

緑黄色野菜に多く含まれる
大腸がん抑制物質の作用メカニズムの検討

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 主任研究員

いくた とうご

生田統悟

緑黄色野菜に多く含まれる大腸がん抑制物質の作用メカニズムの検討

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所

主任研究員 生田 統悟

要旨

消化器がんの発生・悪性化には、組織の炎症反応が重要な役割を負うと考えられている。私たちは Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 欠損マウスの盲腸にがんが生じること、また家族性大腸腺腫症モデルマウスに AhR リガンド投与すると、腫瘍形成を抑制することを既に報告し、AhR の大腸がん抑制効果およびそのリガンド物質によるがん予防効果について研究している。

本研究課題はがん予防に効果的な AhR リガンド物質の開発を目指し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。AhR 欠損マウスで見られた炎症の亢進および炎症抑制により観察された腫瘍発生の遅延に着目し、AhR による炎症抑制作用について検討した。

野生型 C57BL マウスに AhR リガンドである indole-3-carbinol(I3C) 含有飼料を与え、腸に発現する自然免疫関連遺伝子を解析したところ、ケモカインである CCL5 の発現低下が観察された。I3C の CCL5 発現抑制効果は、マウス大腸がん細胞株でも再現された。2つの細胞株 CT26 ならびに Colon26 を AhR リガンドで前処理すると、TNF α の CCL5 誘導作用は低下した。次に AhR リガンドと NF κ B シグナル経路との相互作用について検討した。IKK 阻害剤である BAY は、TNF α による I κ B α のリン酸化およびそのタンパク分解を阻害した。一方、AhR リガンドは I κ B α のリン酸化、タンパク質分解を妨げなかった。さらに、BAY は TNF α 刺激による NF κ B p65 の核移行を阻害したが、AhR リガンドにこの作用はみられなかった。

これらより、AhR リガンドによる CCL5 発現抑制効果は、BAY 作用とは異なる機序を示すこと、また細胞質で起こることではなくむしろ核内で作用していることが示唆された。

序文

消化管は、体の外部から摂取した食物を消化・吸収し、さらに無数の微生物を共存させている場である。このために体内に外環境を許容しつつ、生命維持に害となる因子は排除するという二方向の機能を両立させることが恒常性の維持に必須であり、その破綻は組織の炎症や腫瘍形成を引き起こす要因となる。組織を正常に維持するために、免疫細胞や上皮細胞でおこなわれる生体防御機構は、どのように制御されるのだろうか。

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) はリガンド依存性の転写因子であり、低分子のリガンド

物質に結合して活性化され、T 細胞の分化や血液幹細胞の増殖制御などに関わることが報告されている (1)。我々は、AhR 欠損マウスの回盲部に管状腺癌が自然発生すること、ヒト家族性大腸腺腫症のモデルである *Apc*^{Min/+} マウスに AhR リガンド含有飼料を投与すると、小腸に生じる腫瘍が減少することを観察し、がん抑制因子としての AhR の役割を提唱した (2, 3)。

消化管において、AhR リガンドの多くは食餌成分に由来すると考えられる。食餌成分として投与された AhR リガンドは腫瘍形成を抑制した。このとき、組織に何が起きたのだろうか？ そのプロセスを探求することは、がん予防に効果的なリガンド物質の開発、腫瘍形成メカニズム、腸の生体防御機構の解明につながると考えられる。

本研究は大腸がん予防に効果的な薬剤開発の基礎研究として、我々が発見した AhR の大腸がん抑制効果の作用機序を解析することを目的とする。AhR の内在性リガンドであるインドール化合物は、ブロッコリーなどの野菜に多く含まれる。野菜の摂取とがん予防は関連が知られていたことであるが、その成分と受容体を関連付け、さらに動物実験により効果を証明したことは我々の独創的な研究の成果である。本研究課題により、腸管の恒常性を維持するための機構が明らかにされ、その裏づけによりがん予防の薬剤へ発展することが期待される。

材料と方法

実験動物

5週齢 C57BL/6J 雄マウスを日本クレアより購入した。0.1% indole-3-carbinol (SIGMA) または、0.1% 3,3'-methylenebisindole (DIM) を含む飼料 (F2、フナバシファーム) を7日間与えた後に、解剖して組織を採取した。*Apc*^{Min/+} マウスは、Jackson Laboratory から購入し、埼玉がんセンター動物飼育施設にて繁殖させた。

細胞培養

1) 細胞株：マウス大腸がん細胞株 CT26 ならびに Colon26 は、10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地を用い、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。AhR 特異的な siRNA (Ambion 4390771, s62163) は終濃度 10 nM で、Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher) を用いて細胞にトランスフェクトした。

2) 初代培養：*Apc*^{Min/+} マウスに生じた大腸腫瘍を採取し PBS で洗浄した後、ハサミで細切した断片を 1mg/ml collagenase A および 1mg/ml Dispase II を含む Advanced DMEM/F12 培地で 37°C、1時間保温した。組織片をピペティングし、100 μ m ストレーナーでろ過された細胞を PBS で洗浄した。遠心で沈殿させた細胞を 10% matrigel を含むコラーゲンゲル (Collagen type I, 新田ゼラチン) に懸濁し、Millicell cell culture inserts (Millipore MCRP12H48) を用いて培養した。50 ng/ml EGF, 250 ng/ml R-spondin1, 50 ng/ml Noggin を含む Advanced DMEM/F12 培地を用いて継代培養した (4)。細胞増殖を数値化するため、CellTiter-Glo-3D (Promega) を用いた。

RNA ならびにタンパク質の解析

マウス組織ならびにマウス大腸がん細胞株は、Isogen (ニッポンジーン) をもちいて、また初代培養細胞は RNeasy mini kit (QIAGEN) をもちいて RNA を抽出し、RT-PCR 法により、遺伝子発現を解析した。抽出された RNA は、Prime Script RT Master Mix (Takara Bio) を使って逆転写反応をおこない、特異的な PCR プライマーおよび Taq polymerase を用いて PCR 反応をおこなった。反応液は 2% アガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロミド染色によって PCR 産物を検出した。

培養大腸がん細胞またはマウス組織は SDS lysis buffer で溶解し、発現するタンパク質をイムノブロット法で解析した。細胞溶解液はアクリルアミドゲルに電気泳動し、分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に transfer させた。この膜を TBS で洗浄し、5% BSA を含む TBS でブロッキングした後、一次抗体で一晩インキュベートした。さらに膜を TBS で洗浄後に HRP 標識された二次抗体で 1 時間インキュベートし、Immobilon (Millipore) を用いて化学発光を LAS4000 により検出した。用いた抗体は以下の通り。Anti-actin (Sigma, A2066), anti-Ikba (CST, 48125), anti-phosphoIkba (CST, 2859T), anti-NFκB p65 [pSer536] (CST, 3033S)

遺伝子発現の網羅的解析

通常の飼料 (F2) を与えたマウス (n = 2) および I3C 含有飼料を与えたマウス (n=2) の小腸から抽出した RNA を用いて、ジェノパール (三菱ケミカル) により自然免疫関連遺伝子の発現を調べた。また、DIM 含有飼料を与えたマウス (n=1) の盲腸から抽出した RNA を用いて、Affymetrix GeneChip[®] Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, Inc) により遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。

免疫染色

CT26 細胞をカバーガラス上に培養し、4% ホルマリンで 10 分、続いて 100% メタノールで -20℃、5 分間処理した。カバーガラスを PBS で洗浄後に 0.1% Triton X-100 で 10 分間処理し、4% BSA を含む PBS で室温、30 分間ブロッキングした。その後 200 倍に希釈した anti-NFκB RelA (Santa Cruz, sc-372G) で一晩インキュベートし、PBS で洗浄後に 1000 倍に希釈した rhodamine-conjugated anti-goat IgG でインキュベートし、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

結果

1 AhR リガンド摂取によるマウス腸の遺伝子発現変化の解析

AhR 欠損マウスは回盲部に腫瘍を形成し、また AhR リガンドの摂取は *Apc*^{Min/+} マウスの小腸に生じる腫瘍形成を抑制することを既に報告した (図 1A, B)。本研究では AhR リガンドのこの過程における作用機序を検討するため、AhR リガンドを与えたマウスの腸にみられる遺伝子発現変化を網羅的に解析した。

1-1 indole-3-carbinol (I3C) 摂取による自然免疫関連遺伝子の発現変化

5週齢の正常 C57BL マウスに I3C 含有飼料を7日間与え、小腸から抽出した RNA を用いて、自然免疫関連遺伝子の発現を通常の飼料を与えたマウスと比較した。I3C 処理の組織では AhR 標的遺伝子である CYP1A1 の誘導がみられ、これは AhR 欠損マウスではみられなかったことから、I3C は AhR を介して遺伝子発現を変化させる活性があることを示した (図 2A)。自然免疫関連遺伝子の発現解析の結果 (図 2B)、I3C 処理によるサイトカインやケモカイン等の発現低下がみられた。免疫抑制的に働く SOCS3 の発現増加も検出された。特にケモカインの CCL5 に強い発現抑制が観察された。通常飼料で飼育している AhR 欠損マウスの腸で、CCL5 発現を *AhR*^{+/+} マウスの組織と比較した。小腸だけでなく、回盲部、盲腸、大腸において CCL5 mRNA の増加が観察された (図 2C)。

1-2 DIM 摂取による盲腸の遺伝子発現変化の網羅的解析

次に DIM 含有飼料を与えた正常 C57BL マウスの盲腸にみられる遺伝子発現変化を網羅的に解析した。DIM 処理組織では CYP1A1 mRNA が誘導が RT-PCR により観察され、AhR の活性化が示唆された (図 3A)。解析の結果から、複数の Slc transporter と、lysozyme および defensin *a* の発現低下が観察された (図 3B)。これらの結果を再検討するため、通常飼料2匹、DIM 含有飼料2匹から抽出した RNA を用いて、RT-PCR をおこなった (図 3C)。DIM 投与組織では、Slc transporter family の Slc13a1, Slc10a2, Slc28a2, Slc3a1 の低下がみられた。また Lysozyme 1, Lysozyme 2, Defensin a3, Defensin a5 でも発現低下がみられた。これらの変化は、real-time PCR でも再現された (図 3D)。

2 マウス大腸がん細胞株を用いた CCL5 発現抑制メカニズムの解析

AhR 欠損マウスの盲腸に生じる腫瘍形成には、組織の炎症亢進が重要であることが示されている。I3C 投与によって観察されたサイトカインやケモカインの発現低下は、AhR リガンドの炎症抑制効果を示唆している。その作用機序を明らかにすることは、がん予防に効果的な物質を探索していく上で重要な情報を与えることが期待される。実験系をマウス個体から培養細胞に移し、AhR リガンドによる炎症抑制メカニズムを検討した。

2-1 大腸がん細胞株における AhR リガンド効果：CCL5 mRNA 低下の再現

マウス大腸がん細胞株 CT26 または Colon26 は、0.5 ng/ml tumor necrosis factor *a* (TNF α) の8時間処理により、CCL5 mRNA の誘導が観察された (図 4A)。この実験系で、AhR リガンドである methylcholanthrene (MC) および I3C を1時間前処理すると、TNF α 作用は抑制された (図 4A, B)。この結果は自然免疫関連遺伝子の解析結果を再現していると考えられ、以下の実験をおこなった。

2-2 NF κ B シグナル経路に於ける AhR リガンドの効果

TNF α による遺伝子発現の調節には、NF κ B 経路と MAPK を介した経路が知られている。マ

ウス大腸がん細胞株でみられた CCL5 発現誘導のシグナル経路を調べるため、NFκB 経路に関わる IKK 阻害剤 BAY11-7082 および JNK 阻害剤 SP600125 を前処理した細胞に TNFα を作用させ、CCL5 発現を RT-PCR で検討した。前者は TNFα 誘導を阻害したが、後者の影響は小さかった (図 4C)。このことから、TNFα の CCL5 誘導作用は、NFκB 経路を介していると考えられた。

MC および I3C にみられた CCL5 誘導抑制効果が AhR を介した反応であることを確認するため、siRNA を導入して AhR 発現を抑制された細胞で AhR リガンド効果を RT-PCR で検討した。AhR 特異的な siRNA を導入された細胞では、MC および I3C による CCL5 発現抑制効果はキャンセルされ、これら低分子物質の効果は AhR を介する反応であることが示唆された (図 5A, B)。

次に AhR リガンドが NFκB シグナル経路にあたえる作用について検討した。TNFα が細胞表面に局在する受容体に結合すると、細胞内のシグナルカスケードを通じて標的遺伝子の発現が活性化される。通常 NFκB 複合体は細胞質に存在する IκB と結合し、不活性化されている。TNFα の刺激により IκB kinase (IKK) が活性化されると、IκBa はリン酸の結果分解され、NFκB 複合体は核へ移行してターゲット遺伝子の転写を調節する。これらの NFκB シグナルに参与する因子の動態を immunoblot により検討した。TNFα 処理は IκBa のリン酸化を促し、IκBa タンパク質を減少させた。IKK 阻害剤である BAY11-7082 の前処理は、IκBa のリン酸化および分解を阻害した。さらに NFκB p65 サブユニットの活性化の指標である Ser536 のリン酸化を阻害した (図 5C)。

AhR リガンドは、BAY と同様に TNFα による CCL5 誘導を阻害した。しかしながら AhR リガンドの NFκB 経路に与える影響は、BAY の場合とは異なっていた。MC および I3C の前処理は、TNFα による IκBa のリン酸化ならびにタンパク質分解を阻害しなかった。また MC、I3C 存在下で TNFα による NFκB p65 のリン酸化が観察された。これらの結果は、AhR リガンドは TNFα 刺激により生じる IKK 活性化、IκBa のリン酸化およびタンパク質分解、NFκB p65 [Ser536] のリン酸化の過程には影響しないことを示している。

次に NFκB p65 の細胞質から核への移行に対する影響について検討した。1ng/ml TNFα の処理で NFκB p65 の核への局在化が観察され、これは BAY 前処理によって阻害された。一方、MC および I3C の前処理は核移行に影響しなかった (図 5D)。

3 マウス大腸腫瘍の初代培養系と細胞増殖に与える AhR リガンドの効果

AhR リガンドは、*Apc*^{Min/+} マウスに対してがん予防効果を示した。腫瘍細胞に与える AhR リガンドの効果を検討するため、*Apc*^{Min/+} マウスに生じた腫瘍細胞を初代培養し、細胞増殖を測定した。

3-1 初代培養系の確立

Apc^{Min/+} マウスの大腸に生じた腫瘍組織を collagenase と dispase により解離し、得られた細

胞を 10% matrigel を含む collagen gel 中で培養した。細胞は球形の凝集塊 (spheroid) として増殖し (図 6A)、培養開始後 10 日前後で継代培養が可能であり、増殖能が維持されていることが示された。増殖因子要求性を調べるため、EGF, R-spondin1, Noggin を種々に組み合わせ、細胞増殖アッセイをおこなった。これは細胞内 ATP をルシフェラーゼ活性として検出することにより培養中の生細胞数を測定するものである。培養 7 日目の顕微鏡写真とルシフェラーゼ活性に示されるように、この細胞は EGF 存在下で増殖が促進された。R-spondin1 および Noggin の細胞増殖に与える効果は小さかった (図 6B)。

3-2 初代培養における AhR リガンド効果

AhR リガンドとして MC, I3C, DIM を培地に添加し、細胞増殖を測定した。MC ならびに I3C は増殖を刺激したが、DIM はこの作用を示さなかった (図 6C, D)。AhR 活性化の指標である CYP1A1 の誘導を RT-PCR で調べた。MC は誘導効果を示したが、I3C および DIM は誘導作用を示さなかった (図 6E)。大腸がん細胞の増殖に重要な wnt シグナルの標的である cyclin D1 および c-myc の発現は、AhR リガンドにより影響されなかった。

考察

本研究課題は、AhR リガンドによるがん予防効果のメカニズムの解明を目的とした。緑黄色野菜に多く含まれる I3C 含有飼料を与えたマウスの腸で自然免疫関連遺伝子の発現を解析したところ、サイトカインやケモカインの発現低下がみられ、炎症抑制効果のあることが考えられた。発現亢進がみられた SOCS3 は炎症抑制的な作用が報告 (5) されており、この遺伝子の関与も研究が期待される。今回の結果で最も発現変化が大きかった CCL5 について検討を進めた。この遺伝子は通常飼料で飼育された AhR 欠損マウスの小腸、盲腸、大腸では発現が亢進しており、AhR による発現抑制作用があることが示唆された。一方、DIM 投与による盲腸の遺伝子発現変化の網羅的解析では、Lysozyme および Defensin a、また Slc トランスポーター遺伝子群の発現低下が示された。これらは RT-PCR でも発現低下が再現された。Lysozyme と Defensin a は、パネート細胞にみられる因子であり (6)、その低下は DIM による炎症抑制効果と関連する可能性がある。また、Slc トランスポーターは、腸の栄養物や薬物の細胞外から細胞内への取り込みに働く機能がある (7)。これらに関しては、さらなる検討が必要である。DIM 投与による網羅的解析結果の中には、I3C 投与で示されたサイトカインやケモカインは含まれていなかった。このことはマウスの個体差や解析の条件がもたらす結果の差異、または AhR リガンドの生化学的性質の違いによる作用の特異性を示している可能性がある。

解析を進めるため大腸がん細胞株を用いて、AhR リガンド処理が TNF α による CCL5 発現誘導を抑制する実験系を作成した。この AhR リガンド作用は、RT-PCR と ELISA の 2 つの実験系で観察された。TNF α は NF κ B シグナル経路を通して CCL5 発現を誘導したことから、

この経路における阻害剤を使って AhR リガンド効果の作用点を検討した。IKK 阻害剤は、I κ B α のリン酸化とタンパク質分解ならびに NF κ B p65 のリン酸化を阻害した一方で、AhR リガンド存在化でもこれら因子は NF κ B 経路が活性化されていることを示した。AhR リガンドによる CCL5 発現抑制は、細胞質で起こるといふよりむしろ核内の反応であることが示唆され、このことは AhR リガンドによる AhR の核移行を考えると合理的なことと言える。CCL5 の遺伝子発現調節領域には AhR/ARNT タンパク質が結合するコンセンサス配列があり、また AhR は NF κ B p65 と相互作用することが報告 (8) されている。これらの解析が必要である。自然免疫関連遺伝子の解析結果は、複数の遺伝子の発現変化が AhR リガンドにより炎症抑制の方向へ動くことを示しており、AhR が一つの遺伝子だけでなく、さらに大規模な遺伝子群の発現調節を担っている可能性がある。

AhR リガンドの大腸がん細胞に与える作用を検討するため、*Apc*^{Min/+} マウスの大腸に生じる腫瘍細胞の初代培養系を作成した。この培養で腫瘍細胞はスフェロイドの形態を示して増殖し、継代培養が可能であった。増殖因子を含まない培地でも増殖可能であり、EGF 存在化で増殖はさらに促進された。MC および I3C は増殖促進作用を示し、CYP1A1 誘導は MC にのみ認められた。これらのリガンド物質による作用の差異の原因は究明されるべき課題である。I3C、DIM 共に飼料に含めてマウスに与えた場合には、いずれも CYP1A1 の誘導が認められた。これは組織に様々な種類の細胞が存在することと関連すると思われる。AhR リガンドによるがん予防薬の開発には、薬物代謝酵素の誘導による発がん剤の代謝活性化を伴わない物質が期待される。ここで示された初代培養系は、このような物質のスクリーニングに有用な可能性がある。

研究発表

学会発表： 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)

2017 年 12 月 6 日—9 日 (神戸)

生田統悟：Aryl hydrocarbon receptor による CCL5 発現抑制の作用機序

文献

1. Marshall NB et al (2010) Ann NY Acad Sci 1183:25-37.
2. Kawajiri K et al (2009) PNAS 106: 13481-6.
3. Ikuta T et al (2013) Carcinogenesis 34:1620-7.
4. Sato T et al (2009) Nature 459: 262-5.
5. Babon JJ et al (2012) Immunity 36:239-50.
6. Ouellette AJ (2011) Cell Mol Life Sci 68:2215-29.

7. Balakrishnan A et al (2006) Mol Pharm 3:223-30.

8. Dong WK et al (2000) Oncogene 19:5498-5506.

図の説明

図1 AhRの腫瘍抑制効果

A. AhR欠損マウスの回盲部に生じた腫瘍 B. AhRリガンドの腫瘍抑制作用

図2 I3C含有飼料を与えたマウスの腸における遺伝子発現の変化

A. 野生型 C57BL マウスまたは AhR 欠損マウスに通常飼料 (F2) および I3C 含有飼料を与え、CYP1A1 発現を RT-PCR で検出した。B. I3C 含有飼料を与えられた野生型マウス小腸の遺伝子変化 自然免疫関連遺伝子を解析した。C. AhR 変異マウスの腸に発現する CCL5 を部位別に RT-PCR により調べた。

図3 DIM含有飼料を与えられた野生型マウスの盲腸に見られる遺伝子発現の変化

A. DIM 含有飼料による CYP1A1 の誘導 B. 網羅的解析により DIM 処理で発現が低下した遺伝子 C. RT-PCR による遺伝子発現の解析 D. Real-time PCR による解析

図4 培養細胞を用いた CCL5 発現抑制の検討

A. マウス大腸がん細胞株 CT26 と Colon26 を用いて CCL5 を RT-PCR で検出した。1 μ M MC または表記の I3C で1時間処理した後、1 ng/ml TNF α を添加し8時間後に細胞を回収した。B. ELISA による培地中の CCL5 の測定 CT26 細胞を I3C で1時間前処理し、0.1 ng/ml TNF α を18時間処理後に培地を回収した。C. 阻害剤処理による TNF α の CCL5 誘導経路の検討 各阻害剤を前処理後、TNF α による発現誘導を RT-PCR で検討した。

図5 AhRリガンドとNF κ Bシグナル経路との相互作用の検討

A. MC および I3C 作用の AhR 依存性。AhR 特異的な siRNA を導入した細胞で MC と I3C の TNF α による CCL5 誘導抑制効果を RT-PCR で検討した。B. Real-Time PCR による解析 C. NF κ B シグナルに及ぼす IKK 阻害剤と AhR リガンドの作用の比較 BAY または AhR リガンドを1時間前処理後、1 ng/ml TNF α を培地に添加し、10分後に細胞を回収した。D. NF κ B p65 の核移行の検討 1ng/ml TNF α を15分処理し、anti-NF κ B p65 で免疫染色した。IKK 阻害剤および AhR リガンド前処理効果を比較した。

図6 *Apc*^{Min/+} マウス大腸に生じた腫瘍細胞の初代培養

培養7日目の培養細胞の写真 (A) とルシフェラーゼ活性測定による細胞増殖アッセイ (B) E; 50 ng/ml EGF, R; 250 ng/ml R-spondin1, N; 50 ng/ml Noggin C. AhR リガンドの培養系に与える影響 D. AhR リガンド存在下での細胞増殖 増殖因子を含まない培地にリガンド (各 2 μ M) を添加した。培地は 1-3 日おきに交換した。 E. 初代培養系での CYP1A1 発現を RT-PCR で検討した。

图 1

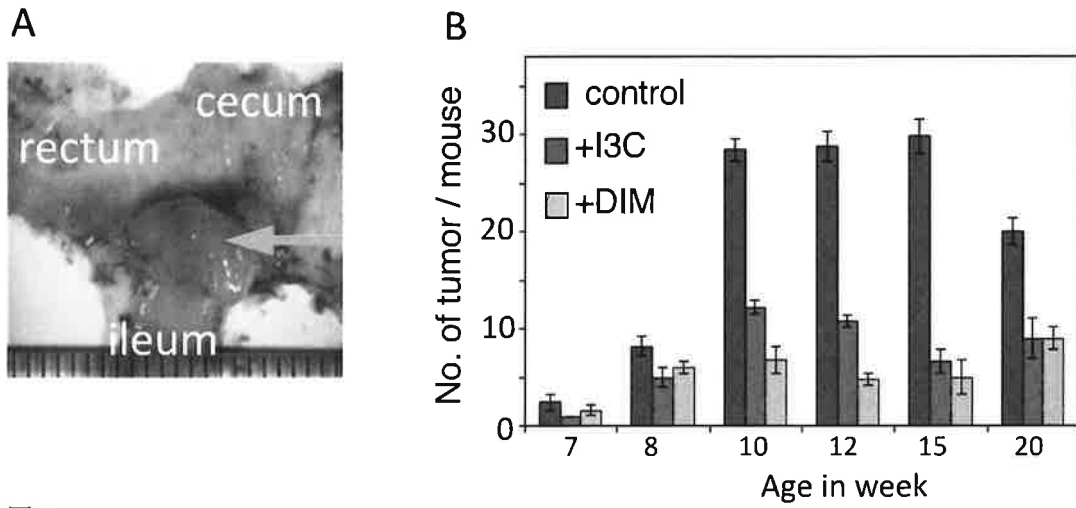
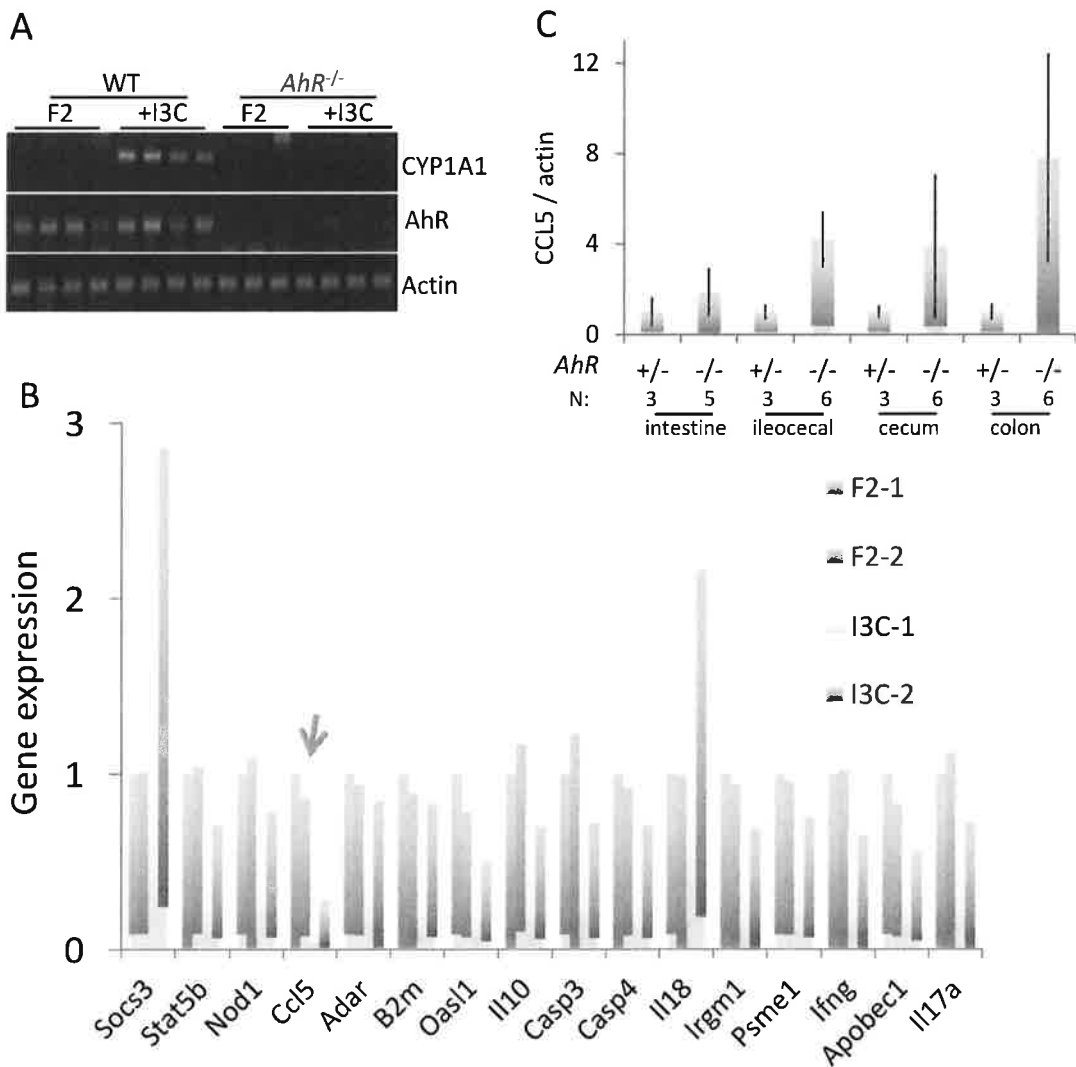
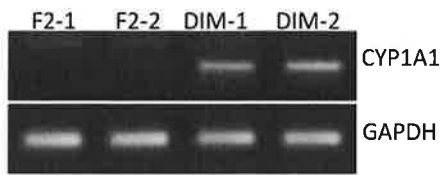


图 2



3

A

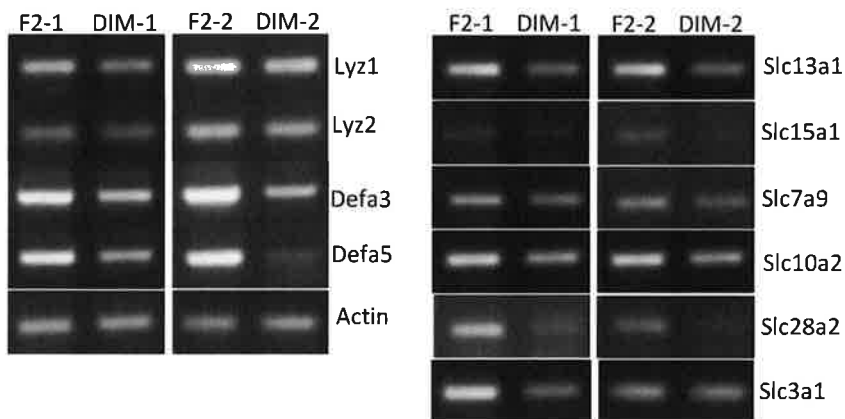


C57BL/6J, 6w, male, cecum

B

GENE NAME	DIM/F2	GENE NAME	DIM/F2
Lyz 1	0.1	Slc13a1	0.19
Defa5	0.11	Slc15a1	0.25
Defa24	0.12	Slc7a9	0.3
Defa23	0.13	Slc6a19	0.31
defa22	0.13	Slc10a2	0.41
defa21	0.14	Slc26a6	0.47
defa20	0.16	slc28a2	0.48
Defa17	0.18	Slc51b	0.51
Defa3	0.33	Slc3a1	0.53
Lyz 2	0.5		
Olfm4	0.2	Cyp1a1	0.83

C



D

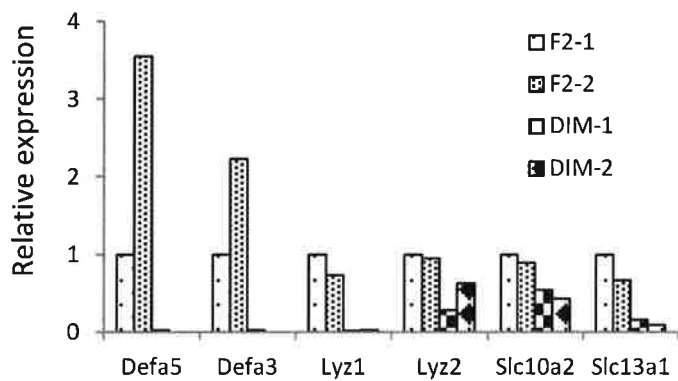


图 4

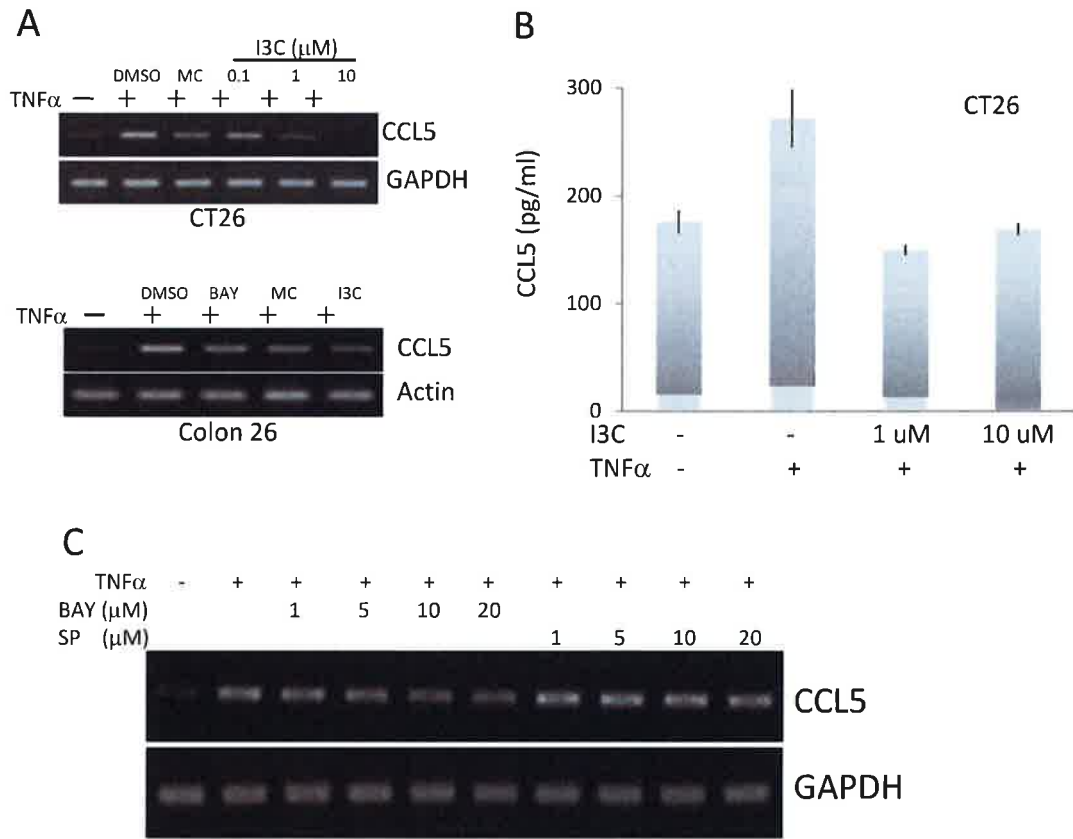


图 5

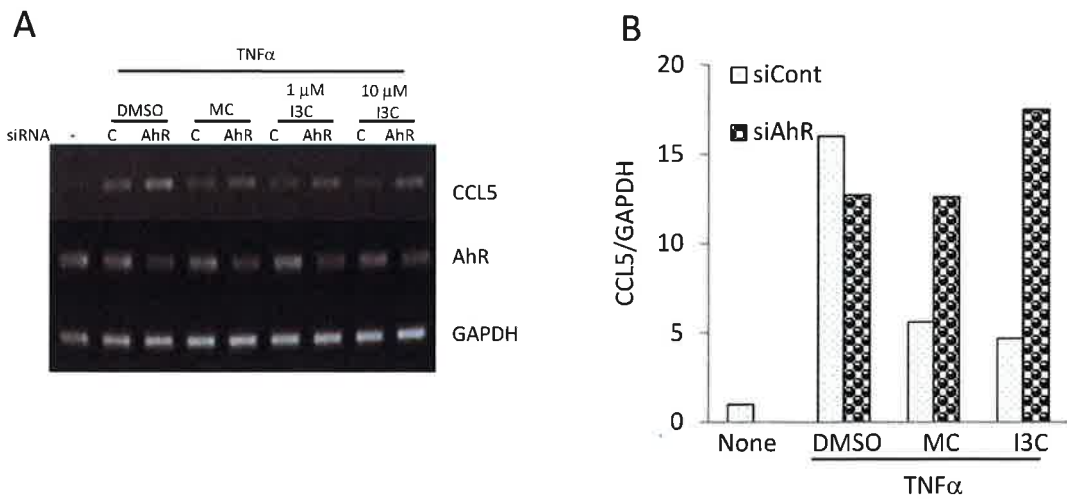


图 5

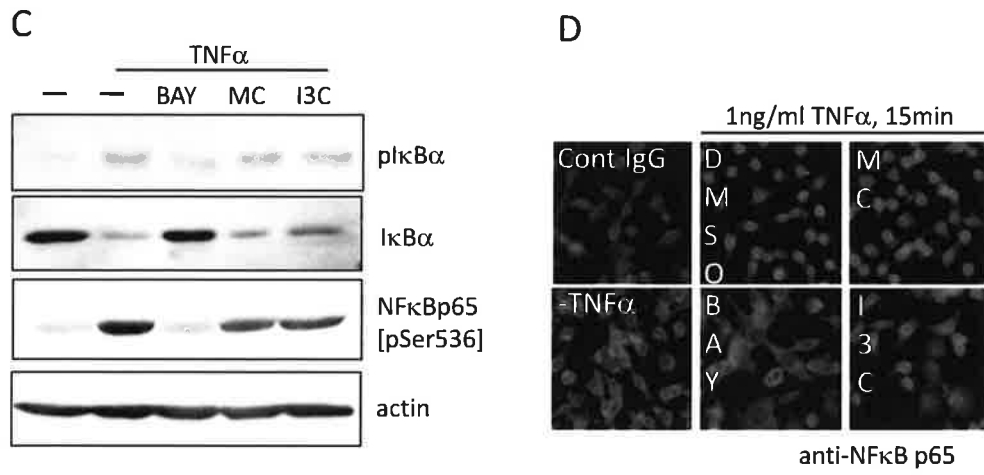


图 6

