

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590941

研究課題名(和文)炎症性腸疾患大腸発癌における低分子量GTP結合蛋白Ralの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of small GTP binding protein Ral in colitis-associated cancer

研究代表者

仲瀬 裕志(Nakase, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60362498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性大腸癌機序における低分子量GTP結合蛋白Ralの役割を検討した。Ral-GAP 2 KOマウス(Ralが活性化されている)では大腸粘膜内の炎症性サイトカインの発現が上昇していた。IL-10Ral-GAP 2 Double KOマウスでは、IL-10KOマウスに比し早期に腸炎が誘導された。さらに、RaGAP 2 KOマウスを用いてazoxymethane +デキストラン硫酸投与による炎症性大腸癌誘導モデルを作製した。野生型マウスに比べ、RaGAP 2 KOマウスでは浸潤型大腸癌が多く観察された。以上より、Ralの活性化は自然免疫系ならびに、大腸腫瘍の浸潤能獲得に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the role of Small GTP binding protein Ral in development of colitis-associated cancer (CAC). We used Ral-GAP 2 KO mice (Ral continuously activated) for this study. The gene expression of pro-inflammatory cytokines was significantly up-regulated in colonic mucosa of Ral-GAP 2 KO mice than in wild type mice. Interestingly, Ral activation accelerated colonic inflammation of IL-10KO mice. In addition, we made CAC model by the injection of azoxymethane (AOM) with repeated administration of dextran sulfate sodium (DSS). The number of CAC with submucosal invasion was higher in Ral-GAP 2 KO mice treated with AOM and DSS than in wild type mice. These data indicate that Ral is involved in innate immune system and providing invasive phenotype in CAC.

研究分野：消化器病学

キーワード：炎症性腸疾患 炎症性大腸発がん Ral 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

(1)クローン病や潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: 以下 IBD) は近年増加の一途をたどっており、また若年者に多く発症するため生涯治療の継続が必要とされる難治性疾患である。その原因については明らかではなく、いまだ根本的治療は確立されていない。IBD の長期経過症例では、腸炎を背景とした大腸癌を合併するリスクが高くなることが知られている。近年、日本においても患者数の増加傾向に伴い癌化例の報告が急増している。従って、その発癌メカニズムを解明することは臨床上重要な課題の1つである。

(2)慢性腸管炎症部位にはマクロファージやリンパ球が浸潤し、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 等を産生する。サイトカインの持続的な産生は、上皮細胞や間質細胞内での NF- κ B を誘導し、炎症性発癌に寄与するものと考えられる。従って、IBD 関連発癌機序の解明には炎症と細胞増殖の両者に関する分子の解析が重要である。

(3) Ras family の一つである Ral はいくつかのエフェクター分子を介して、種々の細胞機能を制御していることがわかってきている。Ral の GEF は 6 遺伝子同定されておりそのうち 4 つは、ヒト癌で高頻度に活性型変異を来し、癌化・癌悪性化に重要な働きをしていると報告されている。さらに、Ral は I κ B キナーゼのひとつである TBK1 の活性化を介して NF κ B を活性化することで、免疫反応を賦活化するだけでなく、アポトーシスを阻害することが報告された。このように、Ral は細胞癌化や浸潤・転移に重要な役割を果たし、炎症にも深く関わっている重要な分子である。

2. 研究の目的

IBD 発癌機序における Ral の役割および腫瘍悪性度評価マーカーへの臨床応用についての研究に取り組む。

3. 研究の方法

(1)Ral による腸管炎症の誘導機構の解明：東北大学堀内教授から供与いただいた Ral-GAP α 2KO マウスを用いて実験を行う。Ral-GAP α 2KO マウスおよび野生型マウスに対してデキストラン硫酸(DSS)投与による急性腸炎モデルを作製、また野生型マウス、Ral-GAP α 2KO マウス脾細胞から CD4(+) CD62L(+)を抽出、Rag2KO に移入し、腸炎を惹起する。腸炎誘導後の大腸組織の炎症を両群間で比較検討する。Ral-GAP α 2KO マウスを自然腸炎発症マウスである(IL-10KO マウス)と交配させ、腸炎の発症における Ral の関与を検討する。

(2)炎症性大腸発癌機構における Ral の役割：マウスに Azoxymethane 2.5mg/kg を腹腔内投与後、2.5%デキストラン硫酸の経口投与(1週間投与：2週間休薬)を3サイクル繰

り返すことにより、約8週後に炎症性大腸癌を誘導することができる。この実験系を用いて、Ral の炎症性発癌に關与する役割を検討する。

4. 研究成果

(1) Ral-GAP α 2 KO マウスは大腸炎症を惹起する。Ral-GAP α 2 KO マウスと野生型マウスの大腸組織を比較したところ、明らかな違いは認められなかった。しかしながら、組織中の炎症性サイトカインの発現を比較した結果、下図に示す如く、Ral-GAP α 2 KO マウスでは定常状態で各種サイトカインの発現上昇が確認された。加えて、DSS 投与により大腸炎を誘導した結果、Ral-GAP α 2 KO マウスでは野生型マウスに比し、腸管長の短縮、腸炎の増強が確認された。

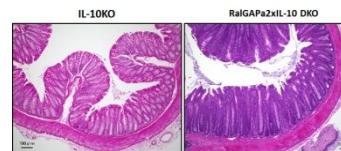
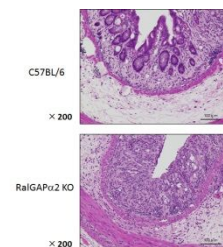
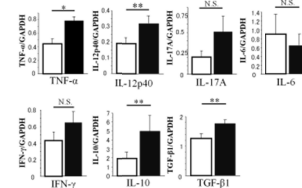
Ral-GAP α 2 KO マウスと野生型マウスの脾細胞から抽出した CD4(+) CD62L(+)の移入により腸炎は惹起されたが、組織学的には差が認められなかった。しかしながら、IL-10Ral-GAP α 2 Double KO では、IL-10KO マウスに比し、早期に腸炎が誘導されることが明らかとなった。以上のことから、Ral-GAP α 2 による Ral 発現増強は acquired immunity よりむしろ innate immunity 活性化に關与することが明らかとなった。

(2) RAL 活性化は炎症性大腸癌の浸潤能獲得に寄与する。

Ral-GAP α 2 KO マウス用いて AOM+デキストラン硫酸投与による炎症性大腸癌誘導モデルを作製した結果、野生型マウスに比べ、Ral-GAP α 2 KO マウスでは Colitic cancer 類似の浸潤型の大腸癌が観察された。粘膜下浸潤傾向を有した腫瘍数は、野生型に比べて Ral-GAP α 2 KO マウスで有意に多く認められた。本研究結果より、Ral の活性化は自然免疫系に關与することが明らかとなった。本知見はまったく報告されておらず、免疫系における Ral 活性化の重要性を示唆するものである。また Ral 活性化は、腫瘍浸潤に強く關与することも示唆する所見を得ること証明された。本結果から、生検組織中の Ral 活性化検出は、炎症性腸疾患関連大腸癌の早期診断法開発に寄与する可能性が高い。

<引用文献> なし

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 10件)

Minami N, Yoshino T, Matsuura M, Koshikawa Y, Yamada S, Toyonaga T, Madian Ali, Honzawa Y, Nakase H. Tacrolimus or infliximab for severe ulcerative colitis: short and long-term data from a retrospective observational study. *BMJ Open Gastroenterology*. 査読有, 2015; 1: e000021. doi:10.1136/bmjgast-2014-000021.

Okada K, Arai S, Nakase H, Kohno H, Nakamura F, Takeda M, Toda Y, Itoh H, Adachi S, Ikemoto M. Autocrine pathways involving S100A8 and/or S100A9 that are postulated to regulate the immunological functions of macrophages in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2015; 456: 415-420. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.099.

Fukuchi T, Nakase H, Ubukata S, Matsuura M, Yoshino T, Toyonaga T, Koga H, Eguchi T, Yamashita H, Ito D, Ashida K. Therapeutic effect of Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis Combined with Thiopurines for Steroids and Biologics Naïve Japanese Patients with Early-Diagnosed Crohn's Disease. *BMC Gastroenterol*. 査読有, 2014; 13: 124. doi: 10.1186/1471-230X-14-124.

Yamada S, Yoshino T, Minami N, Toyonaga T, Honzawa Y, Matsuura M, Nakase H. Long-term efficacy of infliximab for refractory ulcerative colitis: results from a single center experience. *BMC Gastroenterol*. 査読有, 2014; 14: 80. doi: 10.1186/1471-230X-14-80.

Honzawa Y, Nakase H, Shiokawa M, Yoshino T, Imaeda H, Matsuura M, Kodama Y, Ikeuchi H, Andoh A, Sakai Y, Nagata K, Chiba T. *Gut*. 査読有, 2014; 63: 1902-1912. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305632.

Yoshino T, Nakase H, Minami N, Yamada S, Matsuura M, Yazumi S, Chiba T. Efficacy and safety of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for ulcerative colitis: A meta-analysis. *Dig Liver Dis*. 査読有, 2014; 46: 219-226. doi: 10.1016/j.dld.2013.10.011.

Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Higuchi H, Toyonaga T, Matsumura K, Yoshino T, Okazaki K, Chiba T. Prior use of immunomodulatory drugs improves the clinical outcome of endoscopic balloon dilation for intestinal stricture in patients with Crohn's Disease. *Digestive Endoscopy*.

査読有, 2013; 25: 535- 543.

doi: 10.1111/den.12029.

Fukuchi T, Nakase H, Matsuura M, Yoshino T, Toyonaga T, Ohmori K, Ubukata S, Eguchi T, Yamashita H, Ito D, Asida K. Effect of Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis on Patients with Ulcerative Colitis positive for cytomegalovirus. *J Crohns Colitis*. 査読有, 2013; 7: 803-811.

doi: 10.1016/j.crohns.2012.12.003.

Matsumura K, Nakase H, Kosugi I, Honzawa Y, Yoshino T, Matsuura M, Kawasaki H, Arai Y, Iwashita T, Chiba T. Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection - in vivo identification of cytomegalovirus persistent infected cells in mouse ulcerative colitis-. *Inflamm Bowel Dis*. 査読有, 2013; 19:1951-1963.

doi: 10.1097/MIB.0b013e318293c5bf

Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Matsumura K, Uza N, Yamaguchi Y, Mizoguchi E, Chiba T. Heparan sulfate on intestinal epithelial cells play a critical role intestinal crypt homeostasis via Wnt/ β -catenin signaling. *Am J Physiology and Gastrointest Liver Physiol*. 査読有, 2013; 305: G241-249.

doi: 10.1152/ajpgi.00480.2012

[学会発表](計 10件)

Takagi T, Nakase H, Kogawa T Identification of risk factors of colitis-associated carcinoma in Japanese patients with ulcerative colitis: results from a retrospective multicenter study in a Kyoto-Shiga cohort-CAPITAL (Cohort and Practice for IBD total management in Kyoto-Shiga Links) study- ECCO 2015Barcelona.

Yoshino T, Matsuura M, Nakase H. IL-34 antibody ameliorates experimental colitis by alternating IL12p40 expression in macrophages. DDW 2015. USA.

仲瀬裕志 炎症性腸疾患～輸液と経腸栄養剤の使い方～ 炎症性腸疾患における栄養管理の重要性.第17回日本病態栄養学会年次学術集会. 2014年, 大阪. Minami N, Yoshino T, Matsuura M, Nakase H. Short and long-term outcome of severe ulcerative colitis patients treated with tacrolimus and infliximab. DDW 2014. USA Yoshino T, Matsuura M, Nakase H. Involvement of IL-34 in intestinal inflammation of Crohn's disease. DDW 2014. USA.

Nakase H. Asian Forum 1. The Current Status of IBD Care in Asia. Treatment of IBD

in Asia. The 2nd Annual meeting of AOCC. 2014, Korea.

仲瀬裕志 難治性炎症性腸疾患に対する今後の治療 第 98 回日本消化器病学会近畿支部例会.第 41 回教育講演会. 2013 年, 神戸.

Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Effect of early induction with thiopurine immunomodulator treatment on long-term clinical remission in patients with Crohn's disease. DDW 2013. USA.

Fukuchi T, Nakase H, Matsuura M, Yoshino T, Toyonaga T, Ubukata S, Eguchi T, Yamashita H, Ashida K. Colonic inflammation triggers cytomegalovirus infection in steroid naïve active ulcerative colitis -significant role of mucosal PCR-. DDW 2013, USA.

Nakase H, Matsuura M, Chiba T. The critical role of heparan sulfate in intestinal crypt regeneration of small intestine via Wnt/beta-catenin signaling. DDW 2013. USA

〔図書〕(計 1 件)

仲瀬裕志 (監修・編集) 特集炎症性腸疾患攻略の手引き これだけは知っておきたい! Medicina. 東京: 医学書院. 2014. 200.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: ステント、当該ステントを消化管に留置する方法

発明者: 仲瀬裕志、樋口浩和

権利者: 仲瀬裕志

種類: 特許

番号: 2015-068742

出願年月日: 2015/03/30

国内外の別: 国内

名称: 画像処理装置及び内視鏡装置(Image processing device and endoscope device)

発明者: 仲瀬裕志、松浦稔、吉野琢哉、樋口浩和、池本洋祐

権利者: 仲瀬裕志、松浦稔、吉野琢哉、樋口浩和、池本洋祐

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/063384

出願年月日: 2013/05/14

国内外の別: 国際(内外)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

仲瀬 裕志 (Nakase, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号: 60362498

(2)研究協力者

本澤有介 (Honzawa, Yusuke)

松村佳代子(Matsumura, Kayoko)