

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700448

研究課題名（和文） モデルマウスを用いた IL-1/IL-17 システムによる大腸がん
促進機構の解析研究課題名（英文） Analysis of IL-1/IL-17 system-dependent promoting mechanisms
for development of colon cancer using model mice.

研究代表者

角田 茂 (KAKUTA SHIGERU)

信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・助教

研究者番号：80345032

研究成果の概要（和文）：大腸がんのモデル動物である *Apc*^{Min} マウスを用いて、代表的な炎症性サイトカインである IL-1/IL-17 ファミリー分子の腸管ポリープ形成における役割について解析を行った。その中で、IL-17A と-17F は遺伝子欠損により腸管ポリープ形成が抑制されること、中和抗体の投与は腸管ポリープ形成の抑制効果があることを見出した。本研究により、IL-17A/F はポリープ形成促進作用を持ち、さらに大腸がん治療の分子標的になり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of pro-inflammatory cytokines, IL-1/IL-17 family members, in development of intestinal polyps, the molecular mechanisms were analyzed using *Apc*^{Min} mice, as a model of colon cancer. We found that deficiency of IL-17A and/or IL-17F in *Apc*^{Min} mice caused suppression of intestinal polyp formation, and administration of neutralizing antibodies against IL-17A and/or IL-17F reduced development of polyps. These results suggest that endogenous IL-17A/F promote polyp formation and neutralizing antibodies are applied to therapeutic agent for colon cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル、大腸がん、サイトカイン、IL-17、IL-1

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、近年の食生活の欧米化などにより罹患率が大きく上昇しており、その予防法および治療法の開発が強く求められている。そのため、がん発症の前段階である腸管ポリープ形成機構の理解はこれらの開発に必要な不可欠であると考えられる。

Apc^{Min} マウスは 1992 年に Dove らにより見

出された優性突然変異マウスであり、加齢に伴って腸管全域にポリープを自然発症する。大腸がん発生において極めて重要ながん抑制遺伝子である *Apc* 遺伝子のコドン 850 部分に終止コドンとなる変異を持っている。同様に *APC* 遺伝子に変異を持つヒト遺伝性疾患「家族性大腸腺腫症」のマウスモデルマウスとして、腸管ポリープ形成機構の解析に広く

用いられている。

一方、我々は多彩な生理作用を持つ炎症性サイトカインに注目し、かねてより遺伝子欠損マウスを用いてその抗腫瘍および感染防御作用について研究を行ってきた。世界に先駆けてインターロイキン (IL) -17F 欠損および IL-17 (A) /IL-17F 二重欠損マウスの樹立・解析を行い、IL-17A は炎症性疾患の惹起に中心的な役割を担うのに対して、IL-17F の作用は粘膜組織にかなり限局していることを見出すなど成果を挙げている (Ishigame, Kakuta *et al*, *Immunity* 2009)。

そのような中で、IL-1 の内在性の抑制性調節因子である IL-1 レセプターアンタゴニスト (ra) が Apc^{Min} マウスにおける腸管ポリープ形成を抑制していることを見出した。すなわち、交配により作出した IL-1ra 遺伝子を欠損 ($Il1rn^{-/-}$) した Apc^{Min} マウスでは、ポリープ形成が増悪化する。この $Apc^{Min}-Il1rn^{-/-}$ マウスにおけるポリープ形成促進の分子機構を明らかにするために、ポリープ局所における遺伝子発現について検討を行った。リンパ系細胞では $Il1rn^{-/-}$ マウスにおいて IL-17 産生が強く誘導されるなど、IL-1 の下流に IL-17 が位置していることは知られていたが、 $Apc^{Min}-Il1rn^{-/-}$ マウスの腸管ポリープ局所において IL-17A に加えて IL-17F の発現がポリープ形成に伴い顕著に増加することを見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、疾患モデルマウスおよび遺伝子欠損マウスを用いることにより IL-1 および IL-17A/F のシグナルによる腸管ポリープ形成制御の分子機構を明らかにする。そして最終的には、ヒトの大腸がんの予防・治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

これまでに我々が独自に作出した IL-1/IL-17 ファミリー遺伝子欠損マウスと Apc^{Min} マウスを掛け合わせて作出した多重変異マウスにおける腸管ポリープ形成能を評価する。そして、これらのマウスのポリープ局所における遺伝子発現や細胞増殖、アポトーシス、血管新生の頻度などを組織学的に検討することにより、IL-1/IL-17 シグナルによる腸管ポリープ形成促進作用の分子機構の解析を行う。

さらに、これらサイトカインがポリープ形成に関与することが認められた場合は、 Apc^{Min} マウスに対して中和抗体投与による治療実験を行うことにより、治療の分子標的として

の評価を行う。

4. 研究成果

$Apc^{Min}-Il17a^{-/-}Il17f^{-/-}$ マウスにおいて腸管ポリープ形成が有意に減少することを見出した。一方、 $Apc^{Min}-Il17a^{-/-}$ 、 $Apc^{Min}-Il17f^{-/-}$ いずれのマウスでも腸管ポリープ形成の減少が認められたが、 $Apc^{Min}-Il17a^{-/-}Il17f^{-/-}$ マウスには及ばず、IL-17A と IL-17F のそれぞれがポリープ形成に促進的役割を担っていることが示唆された。これまで、IL-17A と発がんの関連は様々な研究者により報告がなされているが、IL-17F が発がんに関与することを明確に示した例はなく、極めて新規性の高い知見と考えられる。さらにこのとき、免疫染色によりポリープ局所におけるこれらサイトカインの発現を検討したところ、IL-17A は浸潤細胞領域でのみ発現が認められるのに対して、IL-17F は浸潤細胞のみならず腺腫細胞自身も発現していることがわかった。また、 $Apc^{Min}-Il17a^{-/-}Il17f^{-/-}$ マウスのポリープ局所ではアポトーシスの顕著な亢進は認められないものの、増殖細胞数は有意に低下していることがわかった。続いて血管新生について検討してみたところ、IL-17A/F 欠損では血管新生が低下しており、VEGF の有意な産生低下も認められた。これらのことから、IL-17A/F は VEGF 産生誘導を介して血管新生を促進させ、結果として腸管ポリープ形成を増悪化させていると考えられた。

そこで、IL-17A と IL-17F それぞれに対する中和抗体を用いて Apc^{Min} マウスに対する治療実験を試みた。4 ヶ月齢時点より単独あるいは併用で6回、腹腔に投与したところ、大型のポリープ形成を有意に抑制することができた。このとき、遺伝子欠損マウスの結果と一致して、抗 IL-17A/F 中和抗体併用投与の方が、単独投与よりも効果が高く、IL-17A/F の両方のシグナルをブロックすることが重要であることがわかった。

一方、 $Apc^{Min}-Il1rn^{-/-}$ マウスの結果から IL-1 の過剰シグナルがポリープ形成に促進的に作用することがわかっていたが、これは1型受容体 (IL-1R1) を介したシグナルの可能性を見出した。一方、IL-1ra には2つのアイソフォームが存在するが、これらの役割については現在検討を進めているところである。

これらの結果から、IL-1/IL-17 のシグナル、その中でも特に IL-17A と IL-17F は大腸がん治療の分子標的として極めて有望であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich BG, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood*, 119: e45-e56, 2012, 査読有, DOI: 10.1182/blood-2011-09-381400
- ② Nakamura Y, Terahara M, Iwamoto T, Yamada K, Asano M, Kakuta S, Iwakura Y, Totsuka M. Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor expression by the heat-inactivated potential probiotic *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 in a mouse intestinal explant model. *Scand J Immunol*, 75: 176-183, 2012, 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02645.x.
- ③ 角田茂, 西城忍. 真菌免疫応答におけるC型レクチン受容体の役割. *化学療法の領域*, 28: 59-66, 2012, 査読無, https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=24220
- ④ Yan H, Kakuta S, Nishihara M, Sugi M, Adachi Y, Ohno N, Iwakura Y, Tsuji NM. *Kjellmaniella crassifolia* Miyabe (Gagome) Extract Modulates Intestinal and Systemic Immune Responses. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75: 2178-2183, 2011, 査読有, DOI: 10.1271/bbb.110473
- ⑤ Yokoyama K, Tezuka T, Kotani M, Nakazawa T, Hoshina N, Shimoda Y, Kakuta S, Sudo K, Watanabe K, Iwakura Y, Yamamoto T. NYAP: a phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signalling in neurons. *EMBO J*, 30: 4739-4754, 2011, 査読有, DOI: 10.1038/emboj.2011.348.
- ⑥ Ogawa M, Yoshikawa Y, Kobayashi T, Mimuro H, Fukumatsu M, Kiga K, Piao Z, Ashida H, Yoshida M, Kakuta S, Koyama

- T, Goto Y, Nagatake T, Nagai S, Kiyono H, Kawalec M, Reichhart JM, Sasakawa C. A *tecpr1*-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*, 9: 376-389, 2011, 査読有, DOI: 10.1016/j.chom.2011.04.010
- ⑦ Nakajima A, Matsuki T, Komine M, Asahina A, Horai R, Nakae S, Ishigame H, Kakuta S, Saijo S, and Iwakura Y. TNF, but Not IL-6 and IL-17, Is Crucial for the Development of T Cell-Independent Psoriasis-Like Dermatitis in *Il1rn*^{-/-} Mice. *J Immunol*. 185: 1887-1893, 2010, 査読有, DOI: 10.4049/jimmunol.1001227
 - ⑧ Hadano S, Yoshii Y, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Pan L, Kakuta S, Iwasaki Y, Iwakura Y, and Ikeda JE. Genetic background and gender effects on gross phenotypes in congenic lines of ALS2/alsin-deficient mice. *Neurosci Res*. 68: 131-136, 2010, 査読有, DOI: 10.1016/j.neures.2010.06.004
 - ⑨ Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, Fujikado N, Kusaka T, Kubo S, Chung SH, Komatsu R, Miura N, Adachi Y, Ohno N, Shibuya K, Yamamoto N, Kawakami K, Yamasaki S, Saito T, Akira S, and Iwakura Y. Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity*. 32: 681-691, 2010, 査読有, DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.001

[学会発表] (計 12 件)

- ① 角田茂, 腸管ポリープ形成における IL-17 ファミリーの役割, 平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」班 ワークショップ, 2012.1.18-19, 大津
- ② 角田茂, 遺伝子改変マウスを用いた IL-17A/F の感染・炎症・発がんにおける役割の解析, 第 30 回信州免疫アレルギー懇話会, 2011.12.21, 松本
- ③ Shigeru Kakuta, *Apc*^{Min} マウスの腸管ポリープ形成における IL-17A および IL-17F の役割, 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 2011.11.27-29, 幕張
- ④ 角田茂, 遺伝子改変マウスを取り巻く最近の動向と基礎医学研究への応用, 信州実験動物研究会第 76 回勉強会, 2011.10.21, 松本

- ⑤ 角田茂, 疾患モデルマウスを用いた腸管ポリープ形成における IL-17A および IL-17F の役割の解析, 第 58 回日本実験動物学会総会, 2011. 5. 25-27, 江戸川
- ⑥ Shigeru Kakuta, The role of IL-1 and 17 family genes in development of intestinal polyps, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会), 2010. 12. 7-10, 神戸
- ⑦ Shigeru Kakuta, IL-17A and IL-17F are important for the development of intestinal polyps in APC^{MIN} mice by accelerating blood vessel formation. 8th Joint Conference of the ICS and ISICR, Cytokines 2010, 2010. 10. 3-7, Chicago
- ⑧ Shigeru Kakuta, Generation and analysis of oligoadenylate synthetase family genes-deficient mice. 14th International Congress of Immunology, 2010. 8. 23-27, Kobe
- ⑨ 角田茂, インターロイキン-17 の腸管ポリープ形成における役割の解析, 第 5 回核酸・核タンパク機能性研究会学術集会, 2010. 8. 6, 恵庭
- ⑩ 角田茂, 発生工学的アプローチによる IL-17 ファミリーを中心としたサイトカインの機能解析, 東海医学会講演会・例会, 2010. 7. 13, 伊勢原
- ⑪ 角田茂, 腸管ポリープ形成における IL-17 の役割の検討, 第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2010. 6. 25-26, 小倉
- ⑫ 角田茂, 東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センターにおける遺伝子改変マウスの供給について, 第 57 回日本実験動物学会総会, 2010. 5. 12-14, 京都

[図書] (計 3 件)

- ① 山村研一, 若菜茂晴 (編). 中山書店. 論文ができてしまう! 疾患モデルマウス表現型解析指南, 2011, pp. 316-321, 451-454
- ② 岩倉洋一郎 (編). エル・アイ・シー. series モデル動物利用マニュアル 免疫疾患 - 疾患モデルの作製と利用 -, 2011, pp. 215-222.
- ③ 松村正實, 山本雅, 岡崎康司 (編). 羊土社. 改訂第 5 版 新 遺伝子工学ハンドブック, 2010, pp. 289-296, 297-302.

[その他]

ホームページ (研究成果)

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.jp/vpplu.html>

ホームページ

<http://www.shinshu-u.ac.jp/institution/hito/i-animal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 茂 (KAKUTA SHIGERU)

信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・助教

研究者番号 : 80345032