

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23883

研究課題名(和文)腸内細菌叢の変化によるAhR ノックアウトマウスの回盲部での発癌促進機構

研究課題名(英文)Acceleration of cecal tumorigenesis in AhR-deficient mice by the alternation of gut microbiota.

研究代表者

的場 久典(Matoba, Hisanori)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：10849277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、AhRノックアウト(KO)マウスの回盲部における腫瘍発生が、Enterotoxigenic Bacteroides fragilis (ETBF) の投与により促進されるか否かについての解析を行った。ETBF投与により、AhR KOマウスの死亡率は上昇した。また先行研究と異なりETBF非投与のAhR KOマウスでは病変が発生せず、発生率が低下していたが、ETBF投与のAhR KOマウスではその2-3割程度に顕微鏡的および肉眼的な病変を認めた。ETBF投与は腸管の炎症反応を惹起しマウスの死亡率を上昇させるが、同時にその炎症反応により低下した腫瘍発生率を回復させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸内細菌叢の変化などの原因によりAhR KOマウスの炎症に対する感受性や腫瘍の発生率がこれまでの結果と比較して低下していたが、ETBFの投与がこの低下した炎症感受性や腫瘍発生を回復・促進させることが示唆された。AhRがヒトの炎症性腸疾患の感受性遺伝子の1つであることを考慮すると、本研究がヒトの炎症性腸疾患からの発癌における特定の遺伝子変異と腸内細菌叢との関連性の解明や、腸内細菌叢の制御による発癌予防の糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a transcription factor known as a dioxin receptor. We analyzed cecal tumorigenesis in AhR knockout (KO) mice and revealed that the lesions developed from hyperplasia to neoplasia with inflammation observed specifically in the lesion sites. However, tumor incidence was significantly lower than previously reported in the study. The reason for this decrease could be attributed to differences in the intestinal microbiota between the facilities.

In this study, we analyzed whether the administration of Enterotoxigenic Bacteroides fragilis (ETBF) accelerated tumorigenesis in AhR KO mice. ETBF treatment increased mortality in AhR KO mice. In contrast to previous reports, no lesions were observed in AhR KO mice without ETBF treatment. However, microscopic and gross lesions were observed in 20-30% of AhR KO mice treated with ETBF. ETBF treatment increased mortality in mice by inducing an inflammatory response in the intestine, but also promoted tumorigenesis.

研究分野：病理学

キーワード：AhR 炎症性発癌 B. fragilis (ETBF)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) AhR ノックアウトマウスの回盲部における腫瘍発生

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)は、ダイオキシン類などの芳香族炭化水素の受容体として働き、核内に移行して転写因子として機能する分子である。様々な側面から免疫応答の抑制に関わり、またヒトの炎症性腸疾患の感受性遺伝子の1つであることが知られている。近年、ほぼすべての AhR KO マウスに、10 週齢までに回盲部に大腸炎を伴いながら腫瘍が発生することが示された(Kawajiri K., et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106 13481-13486, Ikuta T., et al. (2013) *Carcinogenesis* 34 1620-1627)。AhR は E3 コピキチンリガーゼとして APC とは独立にβ-catenin の分解に関わると報告されており(Ohtake F., et al. (2007) *Nature* 446 562-566)、当初はこの腫瘍発生には、炎症反応に加えて AhR のノックアウトによるβ-catenin の蓄積が関与するとされた。しかし、その後の研究で、AhR のノックアウトによるβ-catenin の蓄積については様々な結果が報告され、統一見解を得るに至っていない。

本研究では、AhR KO マウスにおける腫瘍発生について解析し、1) ヒトの腸管の serrated lesion に類似した過形成性の病変を経て腫瘍が発生すること、2) 病変部に特異的にマクロファージ・好中球を主体とする炎症細胞浸潤や IL-1β, IL-6, CCL2, CXCL5 等の発現上昇を伴うこと、3) 病変部における MAPK 経路の活性化を伴うこと、などを明らかにした(Matoba H., et al. (2020) *Am J Pathol* 190 453-468)。しかし本研究者の研究においては、病変が発生したのは 50 週齢までの AhR KO マウスのうちの 40%程度であり、先行研究と比較して発生率は大きく低下していた。この相違は、施設間での腸内細菌叢の違いによる腸管の炎症に対する感受性の違いなどによるものと考えられた。

(2) *Enterotoxigenic Bacteroides fragilis* (ETBF)の腸管における腫瘍発生との関連

ETBF はヒトの下痢症の原因菌であり、また 20-35%程度のヒトの腸管に無症候性に定着していることが知られている。近年、APC^{min/+}マウスにおいて、ETBF の感染が Stat3 の活性化と IL-17 の増加を介して腫瘍発生を促進させることが示された(Wu S., et al. (2009) *Nat Med* 15 1016-1022)。また、ETBF が分泌する metalloprotease である *B. fragilis* toxin (BFT)のヒト大腸癌の細胞株への投与により、E-cadherin の分解を介してβ-catenin の核移行・c-myc の発現・細胞増殖が促進されることが示された(Wu S., et al. (2003) *Gastroenterology* 124 392-400)。これらの結果から、AhR KO マウスにおいても、ETBF の感染が Wnt/β-catenin シグナルの活性化や炎症反応を促進し腫瘍発生を促進させる可能性が考えられた。

これらの知見と成果を背景として、先行研究と本研究者の研究で見られた腫瘍の発生率の違いおよび腫瘍発生の際に活性化されるシグナル伝達経路の違いが、特定の腸内細菌の腸管への感染、特に ETBF の感染・定着によりもたらされた可能性について明らかにするために本研究計画を樹立した。

2. 研究の目的

本研究では、AhR KO マウスの腸管に ETBF を感染させ、この菌が回盲部における腫瘍発生を促進するか否か、促進する場合には腫瘍発生に関わるシグナル伝達経路などに変化が見られるか否かを解析することを目的とした。具体的には下記の2点に焦点を当てた。

(1) AhR KO マウスへの ETBF の持続感染実験系の確立

(2) ETBF 投与の際の AhR KO マウスにおける腫瘍の発生率、発生経路の解析

3. 研究の方法

(1) AhR KO マウスへの ETBF の持続感染実験系の確立

予備的検討により、一般的な菌数(10⁸ 個程度)の ETBF の経口感染では AhR KO マウスの腸管に菌が定着はするものの過剰な炎症によりほとんどのマウスが死亡することが明らかになっていた。したがって、下記の2つの方法を用いて持続的・慢性的な炎症を AhR KO マウスの腸管に引き起こすための感染実験系を確立することを目指した。

AhR KO マウスへの少ない菌数(10⁶-10⁷ 個)の ETBF の経口投与

ETBF を大量投与(10⁸-10⁹ 個)した野生型マウスと無感染 AhR KO マウスとの co-housing による共感染(野生型マウスは ETBF 感染により死亡することはまれであると確認済み)。

しかし後述のように、長期飼育によるマウスの腸内細菌叢の変化や個体の選別などにより、AhR KO マウスの炎症に対する感受性が低下しており、上記の2つの方法では AhR KO マウスに対して ETBF の持続的な感染が成立しないかまたは腸管に十分な炎症が惹起されず、また一般的な菌数(10⁸ 個程度)の ETBF の経口感染によっても必ずしも AhR KO マウスが短期間で死亡しなくなっていることが明らかになった。したがって、最終的には、AhR KO マウスへの ETBF の直接大量投与方法(10⁹ 個程度)を用いて、下記の2つの実験系により解析を行った。

AhR KO マウスへの 10⁹ 個程度の ETBF の隔週 20 回投与(40 週)

AhR KO マウスへの 10⁹ 個程度の ETBF の隔週 3 回、毎週 20 回投与(26 週)

(2) ETBF 投与の際の AhR KO マウスにおける腫瘍発生率の解析

感染実験系の確立の後に、ETBF 感染による AhR KO マウスの回盲部における腫瘍発生の頻度の変化や、腫瘍発生までの期間が短縮されるか否かについて解析した。

4. 研究成果

(1) AhR KO マウスの炎症に対する感受性の低下とそれに伴う実験方法の変更

最初に、AhR KO マウスを死亡させずに ETBF を感染させる方法を確立するため、AhR KO マウスへの少ない菌数 (10^6 - 10^7 個) の ETBF の経口投与、ETBF を大量投与 (10^8 - 10^9 個) した野生型マウスと無感染 AhR KO マウスとの co-housing による共感染、の 2 つの実験系により解析を行った。しかし、少ない菌数の投与では ETBF 感染は検出されなかった。また、共感染では、投与対象の大多数の野生型マウスの便から ETBF を検出することができず、AhR KO マウスに共感染させることができなかった。

予備的検討の際に ETBF の腸管への定着は確認済みのため、野生型マウスおよび AhR KO マウスに ETBF の大量投与 (10^8 - 10^9 個) を試みたところ、AhR KO マウスでは 7-8 割程度に感染が定着するが野生型マウスでは感染の定着はまれであり、感染効率に差があることが分かった。また、この解析の過程で大量投与を行った AhR KO マウスが必ずしも短期間で死亡しないことが明らかになった。長期飼育によるマウスの腸内細菌叢の変化や個体の選別などにより、AhR KO マウスの炎症に対する感受性が低下しているものと推測された。

以上の結果から、実験方法を AhR KO マウスに対する ETBF の直接大量投与法 (10^9 個程度) に変更し、解析を進める方針とした。

(2) AhR KO マウスへの ETBF 直接大量投与法による腫瘍発生の变化

AhR KO マウスに 10^9 個程度の ETBF を 2 週間に 1 回投与する実験系を用いて、ETBF の AhR KO マウスへの感染を確認した。最初に 10^9 個程度の ETBF の隔週 10 回投与 (20 週) を行った。この時点では回盲部に好中球浸潤を認めるものの腫瘍発生前に大きな変化を認めなかった。したがって、ETBF 投与の期間を延長・頻度を増加させ、最終的に下記の 2 つの実験系により解析を行った。

AhR KO マウスへの 10^9 個程度の ETBF の隔週 20 回投与 (40 週)

AhR KO マウスへの 10^9 個程度の ETBF の隔週 3 回、毎週 20 回投与 (26 週)

の実験系では、ETBF 投与の AhR KO マウス 19 匹中 9 匹が、投与後 40 週までに死亡した。残りの 10 匹のうち、2 匹の回盲部に顕微鏡的な過形成を認めた。ETBF 投与の野生型マウス 15 匹中 1 匹が投与後 40 週までに死亡し、残りの 14 匹に病変は認めなかった。ETBF 非投与の AhR KO マウスでは、投与後 40 週の時点で 9 匹中 2 匹が死亡し、残りの 7 匹に病変を認めなかった (図 1)。

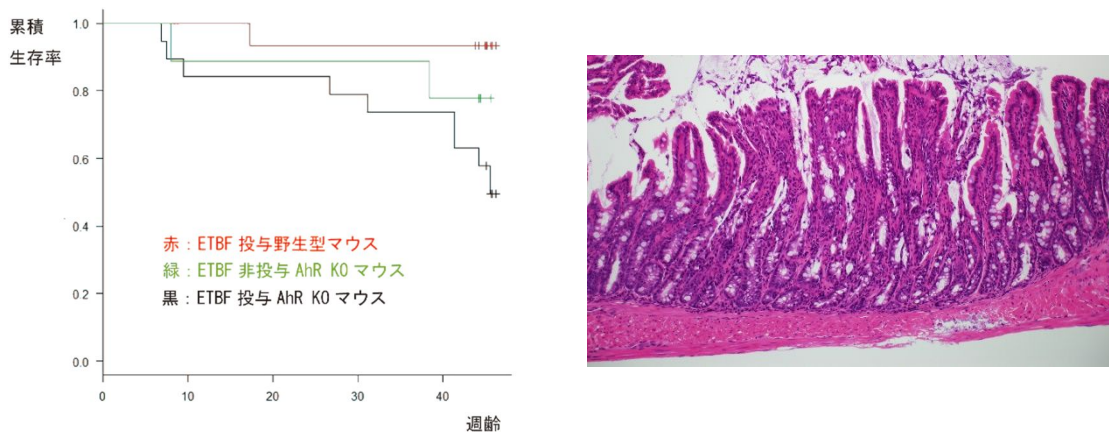


図 1: 隔週 20 回投与の累積生存率、顕微鏡的過形成

の実験系では、ETBF 投与の AhR KO マウス 12 匹中 5 匹が、投与後 26 週までに死亡した。残りの 7 匹のうち、2 匹の回盲部に肉眼的な病変を認めた。組織学的には病変部では過形成と腫瘍の成分が併存し、病変部に特異的にマクロファージ・好中球を主体とする炎症細胞浸潤を伴っていた。この所見は、本研究者らの先行研究で認めた病変と比較して、形態的にほぼ同等のものであった。ETBF 投与の野生型マウス 11 匹の中で投与後 40 週までに死亡したものはおらず、病変はいずれも認めなかった。ETBF 非投与の AhR KO マウスでは、投与後 26 週の時点で 5 匹中 1 匹が死亡し、残りの 4 匹に病変を認めなかった (図 2)。

、のいずれの実験系においても、ETBF 投与の野生型マウス、ETBF 非投与の AhR KO マウスと比較して、ETBF 投与の AhR KO マウスでは死亡率が上昇した。しかしながら、予備的検討と異なり、必ずしも短期間で死亡するわけではなかった。また、生き残ったマウスにおける病変の発生率は ETBF 非投与の AhR KO マウスと比較して上昇していた。これに対して、ETBF

非投与の AhR KO マウスには病変を全く認めず、発生率は本研究者らの先行研究と比較してもさらに低下していた。

以上の結果から、長期飼育によるマウスの腸内細菌叢の変化や個体の選別などにより AhR KO マウスの炎症に対する感受性が低下し、これが ETBF 非投与の AhR KO マウスにおける病変の発生率の低下や、予備的検討の段階と比較した場合の ETBF 投与の AhR KO マウスにおける死亡率の低下をもたらしたと考えられた。また、ETBF の投与は、この感受性が低下した AhR KO マウスにおいて炎症に対する感受性を回復させ、病変の発生率を上昇・回復させることが示唆された。

今後は、本研究者らの先行研究において通常の飼育で病変が発生した際の AhR KO マウス、今回の研究の病変が発生しなかった ETBF 非投与の AhR KO マウス、今回の研究の病変が発生した ETBF 投与の AhR KO マウスの腸内細菌叢の菌の構成を互いに比較し、先行研究から今回の研究の間の腸内細菌叢のどのような変化が炎症感受性および病変発生率の低下をもたらしたのか、また ETBF 投与がどのような機序で低下した炎症感受性・病変発生率を回復させたのかを解析し、AhR KO マウスの回盲部における腫瘍発生と腸内細菌叢との関係について詳細に明らかにすることが課題と考えられる。

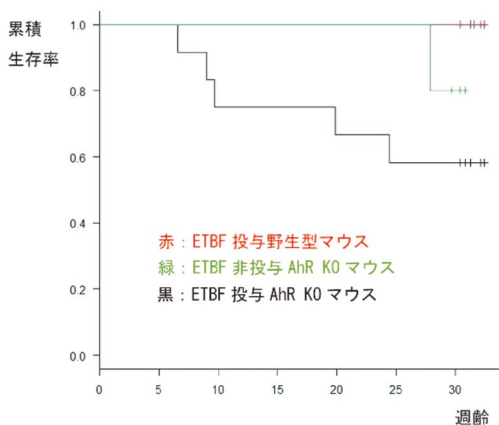


図 2: 隔週 3 回+毎週 20 回投与の累積生存率、肉眼的病変

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matoba H, Takamoto M, Fujii C, Kawakubo M, Kasuga E, Matsumura T, Natori T, Misawa K, Taniguchi S, Nakayama J	4. 巻 190
2. 論文標題 Cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice depends on cecum-specific mitogen-activated protein kinase pathway activation and inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 453-468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.10.005	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 -
1. 著者名 Ohya A, Ichinohe F, Matoba H, Kobara H, Fujinaga Y	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Useful preoperative examination findings to classify the grade of ovarian primary mucinous tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Abdominal Radiology	6. 最初と最後の頁 ahead of print.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00261-020-02918-4	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 -
1. 著者名 Oba T, Ono M, Matoba H, Uehara T, Hasegawa Y, Ito K	4. 巻 186
2. 論文標題 HDAC6 inhibition enhances the anti-tumor effect of eribulin through tubulin acetylation in triple-negative breast cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 37-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10549-020-06033-2	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 -
1. 著者名 Kobayashi J, Kawakubo M, Fujii C, Arisaka N, Miyashita M, Sato Y, Komura H, Matoba H, Nakayama J	4. 巻 118
2. 論文標題 Cholestenone functions as an antibiotic against Helicobacter pylori by inhibiting biosynthesis of the cell wall component CGL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2016469118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2016469118	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 的場久典、高本雅哉、藤井千文、川久保雅友、春日恵理子、松村富穂、名取達矢、三沢健、谷口俊一郎、中山淳
2. 発表標題 Cecal tumorigenesis in AhR-deficient mice depends on cecum-specific MAPK activation and inflammation
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 的場久典、藤井千文、川久保雅友、丸山和晃、中山淳
2. 発表標題 Sirt3-knockdown induces ROS-dependent cell death in MA-10 Leydig tumor cells
3. 学会等名 第110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------