

発癌起点に着目した加齢による大腸癌発癌機構の解明

東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

五十嵐 正樹

(研究目的)

発癌の起点となる細胞を同定し、その発癌に関わるメカニズムを解明することは、発癌の予防、治療法を開発する上で重要なプロセスである。一般に、幹細胞は自己増殖と分化によって組織を維持する一方、発癌の起点となりうるということが知られる。申請者は、加齢に伴い腸管上皮幹細胞の増殖能力が低下するものの、腸管上皮前駆細胞 (Transient amplifying cells (TA 細胞)) はその増殖能力を増し分化能力を失うことを見出した。本研究では、高齢者大腸癌の発癌の起点となりうる細胞として、幹細胞より生じる TA 細胞に着目し、大腸癌発癌のメカニズムを明らかにすることで、高齢者の大腸癌予防、治療法開発に役立てることを目的とする。

また、申請者の過去の論文 (Igarashi M et. al., Cell. 2016, Igarashi M et. al., Aging Cell. 2019) から、長寿遺伝子 SIRT1 は腸管上皮細胞の加齢性変化に重要な役割をもつ。SIRT1 の加齢に伴う TA 細胞の増殖能力制御に着目し、SIRT1 の TA 細胞由来発癌における役割を解明する。本研究により、高齢者大腸癌の発癌の特性を理解し、そのメカニズムを明らかにすることで、高齢者大腸癌の予防、治療法開発へ展開させる。

(研究方法)

1. 老齢マウスにおける TA 細胞由来腺腫の悪性度の解析

TA 細胞特異的 cre 発現マウス (薬剤誘導性 CYP1A1 promoter cre (Ah1 cre) マウス) と floxed APC マウスを交配して、TA 細胞特異的発癌モデルマウスを作成する。Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 マウスでは、幹細胞を GFP high cells、TA 細胞を GFP low cells として単離して解析に用いる (Beyaz et. al., Nature. 2016)。

2. SIRT1 が大腸癌進展に関わるメカニズムの解明

腸管上皮幹細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2, floxed SIRT1) 、TA 細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (Ah1 cre floxed SIRT1) 、SIRT1 トランスジェニックマウスを使用する。それぞれ長期の高脂肪食負荷、あるいは、APC 欠損大腸癌の背景で、その生存率と大腸癌発症について検討する。

3. SIRT1 による腸管内分泌細胞数の制御機構解明とその生活習慣病改善への応用

後述のように、TA 細胞の大腸癌発癌への関わりを解析が方法論的に困難であることから、TA 細胞の一部である neurogenin 3 陽性内分泌前駆細胞に着目して、SIRT1 の TA 細胞を介した腸管内分泌細胞と代謝制御機構について解析を行った。腸管上皮特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (Villin cre floxed SIRT1 KO (VilKO)) (幹細胞や内分泌細胞を含めたすべての腸管上皮細胞で SIRT1 を欠失させたマウス)、内分泌前駆細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (Neurogenin3 cre floxed SIRT1 KO (NgnKO)) の解析を行う。これらのマウスから単離した腸陰窩からオルガノイド培養を行いメカニズム解明に用いる。また、NgnKO マウスを tdTomato レポーターマウスとかけあわせて、tdTomato によって内分泌細胞を単離して解析を行う。また、SIRT1 トラン

スジェニックマウス（全身）を準備した。

（結果）

1. 老齢マウスにおけるTA細胞由来腺腫の悪性度の解析

薬剤誘導性CYP1A1 creマウスでは、幹細胞でもある程度creが誘導されてしまい、TA細胞特異的にcreを誘導するような薬剤量の調整が極めて困難であった。また、CYP1A1 creとfloxed APCが同一の染色体にあり、floxed APC homoのマウスを作成することが理論上不可能であった。また、GFP high cells、TA細胞をGFP low cellsとしてsortingすることを試みたが、フローサイトメーターで、GFP high cellsとGFP low cellsの境界が不明瞭であり先行論文にあるようなsortingが不可能であった。

2. SIRT1が大腸癌進展に関わるメカニズムの解明

腸管上皮幹細胞特異的SIRT1ノックアウトマウス（Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2、floxed SIRT1）をfloxed APCマウスと交配すると、タモキシフェン誘導により、癌死によるものと思われる死亡がコントロールと比べ増加していた。また、GFP high cellsとGFP low cellsを含むGFP陽性細胞の解析を行うと、SIRT1ノックアウトマウスのGFP陽性細胞では、 β カテニンシグナルが増強していることがわかった。

3. SIRT1による腸管内分泌細胞数の制御機構解明とその生活習慣病改善への応用

TA細胞の大腸癌発癌への関わりを解析が上記のように方法論的に困難であることから、TA細胞の一部であるneurogenin 3陽性内分泌前駆細胞に着目して、SIRT1のTA細胞を介した腸管内分泌細胞と代謝制御機構について解析を行った。

高脂肪を負荷したVilK0マウスでは野生型のマウスと比べて、体重の減少、インスリン抵抗性の改善を認めるが、血中GLP-1、GIP濃度、腸管内分泌細胞数（chromogranin A陽性細胞）およびGLP-1陽性細胞（L細胞）数が2倍程度に増加していた。そのインスリン抵抗性の改善はGLP-1受容体アンタゴニストexendin9-39投与で消失することから、VilK0マウスでの代謝改善作用は、GLP-1上昇によって説明されることがわかった。一方で、腸管内分泌前駆細胞でSIRT1を欠失させたNgn3K0マウスに高脂肪食を負荷した。Ngn3K0マウスでも同様に、chromogranin A陽性細胞およびL細胞数の増加を認めており、VilK0マウスの表現型と同一である。VilK0マウスの表現型は、腸管内分泌前駆細胞におけるSIRT1欠失によって説明されると考えられた。

SIRT1の腸管上皮内分泌細胞数制御メカニズムを解明するためにNgnK0マウスをtdTomatoレポーターマウスと交配し、tdTomatoによって内分泌細胞を単離して、mRNAの定量PCR解析を行った。特に腸管内分泌細胞分化を方向づける転写因子であり、腸管内分泌前駆細胞のマーカーであるNeurogenin 3の有意な上昇を認めた。腸管内分泌細胞への分化に重要なNotchシグナルの変化は認めず、Notchシグナルの関与は否定的であった。Neurogenin 3の上昇は免疫染色でも確かめられた。

SIRT1欠失がNeurogenin 3 mRNA発現を上昇させるメカニズムを解析するため、Neurogenin 3プロモーターの5kbの領域をpGL4-lucベクターにつないで、HEK293や内分泌細胞株GLUtagにトランスフェクションした。HNF6やFoxa2の共発現がルシフェラーゼ活性を上昇させるのに対し、SIRT1阻害剤EX527の添加やshRNAによるSIRT1ノックダウンおよびSIRT1過剰発現はNeurogenin 3プロモーター活性に影響を与えなかった。このことから、SIRT1はNeurogenin 3プロモーターに直接結合しないことが示唆された。

次に、SIRT1欠失により腸管内分泌前駆細胞の増殖の可能性について検討した。高脂肪食を負荷したVilK0マウスの腸管組織標本でKi67の免疫染色を行った。腸陰窩のKi67陽性細胞の大半が前駆細胞であるが、VilK0

マウスでKi67陽性細胞数は2倍以上に増加した。このことから、VilKOマウスでは前駆細胞の増殖が亢進していることが示唆された。高脂肪を負荷したVilKOマウスから腸陰窩を単離して、ウエスタンブロットを行った。Ki67染色の結果に一致して細胞周期に関するCyclinB1、CyclinE、CyclinDの発現上昇を認めた。

さらにSIRT1欠損による内分泌細胞数増加のメカニズムを明らかにするため、VilKOマウスから単離した腸陰窩から腸管上皮オルガノイドを作成し、その免疫染色を行った。In vivoの免疫染色同様VilKOマウス由来オルガノイドでのchromogranin A陽性細胞数の増加を確認することができた。そして、CDK1/cyclin B and CDK2/cyclin Eを阻害する薬剤であるBMS-265246存在下でVilKOマウス由来オルガノイドを培養すると、VilKOマウス由来オルガノイドでのchromogranin A陽性細胞数増加を抑制することができた。このことから、腸管内分泌前駆細胞の細胞周期の進行がNeurogenin3発現上昇および内分泌細胞の増加を来すものと考えられた。

さらに、内分泌前駆細胞の細胞周期が腸管内分泌細胞数やL細胞数を規定することを確かめるために、内分泌前駆細胞特異的SIRT1ノックアウトマウス(Neurogenin3 cre floxed p53)を作成した。予想通り、このマウスでは腸管内分泌細胞数の増加と血中GLP-1濃度の上昇を確認した。

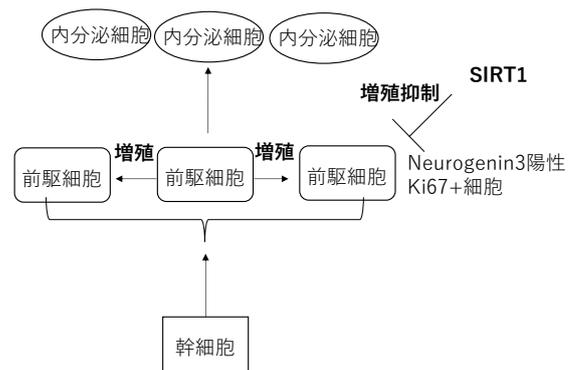
SIRT1欠失が細胞周期を進行させるメカニズムとしてβカテニン経路に着目した。腸管上皮細胞でSIRT1欠失がアセチル化によりβカテニン活性と細胞増殖を増加させることは示されている(Firestein R et al, Plos one 2008, Jung TY, et al. Exp Mol Med. 2020.)高脂肪食を負荷したVilKOマウス由来腸陰窩のウエスタンブロットでβカテニンの下流であるSOX9やc-mycの発現量が増加することを確認した。さらに、VilKOマウス由来腸陰窩のウエスタンブロットで、アセチルβカテニンの増加を確認した。また、βカテニンを阻害する薬剤であるJW55存在下でVilKOマウス由来オルガノイドを培養すると、VilKOマウス由来オルガノイドでのchromogranin A陽性細胞数増加を抑制することができた。

SIRT1トランスジェニックマウスでの解析では、neurogenin 3の発現低下とともに、腸管内分泌細胞数が低下することがわかった。Ki67発現低下、βカテニンの下流であるSOX9やc-mycの発現量低下、アセチルβカテニン発現の低下を認め、上記VilKOマウスでの結果と正反対であった。

(考察)

腸管上皮の内分泌前駆細胞の細胞周期の進行が、腸管内分泌細胞数とGLP-1分泌を規定する可能性が示唆された。今後、腸管上皮内分泌前駆細胞が、腸管内分泌細胞数を制御する新しい治療薬ターゲットとなる可能性を示唆するものである。中でも、腸管上皮の内分泌前駆細胞でのSIRT1欠失がβカテニン制御を通じて内分泌前駆細胞の細胞周期を制御していることがわかった。

生理的には、絶食やカロリー制限により腸管のSIRT1活性の上昇とともに腸管内分泌細胞数が低下することを報告している(Igarashi M, et al. Cell. 2016)。絶食による内分泌細胞数低下は、絶食における適応とも考えられるが、SIRT1活性の変化がその内分泌細胞数の変化を媒介する可能性が考えられる。また、糖尿病、肥満で内分泌前駆細胞のSIRT1発現の変化を明らかにすることで、SIRT1抑制による糖尿病治療効果について考察していきたい。



図：SIRT1が腸管内分泌細胞数を制御するメカニズム