穂、諏佐 崇、奥平 准之、岡崎 具樹、安達 三美
2. 発表標題 大腸がん低酸素領域限定的な可溶性IL-33受容体発現の回復は腫瘍の増殖と転移を抑制する。
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋元 美穂、奥平 准之
2. 発表標題 A novel lncRNA downstream of the parathyroid hormone gene promotes breast cancer malignancy via upregulation of STAT1.
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三
2. 発表標題 Restoration of sST2 expression in hypoxic CRC cells suppresses tumor growth by changing inflammatory microenvironment
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋元美穂、藤井美沙紀、豊嶋歩実、諏佐崇生、奥平准之、久樹晴美、飯塚真由、竹永啓三、渡部多真紀、安野伸浩、岡崎具樹、安達(玉盛)三美
2. 発表標題 Analysis of the mechanism of hypoxia-induced sST2 downregulation in colorectal cancer cells and its effect on tumor growth
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三
2. 発表標題 大腸がん細胞において核内のIL-33はGATA3への結合を介して腫瘍抑制性sST2の発現を低酸素下で抑制する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋元美穂、諏佐崇生、安達(玉盛)三美、飯塚真由、岡崎具樹
2. 発表標題 異所性副甲状腺ホルモン産生悪性線維性組織球腫で検出された新規lncRNAの解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三
2. 発表標題 大腸癌細胞におけるIL-33低酸素誘導性核集積による腫瘍抑制性sST2の発現抑制
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三、岡崎具樹
2. 発表標題 大腸がん細胞における低酸素誘導性sST2発現低下のメカニズムの解明
3. 学会等名 第17回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京大学医学部 生化学講座ホームページ <a href="http://www.teikyo.jp/teikyo-med_biochem/">http://www.teikyo.jp/teikyo-med_biochem/</a>
--

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

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
---------	---------