

Title	Macrophageを介した肥満関連大腸癌の発癌メカニズムの解明
Sub Title	Macrophage-mediated mechanism of the obesity-associated colorectal carcinogenesis
Author	鈴木, 佳透(Suzuki, Yoshiyuki)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>肥満と大腸癌発癌の関係性は疫学的に証明され、肥満関連大腸癌の存在が示唆されている。しかしながら、発癌の分子生物学的メカニズムは明らかでない。われわれはこれまでに、サイトカインが肥満関連大腸癌に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。今回のわれわれの研究成果から、大腸粘膜においてEph-ephrin signalが肥満状態を引き金に発現が変化することで、発癌、そしてその後の癌の増殖に強く関与していることと、肥満状態においては炎症性サイトカインが腸上皮のcrypt構造を変化させ、癌化に関与していることが証明された。</p> <p>Excess body weight and obesity are great concern throughout the world and are reported to associate with increase in risk of colorectal cancer. In normal intestinal mucosa, progenitor cells generated from stem cell located in bottom of crypt differentiate and repopulate to the direction of lumen, which are regulated by EPH-ephrin signals. We elucidated following results. In obesity model mice, tumor numbers significantly increased compared with control mice and apoptosis assay revealed there were less apoptotic cell in normal mucosa in both obesity mice and patients with obesity. In immunohistological analysis of normal mucosa, ephrin B1 expression was down-regulated in obesity mice and patients with obesity. Obesity and its inflammation suggested to induce down-regulation of ephrin signal and leads to mutation of crypt-villus axis, which results in increase of oncogenesis. In addition, in obese state cancer proliferation is promoted concomitantly with silencing of EPH-B2.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2017 課題番号：16K18425 研究分野：外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K18425seika

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.

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18425

研究課題名(和文) Macrophageを介した肥満関連大腸癌の発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Macrophage-mediated mechanism of the obesity-associated colorectal carcinogenesis

研究代表者

鈴木 佳透 (Suzuki, Yoshiyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60649945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満と大腸癌発癌の関係性は疫学的に証明され、肥満関連大腸癌の存在が示唆されている。しかしながら、発癌の分子生物学的メカニズムは明らかでない。われわれはこれまでに、サイトカインが肥満関連大腸癌に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。今回のわれわれの研究成果から、大腸粘膜においてEph-ephrin signalが肥満状態を引き金に発現が変化することで、発癌、そしてその後の癌の増殖に強く関与していることと、肥満状態においては炎症性サイトカインが腸上皮のcrypt構造を変化させ、癌化に関与していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Excess body weight and obesity are great concern throughout the world and are reported to associate with increase in risk of colorectal cancer. In normal intestinal mucosa, progenitor cells generated from stem cell located in bottom of crypt differentiate and repopulate to the direction of lumen, which are regulated by EPH-ephrin signals. We elucidated following results. In obesity model mice, tumor numbers significantly increased compared with control mice and apoptosis assay revealed there were less apoptotic cell in normal mucosa in both obesity mice and patients with obesity. In immunohistological analysis of normal mucosa, ephrin B1 expression was down-regulated in obesity mice and patients with obesity. Obesity and its inflammation suggested to induce down-regulation of ephrin signal and leads to mutation of crypt-villus axis, which results in increase of oncogenesis. In addition, in obese state cancer proliferation is promoted concomitantly with silencing of EPH-B2.

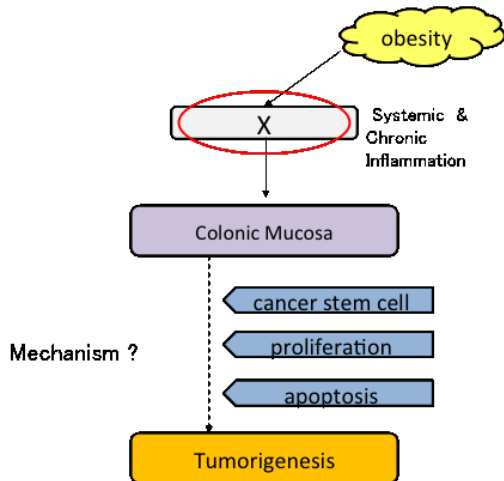
研究分野：外科学

キーワード：肥満 大腸癌 発癌

1. 研究開始当初の背景

・サイトカインの異常と大腸腺腫

われわれは先行の研究において、発癌物質であるアゾキシメタンを投与した KKAY マウス (肥満モデルマウス) では野生型マウスと比較して、腫瘍の発生数・腫瘍径が有意に増大することを確認した。サイトカインアレイを行うと肥満マウスではさまざまな炎症性サイトカインが上昇しており、肥満に伴う慢性炎症が肥満と発がんの関係に大きな役割を果たしていると考えられた。



・肥満と Macrophage の遊走

癌組織に浸潤した Macrophage である Tumor-Associated Macrophage (TAM) は血管新生、増殖因子産生、免疫抑制、転移促進などに関与し、発癌を促進することが明らかとなっている。われわれの先行の研究(図1)から肥満マウスの大腸粘膜に Macrophage の遊走がより多くなっていることを確認しており、肥満関連大腸癌に Macrophage が深く関与していると考えている。炎症反応により組織に浸潤した Macrophage は、M1 型または M2 型に分化することが知られている。M1 Macrophage が抗腫瘍免疫を誘導するのに対して M2 Macrophage は細胞増殖や浸潤、血管新生、リモデリングを誘導して向腫瘍作用を示し、全く異なるものである。炎症性サイトカインは Macrophage に極性変化をもたらすため、肥満に伴う炎症性サイトカインの過剰産生が Macrophage に極性変化もたらし、肥満関連大腸癌につながるとわれわれは推測している。

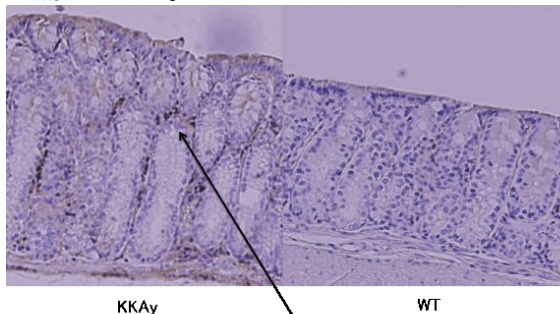


図1: F4-80染色: 肥満モデルマウスでは間質にMacrophageが遊走している。

・肥満と crypt-villus axis の異常

肥満マウスの大腸粘膜に TUNEL アッセイ

を行ったところ、apoptosis を生じた細胞の position が野生型マウスと KKAY マウスでは異なり、crypt-villus axis に変化が生じていた(図2)。crypt-villus axis とは、陰窩底部に存在する腸幹細胞が腸細胞、胚細胞に分化して腸管内腔方向に進み、絨毛頂部で apoptosis を生じて脱落する現象であるが、この結果から 肥満マウスでは何らかの原因で crypt-villus axis に乱れが生じていると考えられた。

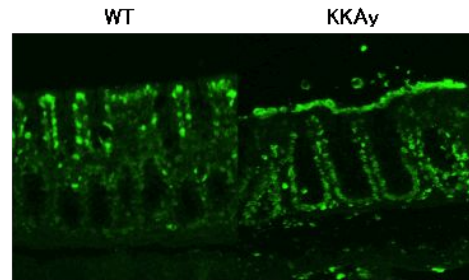


図2: WTマウスでは陰窩の内腔側でapoptosisが起きているが、KKAYマウスでは底部~中間部が多い。

・ crypt-villus axis と EphB-ephrinB シグナル

crypt-villus axis をコントロールする因子としては EphB-ephrinB シグナルが有名である。EphB レセプターはチロシンキナーゼ型受容体であり、そのリガンドである ephrinB1 との反発により、陰窩の EphB 陽性細胞は管腔側への移動を抑制されており、癌化の抑制において EphB-ephrinB の相互作用が重要な役割を担っている。肥満環境下では、この EphB-ephrinB シグナルが変化することが示唆されている。 Macrophage 遊走因子の一つである MCP-1 は、局所の炎症を助長して ephrinB1 の発現を抑制し、ephrinB1 の抑制下では MCP-1 が上昇する positive feed back が存在していると報告されている(図3)

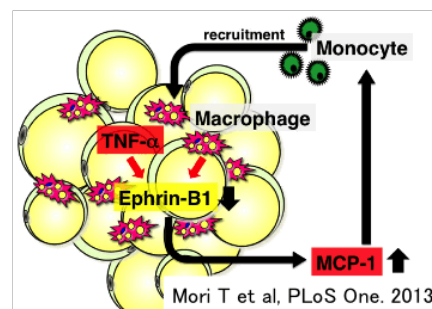


図3: MCP-1とephrinB1のpositive feed back

2. 研究の目的

肥満環境下では Macrophage と炎症性サイトカインの働きにより変化した EphB-ephrinB シグナルが腸管の crypt-villus axis の変異をきたし、発癌を促進している可能性がある。本研究では、肥満による炎症性サイトカインの上昇と Macrophage の極性変化、EphB-ephrinB シグナルを介した crypt-villus axis の乱れの間関係を明らかにすることで、肥満関連大腸癌の発癌メカニズム

ムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

・ 肥満と crypt-villus axis の変異の解析

本研究では C57/B6 マウスおよびその肥満マウスである KKAy マウスを用いて、肥満状態での大腸発癌のメカニズムを *in vivo* で解析する。

(1) 炎症性サイトカインによる Macrophage の組織への遊走を KKAy マウスを用いて確認する。

予備実験において KKAy マウスでは粘膜固有層への Macrophage 遊走が増加していると考えられたため、今研究では、遊走 Macrophage の数を評価する。さらに MCP-1 などの Macrophage に関連した炎症性サイトカインの免疫染色を行い、肥満状態での炎症性サイトカインの評価を行う。また、粘膜固有層へ遊走した Macrophage の機能を評価する目的で、fluorescence activated cell sorting(FACS)を用いる(図 4)。FACS で CD14 や CD163 といった Macrophage の M1/M2 で異なる表面抗原を用いることで、肥満状態の Macrophage の機能解析を行う。

(2) 肥満状態で上昇しているサイトカインを解析する。

肥満モデルマウス(KKAY マウス)の腸管において上昇しているサイトカイン(特に MCP-1)を、multiplex assay を用いて解析し、後に述べるオルガノイドを用いた研究に用いる候補サイトカインを抽出する。

(3) EphB-ephrinB シグナルの変化と肥満の関連性を、肥満モデルマウスにおいて明らかにする。

EphB-ephrinB シグナルはそれぞれの反発により腸管の crypt-villus axis を形成することが報告されており、陰窩の底部~管腔側で、EphB2,B3, ephrinB1 の発現が漸次的に減少、増大していることが確認されている。そこで、免疫染色を用いて KKAy マウスの腸管上皮での EphB2,B3, ephrinB1 の発現を解析する。

・ オルガノイドを用いて、*in vitro* において、肥満による大腸発癌のメカニズムを明らかにする。

ヒトオルガノイドを用いて、炎症性サイトカイン暴露下・マクロファージ共培養下で癌化のメカニズムを再現する。

上記までの実験結果をふまえて、肥満における腸管上皮の癌化メカニズムを解析する目的で、オルガノイドを実験モデルとした研究を行う。オルガノイド培養は、腸上皮から得た腸上皮幹細胞を、EGF、Noggin、R-spondin とともにマトリジェル中で三次元培養することで得られる、長期間の培養が可能な腸上皮陰窩モデルである。オルガノイド培養は純粋な上皮細胞を培養しており、嚢胞状の対照的な構造をとる。肥満環境で上昇する炎症性サイトカイン(MCP-1 など)にオ

ルガノイドを暴露するもしくはマクロファージと共培養することで、オルガノイドの増殖能の変化を解析する。この際に EphB-ephrinB の発現がいかに変化するか、オルガノイドの crypt 様の発芽構造が変化するか、WNT シグナル(β -catenin や TCF)や癌化のマーカー(CD44 などの cancer stem cell マーカー)の発現が上昇するかについても解析を行う。

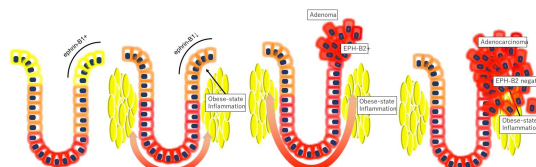
4. 研究成果

Eph-ephrin signal

肥満モデルマウスにおいて正常大腸粘膜の ephrinB1 の発現が低下することを示した。それによって Eph-ephrin 間の反発が減少し、大腸粘膜での apoptosis の変容、減少をきたし、癌化の原因になっていることが示唆された。

また、腫瘍内の EphB2 の発現が低下し、それがより進行癌で低下することを示した。それにより Eph-ephrin 間の反発が完全に消失し、より腫瘍の増大につながることを示唆された。

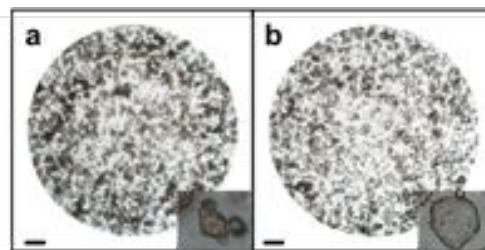
これらの結果から、大腸粘膜において Eph-ephrin signal が肥満状態を引き金に発現が変化することで、発癌、そしてその後の



癌の増殖に強く関与していることが証明された。

サイトカインアッセイ、オルガノイド

サイトカインアッセイにおいて肥満モデルマウスの血中で上昇している炎症性サイトカインを同定した。大腸オルガノイドにこれらのサイトカインを暴露することで起こる変化を観察したところ、IL-13 の暴露により増殖の促進と crypt 構造の変化、極性の変化を確認することができた。このことは肥満状態において炎症性サイトカインが腸上皮の crypt 構造を変化させ、癌化に関与して



いることを示唆している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

①鈴木佳透、岡林剛史、松井信平、長谷川博俊、鶴田雅士、石田隆、杉浦清昭、中太淳平、安藤知史、徳田敏樹、北川雄光
肥満関連大腸癌における Eph-ephrin シグナルの働き
第 27 回日本消化器癌発生学会総会
2016

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 佳透 (SUZUKI, Yoshiyuki)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号 : 60649945

(2)研究分担者