慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	炎症性発癌におけるSP-D、ADAM17の臨床応用
Sub Title	The impact of SP-D and ADAM17 on colitic cancer
Author	長谷川, 博俊(Hasegawa, Hirotoshi) 鶴田, 雅士(Tsuruta, Masashi)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	炎症性発癌のメカニズムを明らかにすることは難治性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎(UC)の治療成績の向上に重要である．これまで我々は肺外のサーファクタント蛋白D (SP-D)がUCの発症増悪に関連することを明らかにした．今回は炎症性発癌との関連を明らかにすることを目的として研究を行った．野生型マウスとSP-Dノックアウト(KO)マウスにデキストラン硫酸ナトリウ ム溶液およびアゾキシメタンを投与し炎症性発癌を発生させると，SP-DKOマウスのほうが、1個体あたりの腫瘍数が多く、腫瘍発生マウスの頻度も高いことが明らかとなった．このことから，炎症性発癌においてSP-Dは重要であることが示唆された． It is critical to clarify the molecular mechanism of colitic caner for improving the prognosis of ulcerative colitis. We have elucidated the impact of extra-pulmonary surfactant protein d (SP-D) on UC. This experiment aims for clarifying the correlation of SP-D with colitic caner. Comparing SP-D knockout (KO) mouse and wild mouse by using colitic caner mouse model with dextran sulphate sodium and azoxymethane, higher incidence and more number of tumor were observed in SP-D KO mouse. Consequently, SP-D is suggested to play a role on colitic cancer.
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K10551 研究分野：大腸外科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K10551seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１０５５１

研究課題名（和文）炎症性発癌におけるSP-D、ADAM17の臨床応用

研究課題名（英文）The impact of SP-D and ADAM17 on colitic cancer

研究代表者
長谷川　博俊（Hasegawa, Hirotoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・非常勤講師

研究者番号：００２１８４５５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性発癌のメカニズムを明らかにすることは難治性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎（UC）の治療成績の向上に重要である．これまで我々は肺外のサーファクタント蛋白D（SP-D）がUCの発症増悪に関連することを明らかにした．今回は炎症性発癌との関連を明らかにすることを目的として研究を行った．野生型マウスとSP-Dノックアウト（KO）マウスにデキストラン硫酸ナトリウ ム溶液およびアゾキシメタンを投与し炎症性発癌を発生させると，SP-DKOマウスのほうが、1個体あたりの腫瘍数が多く、腫瘍発生マウスの頻度も高いことが明らかとなった．このことから，炎症性発癌においてSP-Dは重要であ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
難治性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎において，2次的に発症する炎症性発癌は予後に影響を与える問題点の1つであり，早期発見，発症予防は非常に重要である．本研究結果からSP-Dが潰瘍性大腸炎の病勢だけでなく，炎症性発癌にも関与していることが示唆され，例えばバイオマーカーや予防治療に応用することで，先述の課題解決に1筋の光を照らす可能性が期待できる．

研究成果の概要（英文）：It is critical to clarify the molecular mechanism of colitic caner for improving the prognosis of ulcerative colitis. We have elucidated the impact of extra-pulmonary surfactant protein d (SP-D) on UC. This experiment aims for clarifying the correlation of SP-D with colitic caner.
Comparing SP-D knockout (KO) mouse and wild mouse by using colitic caner mouse model with dextran sulphate sodium and azoxymethane, higher incidence and more number of tumor were observed in SP-D KO mouse. Consequently, SP-D is suggested to play a role on colitic cancer.

研究分野：大腸外科

キーワード：炎症性発癌　SP-D　ADAM17

様　式　Ｃ－１９，Ｆ－１９－１，Ｚ－１９，ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

肺サーファクタント蛋白Ｄ（SP-D）は主に肺の２型肺胞上皮細胞で生成されるコレクチンの１つで，肺構造の維持や抗体非依存自然免疫に関与している．特に肺は外界と直接接する環境にあることから，最近，肺の免疫応答のバランス（炎症と寛容）を保つうえでこの SP-D は非常に重要な役割を担っている．また SP-D は肺以外の血管や消化管上皮においてもわずかに存在することが知られているがその生理的な役割についてはほとんど知られていない．

我々は過去の難治性慢性炎症疾患である潰瘍性大腸炎の病変部に高レベルの SP-D 蛋白が認められたという報告から，デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘因大腸炎モデルマウスにおける末梢血中および大腸粘膜内の SP-D 蛋白レベルがコントロールに比して上昇すること，さらに SP-D ノックアウトマウスでは，DSS 誘因による炎症が野生型マウスと比して低下することを明らかにした．この結果は，炎症性腸疾患において肺外の SP-D が何らかの役割を持つ可能性を示唆させるものであった．

一方，潰瘍性大腸炎は難治性に加えて癌化のリスクが高いことが問題となっており，そこには何らかのトリガーが存在するものと考えられており，その一つが p53 の mutation である．最近この mutation が血管新生を誘導するとの報告があり，このような中，肺における自然免疫，炎症作用において，SP-D と類似の作用をすることが知られている A disintegrin and metalloproteinase 17 （ADAM17）に着目した．ADAM17 は TNF-α変換酵素（TACE）としても知られているＩ型膜貫通タンパク質で，EGF family に属する細胞増殖因子（TGF-αなど），サイトカイン（TNF-αなど），サイトカイン受容体（IL-6R や TNF-R など），ErbB のリガンド（TGF-αなど），細胞接着因子（L-selectin や ICAM-1 など）などの細胞表面のタンパク質を分解する機能を持つシェディングタンパクである．近年，大腸癌（Blanchot-Jossic F, J Patho, 2005)を含む様々な癌種において ADAM17 が過剰発現していることが報告され，多くの癌種においてその悪性度（転移，浸潤）との関与が示唆される．さらに，マウスの大腸癌細胞株である MC38CEA を用いた実験では，ADAM17 を抑制することで血管形成に重要な vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)，matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を抑制することが明らかとなった（Das S, PLoS One, 2012).

そこでわれわれは，本来大腸粘膜において炎症や常在菌に対する過剰な免疫応答を抑制するのに働く SP-D が，炎症性腸疾患では，逆に炎症惹起を促進させ慢性炎症の持続に寄与していると考察している．さらに，慢性炎症状態の腸管において ADAM17 の以上活性が炎症性発癌につながるという仮説を考えて本研究を計画するに至った．

２．研究の目的

主に肺(２型肺胞上皮細胞)で生成されるサーファクタントプロテイン D (SP-D) は，肺以外の血管上皮や消化管上皮細胞においてもわずかに存在することが知られているが，その生理的役割についてはほとんど知られていない．われわれはこの肺外の SP-D に関してこれまで炎症性腸疾患の病態における意義について研究を進めてきた．A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) は TNF-α変換酵素(TACE)であるが，肺での自然免疫において SP-D とよく似た働きをしており，さらに最近では，大腸癌細胞株において過剰発現し，ADAM17 遺伝子抑制細胞株ではその増殖が抑制されることが報告された．そこで今回われわれの研究は，炎症性腸疾患背景大腸発癌における SP-D の役割を明らかにすること，さらには ADAM17 との関連性について明らかにすることを目的とした

３．研究の方法

(1) 動物モデル：6～8 週齢の C57BL/6（SP-D ノックアウトあるいは ADAM17 腸管コンディショナルノックアウトマウス）にアゾキシメタン（AOM） 2.5mg/kg を腹腔内投与後に 2.5%デキストラン硫酸（DSS）を混入した飲料水を１週間，その後通常の飲料水を 2 週間投与を 3 サイクル繰り返して，安楽死させる．方法は 4%イソフレン吸入麻酔下に開腹し，下大静脈より血液を可及的に採取した後，腹部大動脈を切開し失血死させる．その後，大腸（盲腸～直腸）組織を摘出する．摘出した大腸は 10%パラホルマリンで約 48 時間固定後，パラフィン包埋し，10μm の組織切片を作成する．さらに組織（盲腸，結腸，直腸）の一部を−80℃にて凍結保存し，後に RNA 抽出やウェスタンブロット法による蛋白解析を行う．コントロール群としては週齢を合わせた通常の C57BL/6 マウスに同様の処置をしたものを使用する．

(2) 免疫組織化学染色：10%パラホルマリン固定パラフィン包埋組織より 10μm の腸管断面切片スライドを作成する．染色は Avidin-biotin peroxidase 法（Dako, Glostrup, Denmark）を用いて行う．具体的にはペルオキシダーゼを失活させ，PBS 溶液で洗浄後，一次抗体（ウサギ抗ポリクローナル SP-D 抗体（BIOSS 社）あるいはウサギ抗ポリクローナル ADAM-17 抗体(LSBio 社)）を乗せて 4℃で 24 時間反応させ，PBS 溶液で充分に洗浄する．二次抗体

(Envision キット）を室温で 30 分間反応させてから，PBS 溶液で十分に洗浄し，DAB 溶液（Envision キット）を約 15 分間反応させる．デジタルカメラ付き光学顕微鏡（ニコン，東京）にて画像を取り込み，Photoshop5.0 にて画像解析を行う．

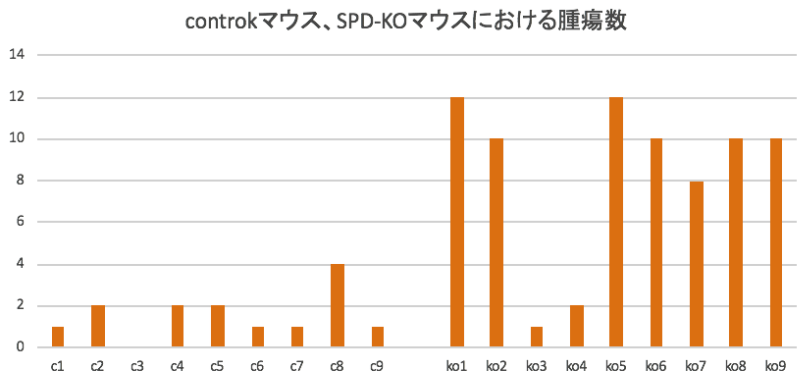
(3) 定量的 RT-PCR：RNA を新鮮凍結組織あるいは血液検体より TRIzol reagent（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて抽出し，さらに TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いて，100ng の RNA より cDNA を生成する．SP-D, ADAM17 に対する定量的 RT-PCR は，Universal Taqman master mix (ABI Systems)を用い，プライマーを設計し，PCR 条件は，熱変性 94°C，30 秒，アニーリング 62°C，1 分，伸長 72°C，2 分，35 サイクルとし，PCR 産物は 1%アガロースゲル上で可視化して確認する．

(4) ウェスタンブロット法：凍結組織をサンプルバッファーにてホモジネイトし（血液検体の場合は２倍濃度のサンプルバッファー），12000×g で 10 分間遠心して得た蛋白 100μg を 2-メルカプトエタノールで 99°C，5 分間熱処理後，ゲルに電気泳動し，セルロースメンブレンに転写する．5%スキムミルクと 1%BSA でブロッキングしたあと，一次抗体（ポリクローナル抗ウサギ SP-D 抗体（BIOSS 社）あるいはポリクローナル抗ウサギ抗体（LSBio 社））と 4°Cにて 24 時間反応させる．TBS-T で再び洗浄後，二次抗体を室温にて 1 時間反応させ，再び TBS-T で洗浄する．Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (WAKO）を用いた化学発光法にて得た画像は Photoshop5.0 にて画像解析を行う．

(5) ADM17 腸管コンディショナルノックアウト（ADAM17-CKO）マウスと SP-D ノックアウト（SP-D-KO）マウスを交配させてダブルノックアウト（DKO）マウスを作成する．DKO マウスを用いて前述の炎症性発癌を誘導し，SP-D-KO マウスおよび ADAM17-CKO マウスと発癌の頻度，癌部の個数などを比較する．さらに癌部，非癌部の組織における炎症性サイトカインや腸管免疫に関与している TNFα や CD91，TLR4 などの遺伝子および蛋白レベルにつき比較検討する．

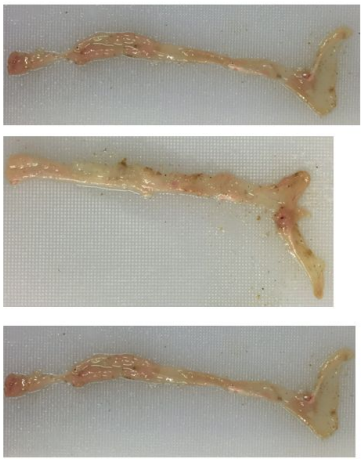
４．研究成果

(1) コントロールマウス（C57BL/6）と SP-D ノックアウトマウス（SP-DKO）それぞれ 10 匹に AOM および DSS を投与し，炎症性発癌モデルマウスを作製した．結果それぞれ 9 匹が最終的に生存し，安楽死後に腸管を摘出し，評価可能であった．C57BL/6 マウスでは 8 匹（88.9%），SP-DKO マウスでは 9 匹すべて（100%）のマウスで 1 個以上の腫瘍発生が肉眼的に確認された．腫瘍の個数は SP-DKO マウスで有意に多く，C57BL/6 マウスでは直腸を中心に病変が多いのに対して SP-DKO マウスでは，全大腸にびまん性に腫瘍の発生が認められた．この結果から，SP-D がやはり炎症性発癌のリスクを抑制する可能性が示唆された．

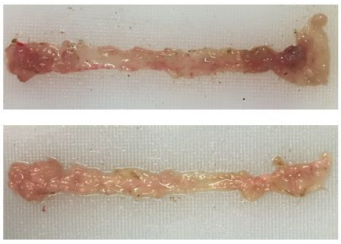


- SP-DKOマウスの方が、腫瘍がびまん性に数多く形成される傾向にある

《control》



《SP-D KO》



●Controlでは直腸を中心に多発性の腫瘤を認めた.

●SP−D KOでは全大腸に渡ってびまん性に腫瘍の形成を認めた.

→腫瘍形成に対してSP-Dは保護的に作用する?

(2) さらにそれぞれの腫瘍の分子的な相違点を炎症性発癌に炎症性発癌に関連する様々な分子（EGFR，pEGFR，ERK，pERK，p53，Ki67,ADAM17）のタンパクレベルをそれぞれの分子に対する抗体を用いて免疫組織染色法にて比較検討を行った．結果これらの分子のタンパクレベルにおいて明らかな差異を見出すことはできず，一般的に知られる炎症性発癌に関連するマーカーと SP-D に関連はない可能性が考えられた．今後は，それぞれの腫瘍のマイクロアレイによる網羅的解析を行い，候補遺伝子の検索を行っていく．

(3) 当初 ADAM17 コンディショナルノックアウトマウスと SP-D ノックアウトマウスを交配させてダブルノックアウトマウスを作成して，両分子の関係について検討する予定であったが，マウスの感染症などのトラブルにより供与予定であった ADAM17 コンディショナルノックアウトマウスの作成に時間を要したことから，ADAM17 コンディショナルノックアウトマウスおよびダブルノックアウトマウスでの検討には至らなかった．また(2)の結果を踏まえると炎症性発癌と ADAM17 の関連性については，再検討の必要性があると考えらえた．

(4) 今後はこれまでの結果をまとめ，さらに(2)の網羅的解析の結果を加えて学会あるいは論文化を目指していく．少なくとも SP-D が炎症性発癌に関連しており，SP-D がそのバイオマーカーとして有用であることや，予防治療に応用できる可能性が期待できる．今後は前述した網羅的解析を進めるとともに，前臨床研究に進めていきたいと考えている．

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〕

○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：鶴田　雅士

ローマ字氏名：TSURUTA，Masashi

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：講師
研究者番号（8 桁）：00348666

※科研費による研究は，研究者の自覚と責任において実施するものです．そのため，研究の実施や研究成果の公表等については，国の要請等に基づくものではなく，その研究成果に関する見解や責任は，研究者個人に帰属されます．