

下部消化管における炎症による発癌機構の解明とその治療法の開発

大川原 辰也 [北海道大学大学院医学研究科／客員研究員]

背景・目的

炎症性腸疾患は長年の経過で炎症部位からの発癌が起こるが、通常の大腸癌と形態的、分子生物学的特徴が大きく違っている。今後ますます増加するこの疾病で新たな病態解明と治療開発が急務とされている。マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は炎症・免疫応答のイニシエーターとして機能するが消化管においてその発現が炎症によって強められる。ところでMIFは腫瘍増殖において重要であることも知られている。そこで本研究では炎症と発癌の両方に関与しているマクロファージ遊走阻止因子に注目して、下部消化管の炎症による発癌機構の解明及び新規治療開発を目的とする。

内容・方法

MIFノックアウトマウスを用いた Colitic cancer モデルの解析

Dextran Sulfate Sodium(DSS)長期投与などによる colitic cancer モデルを作成し、野生型および MIF ノックアウトマウスについて大腸腫瘍の発生を肉眼的および病理組織学的に解析する。

マウス大腸における DSS 投与による炎症・腫瘍関連遺伝子発現の変化の解析

上記と同様の方法で DSS を投与した際に、腸管においての遺伝子発現をマイクロアレイを用い炎症 および発癌関連遺伝子につきスクリーニングする。

Colitic cancer モデルマウスにおける炎症・腫瘍関連遺伝子、分子の発現の解析

Colitic cancer モデルの大腸で MIF、p53 や、ニトロチロシン、Cyclooxygenase(COX)-2 をウエスタンプロット及び免疫染色にて解析する。

DSS 誘導性 colitic cancer モデルにおける MIF ワクチンの効果の検討

上記の DSS 誘導大腸癌モデルを用い、MIF ワクチン導入マウスでの大腸腫瘍発生につき組織学的所見(大腸腫瘍の数や大きさなど)をワクチン非投与マウスと比較検討する。また p53 および COX-2 の発現を解析する。

結果・成果

DSS 投与による遺伝子発現の変化をマウス大腸組織において検討した。組織破壊により遺伝子発現が影響を受けないようにするために、DSS 投与のタイミングについて予備試験を行った。これにより大腸組織が破壊されず

大腸の MIF 蛋白発現が大幅に増強するのは3%DSS を投与し3日目あたりからであることが分かった。次に3%DSS を3日間投与した野生型マウス、MIF ノックアウトマウス、ただの水を投与した野生型マウス、MIF ノックアウトマウスの大腸組織を取り出し Affymetrix Gene Tip (Mouse 430 2.0 Array)による網羅的遺伝子発現の解析を行った。野生型マウスの DSS 投与と非投与において 1352 遺伝子が10倍以上の変化が見られた。MIF ノックアウトマウスの DSS 投与と非投与において 1532 遺伝子が10倍以上の変化が見られた。DSS 非投与の野生型と MIF ノックアウトマウスにおいては 1470 遺伝子、DSS 投与の野生型と MIF ノックアウトマウスにおいては 1552 遺伝子が10倍以上の差を示した。DSS 投与の野生型および MIF ノックアウトマウスにおいて、特に 1000 倍近くの変化を見せた遺伝子として Beta-microseminoprotein、Palmitoyl protein thioesterase - like protein(Vpp 1)、Experimental autoimmune prostatitis antigen 1(Eapa1)、Apolipoprotein F、Cytochrome P450 であった。また、DSS 投与の影響を蛋白レベルでの解析(ウエスタンプロット)で、Cyclooxygenase-2(大腸がん発生に関与する分子)を検討したところ、野生型と比して MIF ノックアウトマウスでその発現が低下していた。

予備試験の Colitic cancer モデルにおいて、低濃度 DSS 繰り返し投与におけるがん発生の頻度はあまり高くなく、特に MIF ノックアウトマウスのバックグラウンドの系である BALB/c マウスでは発生が悪かったため、アゾキシメタン(AOM)1–2mg/kg を DSS 投与前に1回投与し、その後1–2%DSS 投与を行うモデルを検証したところ、BALB/c マウスにおいても 18 週後にはほぼ 100% のマウスに複数の腫瘍発生が認められた。その後、MIF ノックアウトマウスと野生型マウスにおいて、この Colitic cancer モデルを検証したところ、腫瘍発生は MIF ノックアウトマウスで 10% 以下、野生型で 90% 以上認め、その腫瘍数も MIF ノックアウトマウスで平均 0.7 ± 0.7 個/匹、野生型マウスで 76 ± 3.8 個/匹と顕著な差を認めた。

今後の展望

現在、Colitic cancer モデルの各サンプルで、MIF、COX-2、ニトロチロシンや p53 などの腫瘍関連分子の発現を免疫染色とウエスタンプロット法で検証している最中である。また網羅的遺伝子解析の中で注目する遺伝子を絞り MIF との関係を検証する。これらについて検証を進めた後、MIF がこの colitic cancer モデルでの役割が重要であることを解明後、MIF 抗体や活性阻害剤、また MIF ワクチンによる自己抗体誘導で MIF 発現を調整し癌の予防や治療につながるかを検証し治療法開発へのきっかけを試みたい。