

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791407

研究課題名(和文)チオレドキシンによる炎症性大腸がん制御とその機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism and suppression system of Thioredoxin in colitis-associated cancer

研究代表者

鳥井 美江 (TORII, MIE)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：60615285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症性大腸がんの発生と進展における抗酸化因子チオレドキシン(TRX)の制御作用機序を検討した。我々は、大腸炎症に伴う大腸がんにおいて炎症性サイトカインが関与していることから、TRX-Tgマウスと野生型マウスそれぞれに炎症性大腸がんモデルを作成し、発がん過程におけるTRXの作用機序を検討した。その結果、TRX-Tgマウスは発がんを抑制するが、生じた腫瘍の進展を促進することを見出した。さらに、TRX-Tgマウスでは腫瘍形成に関与する炎症性サイトカインの発現低下から発がんが抑制される一方でMIFの産生が高まることで腫瘍の生存と増殖が促進され大型化したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of an antioxidative protein, thioredoxin (TRX), in colon inflammation and promotion of colitis-associated cancer. To study the role of TRX in the carcinogenesis process, we used a mouse model of azoxymethane- and dextran sodium salt-induced colitis and colitis-associated cancer in WT and TRX-Tg mouse. We found that TRX-Tg mice developed less colon tumors but accelerated growth of emerging colon tumors. RT-PCR analysis of colon tissues and mesenteric lymph nodes isolated at various time points revealed that mRNAs for inflammatory cytokines and chemokines other than MIF were downregulated, whereas the expression of MIF mRNA was upregulated in TRX-Tg mice at all time points tested. Collectively, these results suggest that TRX suppresses the development of colon cancers possibly due to the downregulation of the production of inflammatory cytokines involved in tumorigenesis, while promotes growth of emerging cancer through upregulated MIF production.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：チオレドキシン 大腸炎 大腸がん MIF サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は、クローン病と共に病因不明の難治性炎症性腸疾患であり、高率に大腸がんを合併する。我が国における潰瘍性大腸炎の患者数は11万人以上であり、欧米に比べ罹患率や有病率は低率ではあるが、1970年以降急激に増加していることから原因の究明や対策が急務とされている。潰瘍性大腸炎は、腸管粘膜局所の免疫監視機構の破綻により腸内細菌に対する過剰免疫反応が誘導され、局所への炎症細胞の遊走と活性化が持続的に起こり、組織破壊に至ると考えられている。また、異なるTヘルパー (Th) サブセット (Th1/Th2/Th17細胞) の不適切な誘導や過剰な活性化と、これらTh細胞の活性化を抑制する制御性T細胞 (Treg) の機能不全が寄与しているとされる (Trends Mol Med 2009;15:199)。さらに、潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌に、炎症性サイトカインであるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) やインターロイキン13 (IL-13) が深く関与していることが明らかになってきた (J Gastroenterol 2011;46:6)。MIFはIL-13を含む種々の炎症性サイトカインの産生を誘導し炎症促進作用があるだけでなく、癌抑制遺伝子p53の機能を阻害し腫瘍化した細胞のアポトーシスを抑制する。一方、IL-13はMIFと共に大腸癌において高発現しており、体細胞突然変異を誘発する活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の発現を誘導し、発がんに関与しているとされている。

我々は、酸化ストレスがTh2細胞分化を促進する一方、Th2細胞分化や機能を抑制するTh1細胞と制御性T細胞 (Treg) にアポトーシスを誘導することで、Th2型免疫が過剰に誘導されアレルギー性気道炎症が増悪することを明らかにした (Eur J Immunol 2004;34:1312, Eur J Immunol 2006;36:1199, Biochem Pharmacol 2008;75:552)。そこで我々は、抗酸化因子チオレドキシン (TRX) が過剰なTh2型免疫誘導を抑制し、アレルギー性

気道炎症を制御できる否かを検討した結果、TRXは気道炎症を抑制するが、Th2細胞分化やTh1細胞とTreg細胞機能には影響を及ぼさないことを見いだした。TRXの気道炎症抑制の作用機序として、TRXがMIFの産生を抑制し、それによってMIFが誘導するIL-13産生が抑制されることが重要であることを明らかにした (Torii M, et al, Eur J Immunology 2011; 40 : 787)。さらに、大腸炎症に伴う大腸発がんにおけるMIFとIL-13の重要な役割とTRXの両サイトカイン産生に対する抑制作用から、TRXが炎症性大腸発がんを抑制するか否かを検討し、TRXを過剰発現するTRXトランスジェニックマウス (TRX-Tgマウス) において大腸発がんが顕著に抑制されることを見いだした。ところが、TRX-Tgマウスに発生した個々の腫瘍は野生型マウスと比較して、有意に大きいことが明らかとなった。これらの事実から、TRXは発がんを抑制するが、生じた腫瘍の進展を促進している可能性を示した。種々の炎症性疾患において、TRXが炎症抑制作用を発揮することが報告されているが、大腸炎症制御に関する報告は少ない。特に、炎症性腸疾患や大腸癌に重要な役割を果たすTh17細胞の分化や機能に対するTRXの影響に関しては全く不明であり、TRXの炎症性大腸発がんに対する作用についても報告は少ない。TRXは、むしろ腫瘍化した細胞のアポトーシス抑制や血管新生促進作用から、腫瘍促進的に作用している可能性が指摘され、TRX阻害薬が抗がん剤として臨床試験に供されている (Mol Nutr Food Res 2009;53:87)。一方で、TRX阻害の正常細胞への悪影響を危惧する指摘も存在する (Pharmacol Ther 2010;129:239)。そこで、TRXのがん発生・進展に及ぼす作用を特定し、TRXを標的とした癌治療戦略を構築するという着想にいたった。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性大腸発がんの発生と進展における抗酸化因子チオレドキシンの制御作用機序を明らかにすることを目的とした。我々は、炎症性大腸発がんにおいて炎症性サイトカインが関与していることからTRXは発がんを抑制するが、生じた腫瘍の進展を促進する可能性を見出した。今回、TRX-Tgマウスで観察された腫瘍数の減少と腫瘍の大型化に着目し、下記の項目に注目した。

- TRXによる大腸発がん抑制における炎症抑制とMIF、IL-13産生抑制の関与
- TRXによる大腸発がん抑制に伴って活性化または抑制されるT細胞サブセットの特定
- TRXによる腫瘍の進展促進が増殖促進あるいはアポトーシス抑制に起因しているのか、それに伴って悪性化に関与しているか否か
- TRXの腫瘍進展促進作用が腫瘍細胞内因性のTRXに起因している可能性

3 . 研究の方法

TRX-Tg マウスと野生型マウスそれぞれに大腸特異的発がん化学物質 Azoxymethane (AOM) を 10mg/kg 腹腔内投与し、1 週間後に dextran sulfate sodium (DSS) 反復投与 (1% の DSS を含む飲水で 7 日間飼育後、DSS を含まない飲水で 14 日間飼育するのを 1 サイクルとして 3 サイクル行った) することで潰瘍性大腸炎を誘発し、DSS 初回投与から 100 日程度まで観察した。

大腸炎症誘発早期 (初回 DSS 投与開始後 14 日間) に、体重および大腸長を測定し、炎症の程度を比較した。AOM 前投与 / DSS 反復投与した TRX-Tg マウスと野生型マウス (DSS 初回投与後 100 日程度) に発生した腫瘍数と腫瘍径とを測定し、TRX による大腸発がん抑制が、大腸炎症抑制と関連しているかを確認した。上述のマウスにおいて、経時的に大腸組織を回収し、ELISA ならびにリアル

タイム PCR 法を用いて、MIF、IL-13 と TNF- α などの発現レベルを TRX-Tg マウスと野生型マウスで比較した。

4 . 研究成果

大腸特異的発がん化学物質アゾキシメタンと大腸炎誘発剤デキストラン硫酸ナトリウム投与による潰瘍性大腸炎マウスモデルを用いて、TRX-Tg マウスは発がんを抑制するが、生じた腫瘍の進展を促進することを見出した。さらに、このモデルマウスの腫瘍発生時期における炎症や発がんに関与する遺伝子の発現パターンを解析した結果、TRX-Tg マウスの大腸では MIF 以外の多くの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が野生型マウスに比べ低下していることが明らかになった。一方、以前の研究と異なり、炎症と発がんの全過程において MIF の発現は TRX-Tg マウスで高まっていた。この結果から TRX-Tg マウスでは腫瘍形成に関与する炎症性サイトカインの発現低下から発がんが抑制される一方、MIF の産生が高まることで腫瘍の生存と増殖が促進され大型化したことが示唆された。

現在、上記の結果を確認するために、経時的に採取した大腸組織の大腸がん多発部位 (結腸下部から直腸) から組織切片を作成し、MIF、IL-13 並びに AID に対する免疫組織染色を施し、それらの発現状態を比較することや同組織ホモジェネートから RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法により、AID の発現量の解析を検討している。また、H&E 染色による病理組織学的解析を行い、潰瘍性大腸炎の病理学的特徴である粘膜上皮層への炎症性細胞の浸潤、上皮細胞の崩壊、陰窩の消失、腸壁の浮腫の出現などを指標に、潰瘍性大腸炎の重症度の比較を検討している。さらには、TRX による大腸発がん抑制に伴い活性化 / 抑制される T 細胞サブセットの特定をするために、経時的に大腸組織、腸管膜リンパ節、

粘膜固有層の細胞を回収し、抗 CD4 抗体を用いて細胞表面染色と各 T 細胞サブセット特異的な転写因子に対する抗体である抗 t-bet、抗 GATA-3、抗 ROR γ t 並びに抗 Foxp3 抗体を用いた細胞内染色を行い、Th1、Th2、Th17、Treg 細胞サブセットの頻度を比較することや、これら T 細胞サブセットが機能的であることを確認する目的で、各々の臓器の細胞を in vitro で抗 CD3 / 抗 CD28 抗体を用いて刺激し、細胞表面 CD4 染色と細胞 IFN- γ 、IL-4、IL-17 染色による機能解析を検討している。

上記の検討結果を基に TRX-Tg マウスで見られる腫瘍の進展促進が、増殖促進を介しているのか、あるいはアポトーシス抑制を介しているのかを明らかにするために、野生型マウスと TRX-Tg マウスに生じた大腸がんの組織切片を増殖指標となる Ki67 を核染色する、あるいはアポトーシス指標として TUNEL 法を用いて解析することを検討している。また、TRX 過剰発現細胞の違いが、発がんや腫瘍進展にどのように関わっているかを検討するために、TRX を高発現するキメラマウスを用いた実験系を作成する。それらの結果から TRX による大腸がんにおける制御機構を明らかにしていくこと検討している。

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 1 件)

Hori T, Uemoto S, Chen F, Ann-Baine MT, Gardner LB, Hata T, Kuribayashi K, Kato T, Saito K, Wang L, Torii M, Endo K, Jobara K, Sulistiono B, Nguyen JH. Effect of cold ischemia/reperfusion injury and/or shear stress with portal hypertension on the expression of matrix metalloproteinase-9. Ann Gastroenterol, 25 (4), 345-351, 2012.

査読有

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥井 美江 (TORII, Mie)

三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ

アソシエイト

研究者番号: 60615285

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：