

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20191

研究課題名（和文）エピジェネティクスで解明する運動の大腸がん抑制メカニズム

研究課題名（英文）Exercise induced histone modification prevent colon cancer

研究代表者

梶 寿喜（Natsume, Toshiharu）

東海大学・医学部・特任助教

研究者番号：90761841

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がんの発生過程において、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構の重要性は広く認識されている。しかしながら、運動が大腸組織のエピジェネティックな遺伝子発現調節機構に影響を与え、大腸がん抑制に貢献しているか否かを検証した研究はこれまでに見当たらない。そこで本研究では、運動がエピジェネティックな遺伝子発現調節機構を介して腸がんを抑制しているか明らかにすることを目的とした。その結果、運動介入によって大腸がんを抑制することができた。しかしながら、今回解析した部位においてヒストン修飾の違いは認められなかった。運動がエピジェネティクスを介して大腸がんを抑制するかについて今後さらなる解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんの発生数は本邦において年々増加していることから、その増加を食い止めることは喫緊の課題である。その予防のために日常的な運動が効果的であることは広く知られている。しかしながら、どのようなメカニズムを介して運動が大腸がんの抑制に寄与しているか明らかでない。本研究を遂行することで、運動を実施する重要性に対する説得力ある証拠を示すことができるだけでなく、運動の大腸がん予防メカニズムについて新たなエビデンスを提供できる。また、将来的にはエピジェネティクスをターゲットとした大腸がんを予防するため運動プログラム・栄養の摂取・予防薬の開発など大腸がん抑制に対する研究をさらに発展できる。

研究成果の概要（英文）：The importance of epigenetics in the development of colorectal cancer is widely recognized. However, it is unknown whether exercise contributes to the suppression of colorectal cancer via epigenetic mechanisms. Therefore, the aim of this study was to clarify whether exercise suppresses colorectal cancer via epigenetics. Exercise intervention suppressed colorectal cancer. However, no differences in histone modifications were observed at the analyzed sites. Further analysis is needed to determine whether exercise suppresses colorectal cancer via epigenetics.

研究分野：生理学

キーワード：ヒストン 骨格筋 アセチル化 メチル化 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

日本において癌による死亡数は他の疾患を抑えて第1位であり、現在も年々増加傾向にある。その中でも大腸がんの発症率は、20世紀後半から急速に増加しており、死亡数と罹患数は男女ともに上位に位置している(厚生労働省, 平成29年人口動態統計)。この大腸がんを発症する要因は様々であるが、クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される大腸組織の炎症は発がんを誘導する強力な因子の一つである。特に、大腸組織におけるTNF- $\alpha$  やIL6などの炎症性サイトカインの産生は、NF- $\kappa$ Bなど細胞内炎症性メディエーターの活性化を導き、腫瘍細胞の増殖亢進に關与している。

以前から習慣的な運動は、発がんリスクを下げることが知られており、特に大腸がんの予防効果については多くの疫学研究によって支持されている。この運動の大腸がん抑制効果には、マイオカイン産生による抗炎症作用や免疫細胞から分泌される炎症性サイトカインの減少などのメカニズムが寄与していることが示唆されている。しかしながら、運動による抗炎症効果が大腸がんを抑制する詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多いのが現状である。

ところで、我々の生体には、アデニン(A)・チミン(T)・グアニン(G)・シトシン(C)の二重螺旋構造から成るDNA塩基配列の変化を伴わずに、生活環境や栄養などの環境要因によって遺伝子発現量を増減させる後天的な遺伝子発現調節機構(エピジェネティクス)が備わっている。これには、DNAが染色体に収納されるために巻きついているヒストンと呼ばれるタンパク質のアミノ末端がメチル化・アセチル化・ユビキチン化・リン酸化などの化学修飾を受けること(ヒストン化学修飾)・DNAのシトシン(C)にメチル基が付加されること(DNAメチル化)などの機構が存在している。興味深いことに、大腸がんを含む数多くの癌で、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構に変異が見つかっており、発癌がエピジェネティクスによって調整されていることが分かっている。さらに、近年では運動がエピジェネティックに遺伝子発現を調節することが明らかにされている。従って、我々は、炎症性サイトカインの減少・マイオカインによる抗炎症作用以外にも、運動が大腸組織のエピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構を介して大腸がん発症を抑制するという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

大腸がんの発生過程において、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構の重要性は広く認識されている。しかしながら、運動が大腸組織のエピジェネティックな遺伝子発現調節機構に影響を与え、その後の大腸がん抑制に貢献しているか否かを検証した研究はこれまでに見当たらない。運動が大腸組織のエピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構を介して大腸がん発症の抑制に寄与するという仮説をもとに、運動が大腸がんを抑制するメカニズムを、エピジェネティクスのひとつであるヒストン修飾に焦点を絞って解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

6週齢の雄性A/Jマウス48匹を湿度 $55 \pm 5\%$ 、温度 $23 \pm 1\%$ 、12時間の明暗サイクルを維持した環境下で飼育した。1週間予備飼育した後、雄性A/Jマウスを対照群、運動群、AOM/DSS群、AOM/DSS+運動群に体重が等しくなるように無作為に振り分けた。大腸がんはアゾキシメタン(Azoxymethane; AOM)を腹腔内投与(10mg/kg)した後、デキストラン硫酸ナトリウム(Dextran Sulfate Sodium Salt; DSS)を溶かした飲料水を(1.5% DDS)1週間経口投与することによって誘発した。運動はAOM投与後から回転ホイール付きのケージを使用して、30週間の自発走を実施

させた。介入期間終了後に麻酔下で屠殺した後、大腸組織および下肢骨格筋を摘出した。

大腸がんの数は実体顕微鏡下で目視によってカウントした。また、大腸がんの体積はノギスを使用して測定し、先行研究に従い Carlsson et al の式に代入することで算出した。

摘出した下肢骨格筋(腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋)は液体窒素で冷やしたイソペンタンに浸漬することで凍結した。凍結したサンプルはクライオスタットで薄切し、ミオシン重鎖および筋形質膜に特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色をおこなった。また、自発走のトレーニング効果を確認するために、腓腹筋におけるクエン酸合成酵素活性を Srere の方法に従って解析した。酵素溶液に 1mM DTNB、10mM acetyl-CoA を含む 0.1M リン酸カリウムバッファーを加え、室温で 30 分間インキュベートした後、10mM オキサロ酢酸を加えて反応を開始させた。反応開始 5 分から分光光度計を用いて 412nm の吸光度の変化を測定した。

大腸組織におけるヒストン修飾および炎症など大腸がん発症に関与するタンパク質の発現量をウエスタンブロットによって評価した。具体的には、サンプリングした大腸組織を液体窒素下でパウダーにした後、フォスファターゼ(PhosSTOP)およびプロテアーゼインヒビター(Complete EDTA-free)を含んだ Lysis バッファー (50 mM HEPES pH7.4, 4mMEGTA, 10mM EDTA, 50mM  $\beta$ -glycerophosphate, 25mM NaF, 5mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.1% TrironX-100)中でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離後に回収し、タンパク質の濃度を BCA protein Assay によって測定した。その後、サンプルバッファー [62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 2.3% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol, 0.05% (w/v) Bromophenol-blue, 5% (v/v)2-Mercaptoethanol]を用いて調節した。調整したサンプルを使用して、特異的な抗体によるウエスタンブロットによって評価した。また、ヒストン修飾部位のマルチプレックスアッセイの為にパウダーにした大腸組織から EpiQuick Totak Histone Extraction Kit を使用して全ヒストン抽出物を調整した。その後、マルチプレックスアッセイキット(Epiquick Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit, Epiquick Histone H4 Modification Multiplex Assay Kit)によって 31 箇所のヒストン修飾状態を評価した。

#### 4 . 研究成果

大腸がんの発生数およびそれらの体積は、AOM/DSS 群よりも AOM/DSS+運動群において低い値を示した。また、腓腹筋におけるクエン酸合成酵素活性、ヒラメ筋と足底筋の筋重量および筋横断面積は、運動群と AOM/DSS+運動群において、対照群と AOM/DSS 群よりも高い値を示した。これらの結果は、自発走による運動介入によって、大腸がんの発症を軽減できることを示唆している。

AOM および DDS によって大腸がんを誘発する本実験動物モデルには炎症が関連することが知られているため、炎症に関係する IL6 および iNOS の発現量を評価した。これらの発現量は、AOM/DSS 群よりも AOM/DSS+運動群において低い値を示した。

次に、大腸がんの抑制効果が認められた組織におけるヒストン修飾を評価した。マルチプレックスアッセイによって、H3K4・H3K9・H3K27・H3K36・H3K79・H4K20 のメチル化・ジメチル化・トリメチル化、H3K9・H3K14・H3K18・H3K56・H4K5・H4K8・H4K12・H4K16 のアセチル化、H3Ser10・H3Ser28・H4Ser1 のリン酸化を評価したが、いずれの修飾部位においても群間で違いは認められなかった。また、ヒストンアセチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素、ヒストンメチル化酵素、ヒストン脱メチル化酵素の発現量をウエスタンブロットによって評価した。これらの酵素においてもいずれの群間で違いは認められなかった。今回の結果から、運動は大腸がんを抑制する際のメカニズムにエピジェネティクスは関連しないことが示唆された。しかしながら全てのヒストン修飾を解析したわけではないこと、他のモデルでは検証していないことを考慮する必要が

あり、今後の更なる研究の発展が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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