

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22829

研究課題名(和文) WntシグナルによるABCC3・胆汁酸を介した新規大腸癌発癌機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism of colon carcinogenesis mediated by ABCC3 and bile acids via Wnt signaling pathway

研究代表者

小林 実 (Kobayashi, Minoru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40885547

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)：WntシグナルによるABCC3の発現抑制が腺腫で起こっていることを確かめる目的で、家族性大腸腺腫症患者の正常大腸粘膜組織と腺腫組織におけるABCC3の発現を確認した。その結果、腺腫においてABCC3の発現が低下していることを確認した。次に、大腸癌発癌作用のあるデオキシコール酸をニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)で蛍光標識した化合物をABCC3過剰発現大腸癌細胞株(SW620)に投与した結果、過剰発現細胞株で有意に蛍光強度が低下していた。以上の結果から、ABCC3がWntシグナルによる発現制御を受けることでデオキシコール酸の細胞内濃度を変化させ、大腸癌発癌に関与してい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

家族性大腸腺腫症(FAP)はAPC遺伝子に変異を有する常染色体優性遺伝病であり、未治療であれば60歳までにほぼ100%の患者が進行大腸癌を発症する。その標準的な治療方針は若年期に予防的大腸切除術を行うことであり、大腸切除後のQuality of lifeの低下は、その後の生活に多大な影響を与える。今回、我々は腺腫におけるWntシグナルによるABCC3の発現抑制、さらには細胞内デオキシコール酸濃度の変化に関する新たな知見を解明した。この結果は、FAP患者における腺腫の癌化抑制につながる可能性があり、この新規知見をより詳細に検討・解明していくことで新規治療法につなげたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：First, to confirm that Wnt signaling pathway suppresses ABCC3 expression in colon adenomas, we checked ABCC3 expression in normal colonic mucosa and adenoma tissue from patients with familial colorectal adenomatosis. As a result, we confirmed that ABCC3 expression was decreased in adenomas. Next, deoxycholic acid fluorescently labeled with nitrobenzoxadiazole (NBD) was administered to an ABCC3-overexpressing colon cancer cell line (SW620), and the fluorescence intensity was significantly reduced in the ABCC3-overexpressing cell line. These results suggest that ABCC3 is involved in colon carcinogenesis by altering the intracellular concentration of deoxycholic acid through regulation of its expression by Wnt signaling.

研究分野：大腸癌

キーワード：ABCC3 MRP3 Wntシグナル 大腸癌 デオキシコール酸 ABCトランスポーター 家族性大腸腺腫症 胆汁酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌の発癌過程は、adenoma-carcinoma sequence による発癌と de novo 発癌が知られており、さらに近年 serrated polyp pathway が関連していることが明らかになってきている。この中で adenoma-carcinoma sequence は、大腸癌発癌の大部分に関与しているとされ、癌化に関わる様々な遺伝子に多段階的な変異が生じることによって、大腸正常上皮が腺腫を経て徐々に癌化する様式である。一方で、全ての大腸癌に規則正しく段階的な変異が起こるというわけではなく、より複雑な機構が存在していることが示唆され、その解明が大腸癌の予防・治療のための重要な課題である。

(2) 薬剤排出ポンプとして機能する ABC トランスポーターは、ヒトでは 48 種類が存在している。申請者はこれまで、大腸正常組織と癌組織のトランスクリプトームを調べ、両者の発現プロファイルを比較する中で、ABCC3 遺伝子の発現が大腸癌では低下していること、また免疫組織化学により大腸癌組織において ABCC3 蛋白の発現も低下していること、さらには adenoma-carcinoma sequence の初期段階である Wnt シグナルの活性化によって ABCC3 の発現が抑制されることを明らかにした。

(3) しかし、大腸正常組織が癌化する過程で、Wnt シグナル活性化によって ABCC3 の発現が抑制されることの生物学的意義は何か、Wnt シグナルによる ABCC3 の発現抑制と多段階発癌機構との関連性はあるのか、については不明であり、これが本研究課題の学術的な問いである。

2. 研究の目的

本研究は、Wnt シグナルによる ABCC3 の発現抑制が、大腸癌の多段階発癌機構に与える影響を明らかにすることを目的とする。特に、ABCC3 が胆汁酸排出トランスポーターとして働くことに着目し、ABCC3 の発現変化が胆汁酸の細胞内濃度に与える影響、さらには二次胆汁酸であるデオキシコール酸が MAPK シグナルに与える影響を検証する。

3. 研究の方法

(1) まず、これまで明らかにした大腸癌における Wnt シグナルによる ABCC3 の発現抑制が、前癌病変である腺腫の段階で既に起こっていることを確かめる目的で、家族性大腸腺腫症 (FAP) 患者の正常大腸粘膜組織と腺腫組織から total RNA を抽出し、RT-qPCR によって ABCC3 の発現を確認した。また、免疫組織化学を行い、蛋白レベルでの発現量の変化も確認した。

(2) また、公開されている次世代シーケンサーのデータベースを利用し、FAP モデルマウス (APC min/+ マウス) の正常腸管上皮組織、腺腫由来のオルガノイドにおける ABCC3 遺伝子の発現変化を解析した。

(3) 次に、ABCC3 発現変化による細胞内胆汁酸濃度と MAPK シグナルへの影響を解明する目的で、レンチウイルスベクターを用いた ABCC3 過剰発現大腸癌細胞株 (HCT-15, HCT116, SW620) ならびにノックダウン細胞株 (HT-29) を作成した。

(4) また、二次胆汁酸の中で大腸癌発癌作用の知られているデオキシコール酸をニトロベンゾオキサジアゾール (NBD) で蛍光標識した化合物を上記細胞株に投与することで ABCC3 発現変化に伴う細胞内胆汁酸濃度への影響について検討した。

(5) さらに、これらの細胞株を対象にして RNA-seq を施行し、ABCC3 過剰発現・ノックダウンが ABCC3 以外の胆汁酸トランスポーターの発現に影響しないかどうかを確かめた。

4. 研究成果

(1) FAP 患者の腺腫において正常組織と比較して ABCC3 の発現が低下していることが確認できた ($p=0.049$)。また、免疫組織化学においても蛋白レベルで同様の発現変化を確認できた。

(2) FAP モデルマウスの腺腫から作成したオルガノイドにおいても、正常組織から作成したオ

ルガノイドと比較して ABCC3 の有意な発現 低下を認めた($p < 0.01$)。

(3) それぞれ作成した過剰発現細胞株・ノックダウン細胞株において、ABCC3 の発現が亢進・ノックダウンされていることを RT-qPCR と Western Blotting を用いて確認した。

(4) NBD で標識したデオキシコール酸を ABCC3 過剰発現大腸癌細胞株 (SW620) に投与した結果、過剰発現させていない Control の細胞株と比較して、過剰発現細胞株で有意に蛍光強度が低下していた。

(5) 現在解析を進めている段階である。

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