

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08421

研究課題名(和文) 腸内環境の修飾による大腸癌予防法の開発

研究課題名(英文) Development of colorectal cancer prevention methods by modifying the intestinal environment

研究代表者

大井 充(Ooi, Makoto)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：70448174

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)：大腸癌の発生には、食事や腸内細菌などが影響すると考えられている。そこで、その機序が解明できれば食事等で腸内環境を変化させ大腸癌予防ができるのではと着想した。本研究では、腫瘍モデルであるApcMin/+マウスを利用し、アミノ酸制限食やアミノ酸トランスポーター欠損マウス、短鎖脂肪酸受容体であるGPR43の欠損マウスを駆使し、腫瘍発生への関与について検討を重ねた。結果、GPR43欠損マウスは腫瘍が増加し、LAT1欠損マウスでは腫瘍が減少することが判明した。また特定の分岐鎖アミノ酸を制限する事でも腫瘍が減少することを確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活が健康に大きな影響を及ぼすことは明白であり、大腸癌は赤肉や加工肉の摂取増加がリスク因子であると長らく知られていながら、実際の食生活への知識の還元は十分になされていない。しかし、本研究の成果から、腸内環境に存在する短鎖脂肪酸などの栄養素や、摂取するアミノ酸を操作することにより、腸管の腫瘍形成や腫瘍成長に影響を及ぼすことに科学的根拠を加えることができたと考えられる。禁煙による肺癌リスクの低下や減塩による脳出血の回避などの成功例を見据え、本研究をさらに追及することにより、大腸癌の日常生活からのリスク回避が現実的なものとなれば、社会的意義はさらに広がると思われる。

研究成果の概要(英文)：It is believed that diet and intestinal bacteria influence the development of colorectal cancer. We hypothesized that if the mechanism could be elucidated, it would be possible to prevent colorectal cancer by changing the intestinal environment through diet and other means. In this study, using ApcMin/+ mice as a tumor model, we investigated its involvement in tumorigenesis by using amino acid-restricted diet, amino acid transporter-deficient mice, and mice deficient in GPR43, a short-chain fatty acid receptor. The results showed that GPR43-deficient mice have increased tumors, while LAT1-deficient mice have decreased tumors. We also confirmed that restricting specific branched-chain amino acids also reduced tumors.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸内環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本の大腸癌死亡率は右肩上がりに上昇し、女性の癌死亡率1位、男性でも3位であり、2018年に発表された癌発症率では胃癌をこえて第1位となった。特に戦後に上昇し、増加の要因に食の欧米化など環境因子の関与が疑われ、肉類摂取増加が大腸癌リスクを上昇させる等の疫学的データや、動物モデルにおいて高脂肪食などの食餌の修飾により腸管腫瘍が増えることは広く知られており、食事の変化で大腸癌発症が影響をうけることを強く示唆する。近年に増加するということは遺伝的因子よりも環境因子の関与が疑われ、その媒介因子がわかれば予防対策を講じることも可能となる。そこで本研究では、大腸癌予防法開発を目標に、アミノ酸制限食による腸管腫瘍形成への影響、栄養素の細胞内輸送に関わる分子の遺伝子組換えマウス、腸管腺腫モデル等を駆使し、腸内環境と腫瘍発生/成長の関係の解明を試みることにした。

### 2. 研究の目的

本件研究の最終目的は大腸癌予防法の開発であり、本課題ではそのシーズとなる研究成果を挙げることであった。

疫学的研究から、大腸癌の関連因子として、食の欧米化、赤肉、加工肉、飲酒などが挙げられているが (Brenner and Chen, 2018, Br J Cancer, Takachi et al., Asia Pac J Clin Nutr 2011) その媒介因子は不明である。食物繊維 (野菜) 摂取の励行などが大腸癌予防によいと説明されるが、基礎研究による機序解明や科学的根拠が不十分であり、十分浸透しているとはいえない。そこで本課題では、アミノ酸制限食による腸管腫瘍形成への修飾の有無の確認、腸内細菌が食物繊維を分解することで産生される分子である短鎖脂肪酸 (酢酸、酪酸など) の受容体である GPR43 欠損マウス、アミノ酸トランスポーターの一つである L-type amino acid transporter 1 (LAT1) の上皮特異的欠損マウスを使用して解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 特殊食 (アミノ酸制限食) による ApcMin マウスの腫瘍形成抑制効果の検討を行うため、複数のアミノ酸制限食を作成した。ApcMin/+ マウスを4週齢で離乳し、15週齢まで自由摂食させ、15週齢で、小腸、大腸を摘出し、腫瘍数、腫瘍径を記録し、腫瘍の成長抑制や、腫瘍発生の抑制が可能か解析する計画を基本とし、実験を開始した。

(2) 腸管上皮特異的 L-type amino acid transporter 1 (LAT1) 欠損マウスを作成し、これを更に腫瘍モデルと交配して LAT1<sup>folx/flox</sup>; Villin-Cre; ApcMin/+ マウスを作成した。(1) と同様に、マウスを4週齢で離乳し、15週齢まで自由摂食させ、15週齢で、小腸、大腸を摘出し、腫瘍数、腫瘍径を記録し、腫瘍の成長抑制や、腫瘍発生の抑制が可能か解析する計画を基本とし、実験を遂行した。

(3) 短鎖脂肪酸受容体 GPR43 欠損マウスと腫瘍モデルと交配して GPR43<sup>-/-</sup> ApcMin/+ マウスを作成し、マウスを4週齢で離乳し、15週齢まで自由摂食させ、15週齢で、小腸、大腸を摘出し、腫瘍数、腫瘍径を記録し、腫瘍の成長抑制や、腫瘍発生の抑制が可能か解析する計画を基本とし、実験を遂行した。

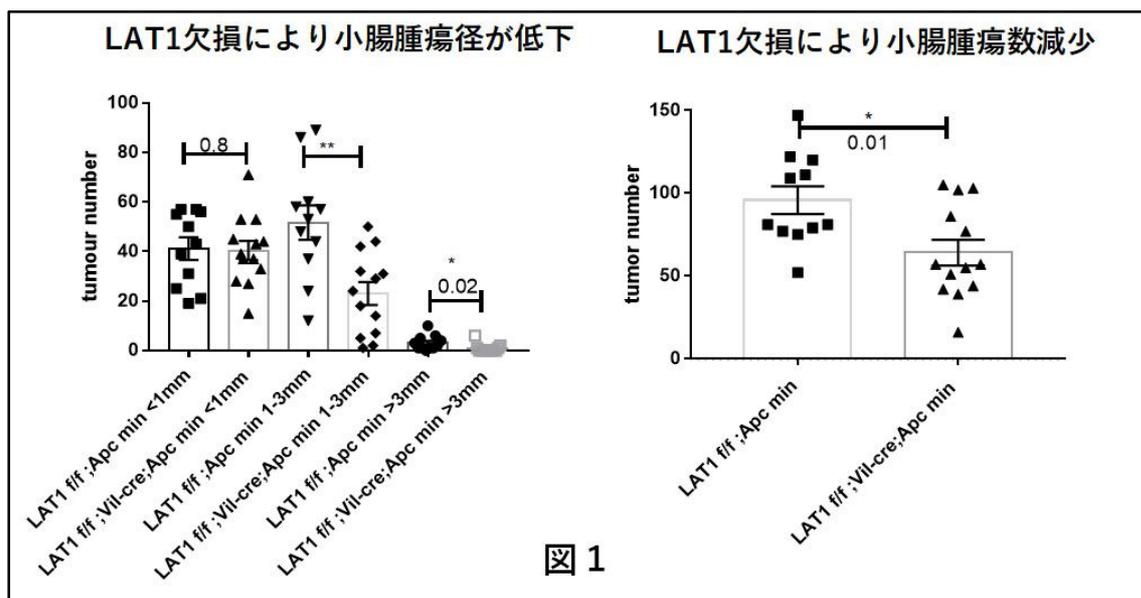
### 4. 研究成果

(1) コントロール AIN93G 食と、各種アミノ酸制限食 (特殊食 ) を準備した。特殊食では、腫瘍形成はコントロール食と全く同等であったが、特殊食では、腫瘍数が激減することが観察された。特殊食については、マウスの摂食行動が極度に抑制されることが判明したため、については実験を中止し、に注目した。血球系の細胞がサイトカイン分泌などを介して、ApcMin/+ の腫瘍形成に影響を及ぼす事が知られているため、特殊食のマウスの腸管組織内の免疫細胞分布を解析したが、コントロール食群と大差を認めなかった。組織内の炎症性サイトカインも検討範囲内で差はなく、観察している形質は、腸管上皮内の細胞増殖シグナルの変化などが関わっている可能性を示唆すると考えているが、本形質は現在もメカニズムが解明できておらず、更に検討を重ねている。

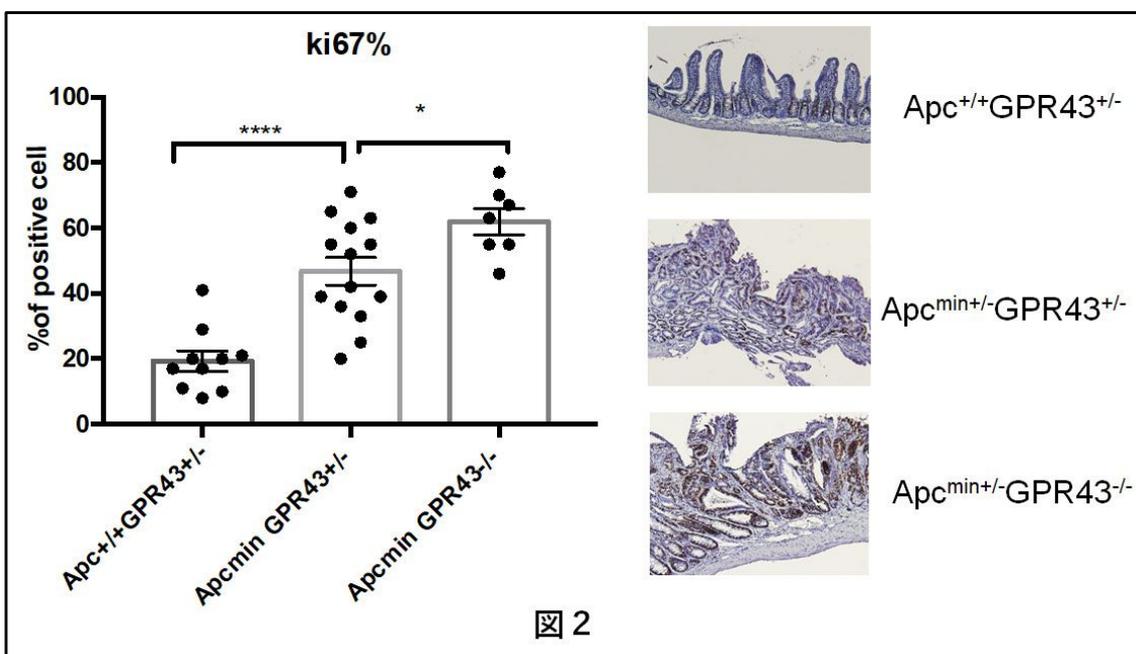
(2) LAT1<sup>folx/flox</sup>; Villin-Cre; ApcMin/+ マウスはコントロールの ApcMin/+ マウスと比較して、有意に小腸腫瘍径と腫瘍数が減少することが観察された (図1)。その機序として、細胞増殖とアポトーシスについて検討した。免疫染色で LAT1<sup>folx/flox</sup>; Villin-Cre; ApcMin/+ の腫瘍組織で、Ki-67 陽性細胞が有意な減少が認められ、TUNEL 染色でアポトーシスの有意な増加を検出した。アミノ酸センサーである mTOR 経路の活性化が関与している可能性があると考え、小腸腫瘍組織

からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングで検討した。想定通り、S6k1、4EBP1 タンパクのリン酸化の低下が LAT1 欠損の腫瘍で認められ、腫瘍抑制の機序として mTOR 活性の低下があるものと考えられた。

作製したマウスの小腸から腸管オルガノイドを作成し、in vitro でも上記形質が再現されるか確認実験を行った。正常小腸オルガノイドは budding と呼ばれる成長形態をとり、Apc<sup>Min/+</sup>小腸オルガノイドは特徴的な球形となることが知られている。推測通り、LAT1<sup>folx/flox</sup>;Villin-Cre;Apc<sup>Min/+</sup>のオルガノイドで球形形成が減少し budding が優位となった。オルガノイド組織からタンパク質を抽出しウェスタンブロッティングを行ったところ、やはり S6k1、4EBP1 タンパクのリン酸化の低下が再現された。



(3) GPR43<sup>-/-</sup>Apc<sup>Min/+</sup>マウスでは、腫瘍が有意差をもって増加することが確認され、免疫染色にてKi-67陽性細胞がコントロールのApc<sup>Min/+</sup>より有意に増加している事が検出された(図2)。GPR43の下流では直接的なmTOR経路の活性化は言われていない。しかし、我々の検討では、GPR43欠損腫瘍ではコントロール腫瘍よりも、S6k1、4EBP1タンパクのリン酸化が有意に亢進していた。mTORCの活性化にはAkt依存的な経路と非依存の経路があるが、GPR43<sup>-/-</sup>Apc<sup>Min/+</sup>腫瘍ではAktのリン酸化に変化は検出されなかった。これらのことから、GPR43欠損では腫瘍が増加するが、GPR43受容体のシグナル消失がAkt非依存的なmTOR経路の活性化を促進している可能性が考えられ、短鎖脂肪酸のシグナルと(GPR43の下流)、mTOR経路(アミノ酸センシングの経路)が細胞内でクロストークしている可能性が示唆され、そのメカニズムの解明は更なる課題と考えている。この成果は論文にまとめ報告した。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kong Lingling, Hoshi Namiko, Sui Yunlong, Yamada Yasutaka, Yoshida Ryutaro, Ooi Makoto, Tian Zibin, Kimura Ikuo, Kodama Yuzo	4. 巻 31
2. 論文標題 GPR43 Suppresses Intestinal Tumor Growth by Modification of the Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Activity in Apc <sup>+/Min/+</sup> Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Principles and Practice	6. 最初と最後の頁 39 ~ 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000518621	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 該当する

〔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	星 奈美子  (HOSHI NAMIKO)  (40645214)	神戸大学・医学部附属病院・講師     (14501)	

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