

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09026

研究課題名(和文)新規インドール化合物による腸炎関連大腸癌抑制効果の発見と臨床応用へ向けた基盤研究

研究課題名(英文) Discovering the novel indole compound to suppress colitis-associated colorectal cancer and basic research for clinical application

研究代表者

大沼 忍 (Ohnuma, Shinobu)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70451565

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)：クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患は、経過中に大腸癌を発症することがあり、腸炎関連大腸癌(Colitis-associated cancer:CAC)と総称されている。申請者は、新規インドール化合物 MA-35 がマウスモデルにおいて大腸の炎症と癌を抑制することを発見した。本研究では、1) MA-35は薬物排泄トランスポーターのABCB1、ABCG2の基質ではないこと、2) 大腸癌細胞株で細胞毒性試験によりMA-35の細胞毒性は低いこと、3)AOM/DSS マウスモデルにおいてMA-35 投与により腸管免疫細胞のフェノタイプは変化しないことなどが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患患者は長期罹患中に腸炎関連大腸癌を発症することがあり、腸炎関連大腸癌は炎症性腸疾患患者の死因の一つになっている。日本発の化合物であるMA-35 は、炎症性発癌マウスモデルにおいて大腸の炎症および発癌を抑制することが知られている。本研究においてMA-35は薬物排泄トランスポータに排泄されず、細胞毒性が少ないことが明らかとなった。更なる解析が必要だがMA-35による腸炎関連大腸癌の抑制メカニズムが明らかとなれば、MA-35を炎症性腸疾患に発症する腸炎関連大腸癌の予防薬として、さらに炎症性腸疾患の治療薬として臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis may develop colon cancer, so called colitis-associated cancer (CAC). We discovered that a novel indole compound, MA-35, suppressed colonic inflammation and cancer in a mouse model. In this study, 1) MA-35 is not a substrate for the drug excretion transporters ABCB1 and ABCG2, 2) cytotoxicity of MA-35 is low in colorectal cancer cell lines, and 3) in AOM/DSS mouse model, administration of MA-35 did not change the phenotype of intestinal immune cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：インドール化合物 腸炎関連大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Mitochonic acid 35 (MA-35) は、腎臓病患者の血中腎不全物質を解析する過程で同定され、ATP やエリスロポエチン産生亢進作用を持つ本邦で開発されたインドール化合物誘導体であり、抗炎症作用、抗線維化作用があることが報告されていた (Shima H, Abe T. *Sci. Rep.* 2017)。また、我々は、azoxymethane/dextran sulfate sodium (AOM/DSS) マウスモデルを用いた炎症性発癌の研究を開始により、炎症性サイトカインである TNF-a を抑制する Infliximab が、同モデルにおいて腸炎関連大腸癌 colitis-associated cancer (CAC) の発生を抑制することを確認していた (Ohnuma S. *Cancer Res.* 2019)。以上より、抗炎症作用のある MA-35 が CAC の発症を抑制するかもしれないと着想し、実際に、MA-35 が、AOM/DSS による炎症性発癌マウスモデルでの発癌を抑制することを確認、その抑制メカニズムの一端を解明し報告した (Kanehara K, Ohnuma S, Kanazawa Y, Naitoh, Abe T. *Sci Rep*, 2019)。しかし、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) 患者での腸炎を生じた粘膜では、腸内細菌叢の破綻、それに続く免疫系の異常などの因子が複雑に影響しながら癌化にいたると考えられており、MA-35 がどのようなメカニズムで大腸癌を抑制しているのか全容は不明であった。このため、本研究で、MA-35 がそれらの因子にどのように影響するのか明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

AOM/DSS マウスモデルにおいて、MA-35 投与により変化する腸管免疫細胞のフェノタイプ、薬物動態、癌細胞株に与える影響、腸内細菌叢のプロファイル、を解析する。

3. 研究の方法

(1) 腸管免疫細胞フェノタイプの解析

犠死後のマウスから、腸管膜リンパ節 (MLN)、大腸粘膜固有層単核球 (LPMC)、脾臓を採取し、氷冷後、迅速に cell isolation を行う。その後、cell staining を行い、フローサイトメトリで解析した。

(2) メタボローム解析

LC-MS を用い、クレアチニン、メチルアデノシン、トリメチルアミン N オキシド、フェニルサルフェイト、クロロフェニルサルフェイト などの腸内細菌叢による血中代謝物を計測した。

(3) 薬物動態解析

MA-35 の薬物動態解析の一環として、消化管上皮に発現する ABC transporter (ABCB1, ABCG2) が MA-35 を基質とするかどうか ABC transporter 発現細胞株を用い FACS による薬剤排出試験を行った。

(4) 細胞毒性試験

MA-35 が大腸癌細胞株に与える影響を解析した。

(5) 腸内細菌叢プロファイルの解析 (ICR マウス:各群 n=6)

4 群を設定 (コントロール、MA-35 群、AOM/DSS 群、AOM/DSS/MA-35 群)。70 日後の糞便サンプルから、各群の腸内細菌叢のプロファイルを比較検討する。腸内細菌叢解析は 16S rRNA 解析を行う。本解析により細菌の多様性を評価し、包括的な種を検出する。

4. 研究成果

(1) 腸管免疫細胞フェノタイプの解析

犠死後のマウスから、腸管膜リンパ節 (MLN)を採取し、フローサイトメトリで解析し、コントロール群と MA-35 投与群を比較した。FoxP3 陽性細胞、CD3/CD4 陽性細胞、CD3/CD8 陽性細胞の割合に両群間で明らかな有意差を認めなかった。

(2) メタボローム解析

LC-MS を用い、クレアチニン、メチルアデノシン、トリメチルアミン N オキシド、フェニルサルフェイト、クロロフェニルサルフェイト などの腸内細菌叢による血中代謝物を計測した。コントロール群と MA-35 投与群において有意な差のある代謝物は同定されなかった。

(1), (2)で差が認められなかった理由として、誘発剤を使用し発癌マウスモデルを作成しており、誘発剤による腸内細菌叢への影響、日内変動や食事の影響などが関係している可能性が示唆された。

(3) 薬物動態解析

細胞株として、子宮頸がん細胞株の KB3-1、その ABCB1 発現細胞株である KBV-1、また慢性骨髄性白血病細胞株である K562 と、ABCBG2 発現細胞株である K562/BCRP を用いた。その結果、MA-35 (25, 50 μ M)は ABCB1、ABCG2 の基質輸送機能に影響しないことが明らかとなった。

(4) 細胞毒性試験

大腸癌細胞株 (HCT116)を用い、MTS アッセイによる細胞毒性試験を行った。結果、MA-35 の IC₅₀ は 100 μ M であり、MA-35 の細胞毒性は低いものと考えられた。また、スクラッチアッセイでは、MA-35 (25, 50 μ M)は大腸癌細胞の遊走能に影響しないことが明らかとなった。

(5) MA-35 がマウス腸内細菌叢に与える影響を解析するため、炎症性発癌マウスモデルである AOM/DSS マウスモデルに MA-35 を投与し、糞便を採取、保存、16S rRNA 解析による腸内細菌叢解析を行う準備を行なった。本実験結果は得られておらず、今後腸内細菌叢解析を行う予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang DY, Ohnuma S, Suzuki H, Ishida M, Ishii K, Hirotsawa T, Hirashima T, Murakami M, Kobayashi M, Kudoh K, Haneda S, Musha H, Naitoh T, Unno M.	4. 巻 45
2. 論文標題 Infliximab Inhibits Colitis Associated Cancer in Model Mice by Downregulating Genes Associated with Mast Cells and Decreasing Their Accumulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Curr Issues Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 2895-2907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cimb45040189.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大沼 忍、金原圭吾、唐澤秀明、市川英孝、小林 実、梶原大輝、神山篤史、渡辺和宏、田山穂高、杉沢徳彦、土屋堯裕、井本博文、山村明寛、田中直樹、森川孝則、亀井 尚、阿部高明、海野倫明
2. 発表標題 インドール化合物による炎症性発癌抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第76回日本大腸肛門病学会学術集会 ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼 忍、金原圭吾、海野倫明
2. 発表標題 Elucidation of mechanism that an indole compound attenuates colitis associated cancer
3. 学会等名 第28回日本消化器病関連週間（神戸）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がんの予防又は治療剤	発明者 阿部高明、大沼 忍、海野倫明、林 謙一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/013411	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	内藤 剛 (Naitoh Takeshi) (50291258)	北里大学・医学部・教授 (32607)	
研究分担者	金澤 義丈 (Kanazawa Yoshitake) (60779726)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	阿部 高明 (Abe Takaaki) (80292209)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	

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