

高齢者におけ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

助教 五十嵐 正樹

はじめに

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。Lgr5陽性腸管上皮幹細胞は、高い自己複製能力を持ち、大腸癌発癌の主な起点となることが知られる。一方、腸管上皮前駆細胞TA細胞 (Transient amplifying cells) は増殖能力を持つが、TA細胞を起点とした腺腫の成長は認めにくいことが知られている⁽¹⁾。しかし、最近の報告で、長期間の高脂肪食負荷では、TA細胞が幹細胞同様な高い増殖能力をもち、TA細胞からも幹細胞と同様に大腸癌を発症することが報告された⁽²⁾。加齢によるTA細胞の変化については、国内外の他グループからの報告はなく、TA細胞については幹細胞ほど研究が進んでおらず、その役割や性質もあまり分かっていないのが現状である。

NAD⁺依存性脱アセチル化酵素SIRT1は腸管上皮細胞の加齢性変化に重要な役割をもつことを、著者は報告してきた^(3, 4)。SIRT1の大腸癌への関わりに関しては、腸管上皮でのSIRT1過剰発現が大腸癌進展を抑制するという報告⁽⁵⁾と、逆に、腸管上皮SIRT1の抑制が大腸癌進展を抑制するという報告があり⁽⁶⁾、いずれもSIRT1とβカテニンとの関わりが示唆されるが、なぜ相反する報告が存在するのか、その理由は明らかではない。実験系によってSIRT1の関与が異なることが示唆されるが、幹細胞由来発癌とTA細胞由来発癌とでSIRT1の関与が異なる可能性を考え、本研究においてその仮説を検証する。

高齢者大腸癌の発癌の起点とな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、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。

具体的に、以下の項目を解析する。

1. 加齢における幹細胞、TA細胞の機能変化の解析

若齢マウスと老齢マウスにBrdUの腹腔内注射を行い、その2時間後のBrdU陽性細胞の解析からTA細胞の増殖能力を、24時間後のBrdU陽性細胞の移動距離からTA細胞の分化能力を見積もる。

Lgr5陽性腸管上皮細胞がGFPでラベルされたLgr5-EGFP-IRES-CreERT2マウスより幹細胞をLgr5^{high}細胞、TA細胞をLgr5^{low}細胞として単離する。FACSによりTA細胞の数を見積もる。

さらに、若齢および老齢マウスのLgr5陽性幹細胞のRNAシーケンスのデータからGene Ontology解析を行い、老齢マウスの幹細胞における遺伝子発現変化を調べる。

2. 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マウス⁽⁷⁾、ないしNeurogenin3 promoter cre発現マウス（全ての内分泌系前駆細胞と他の系統の腸管上皮前駆細胞の一部に発現する））とfloxed APCマウスを交配して、老齢あるいは若齢マウスに、TA細胞由来APC欠失大腸腺腫を誘導してそのサイズや組織（悪性度）を比較、解析する。癌の由来は、tdTomatoレポーター遺伝子で追跡する。

3. SIRT1が大腸癌進展に関わるメカニズムの解明

SIRT1活性の変化により老齢マウスにおいては発癌の起源が幹細胞からTA細胞側にシフトすると考え、SIRT1遺伝子改変マウスを用いて検証する。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（Cyp1a1 creないし、Neurogenin3 promoter cre floxed SIRT1）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。

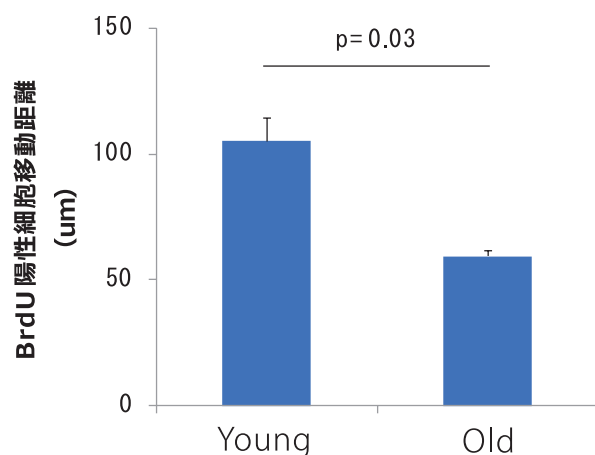
SIRT1欠損の幹細胞増殖低下、TA細胞増殖増加に関わるメカニズムを、単離したSIRT1欠損幹細胞やSIRT1欠損TA細胞の遺伝子発現の網羅的解析により明らかにする。

結 果

1. 加齢における幹細胞、TA細胞の機能変化の解析

若齢マウスと老齢マウスにBrdUの腹腔内注射を行い、その2時間後のBrdU陽性細胞の組織染色から、加齢により幹細胞のBrdU取り込みは低下を示すが、TA細胞のBrdU取り込みはわずかであるが増加傾向を示すことがわかった。一方で、BrdU注射後24時間の検討から、老齢マウスではTA細胞の分化能力が半分程度に低下していることが確認された(図1)。

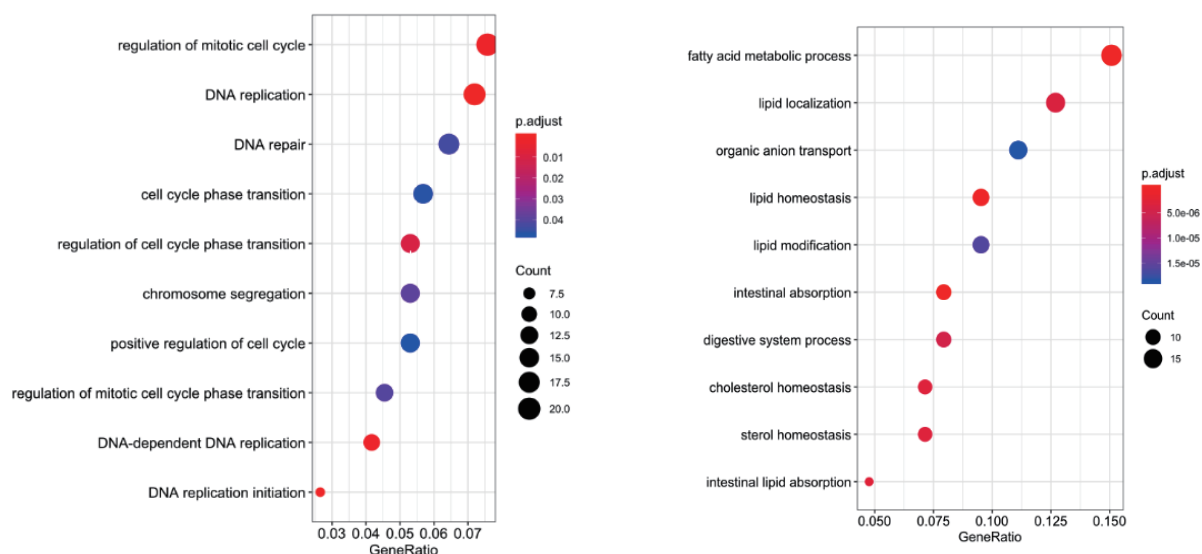
図1 BrdU注射後24時間のBrdU陽性細胞の移動度



老齢マウスでは、TA細胞の分化が障害されている。

次に、Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2マウスより幹細胞とTA細胞をそれぞれ単離して、FACSによる解析を行ったところ、加齢に伴い幹細胞数が低下するが、TA細胞の割合が逆に増加傾向を示すことがわかった。そして、Lgr5陽性幹細胞におけるRNAシーケンスを施行すると、加齢において、細胞周期の進行に関わる遺伝子発現の低下を認め、逆に吸収などに関わる遺伝子発現の亢進を認め、加齢に伴い幹細胞が分化傾向を認めることが確かめられた(図2)。

図2 幹細胞で加齢に伴い発現が低下する遺伝子群(左)と増加する遺伝子群(右)



老齢マウスの幹細胞では、DNA複製、細胞周期に関する遺伝子群の発現低下を認める一方で、消化吸収に関わる遺伝子発現が増加している。幹細胞の分化傾向を認める。

2. 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マウスをfloxed APCマウスと交配した。細胞の系譜は、tdTomatoレポーター遺伝子で追跡できるようにした。高容量(50mg/kgBW)のbeta-Naphthoflavone投与では、cre組み換え酵素が腸管上皮幹細胞を含むすべての腸管上皮細胞で発現されるが、低用量(50mg/kgBW)のbeta-Naphthoflavone投与では、幹細胞を除く腸管上皮細胞(TA細胞含む)でcre発現が誘導されることをcre抗体やtdTomato抗体による免疫染色で確認した。しかし、残念なことに、交配によりfloxed APCのホモ変異体(Cyp1a1 cre, floxed APC/floxed APC)のマウスを得ることができなかった。Cyp1a1 cre とAPCが同じ染色体に位置していることが原因として考えられた。そこで、代わりに、floxed APCのヘテロ変異体(Cyp1a1 cre, floxed APC/WT)を使用した。APCのホモ欠失体ではないため、このモデルでは短期間で明らかな大腸腺腫を誘導することが不可能であった。

3. SIRT1が大腸癌進展に関わるメカニズムの解明

長期間の高脂肪食負荷により高率に大腸癌を発症する。マウスが高齢になるまで1年以上高脂肪食を負荷すると、コントロールのマウス (n=10) は90%生存したが、主に内分泌系TA細胞でSIRT1を欠失させたノックアウトマウス (Neurogenin3 promoter cre floxed SIRT1 マウス (n=5)) は、観察期間内にすべてのマウスが死亡した。

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 (Cyp1a1 cre floxed SIRT1)、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 (Cyp1a1 cre ではfloxed APCはhetero)、その生存率と腸管上皮組織の β カテニン染色の評価を行った。高脂肪食負荷においては、幹細胞特異的SIRT1 ノックアウトマウス、TA細胞特異的SIRT1 ノックアウトマウスの双方で β カテニンの染色の増強、核内 β カテニンの発現増加を認める。また、普通食負荷においては、若齢の幹細胞特異的SIRT1 ノックアウトマウスはAPC欠損の背景でcontrolと比べ遅期に死亡したが、老齢の幹細胞特異的SIRT1 ノックアウトマウスでは逆に早期に死亡し、肉眼的な大腸癌進展と、組織染色における β カテニンの染色増強、核内 β カテニンの増加を認めた。以上から、SIRT1欠損の発癌に与える影響が、マウス週齢により異なることがわかった。

さらに、これらSIRT1 ノックアウトマウスにおいて、幹細胞と、TA細胞を含む分化がより進んだ細胞での遺伝子発現変化をそれぞれ解析した。高脂肪食負荷時の比較であるが、幹細胞では、Wntシグナル、Hippo-YAP経路の低下傾向を認めるが、TA細胞以降の分化した細胞では、逆にcyclinEやHippo-YAP経路の上昇傾向を認めた。また、単離した幹細胞のオルガノイド形成がSIRT1 ノックアウトマウスでは低下しており、幹細胞ではWntやHippo-YAP経路が低下していることを示唆する。

考 察

以上より、SIRT1によるWntシグナル、Hippo-YAP活性の制御が、幹細胞とTA細胞とで異なる可能性が示唆された。SIRT1は幹細胞からの発癌を抑制し、TA細胞からの発癌を促進すると考えられる。また、SIRT1欠損が、若齢では発癌抑制に働き老齢では発癌促進的に働く。老齢の幹細胞ではTA細胞と似た遺伝子プロファイルをもつことから、老齢の幹細胞がTA細胞化することによってSIRT1によるWntシグナル、Hippo-YAP活性の制御が変化した可能性がまず考えられる。

さらに、このSIRT1によるこれらの経路の幹細胞とTA細胞での相違が、高齢者大腸癌の発癌母地そのもの変化に寄与する可能性も考えられ、今後、さらにその制御機構の詳細を明らかにしていく。

要 約

Lgr5陽性腸管上皮幹細胞は、高い自己複製能力を持ち、大腸癌発癌の主な起点となることが知られる。しかし、加齢に伴い、幹細胞増殖能力が低下するものの、TA細胞の増殖能力が増加することを見出した。また、SIRTの発現は加齢に伴い低下するが、SIRT1の欠失は、幹細胞においてはWntシグナル、Hippo-YAP経路を低下させるが、TA細胞の分化細胞ではむしろ活性化させる方向に働く。そして、若齢マウスでは、SIRT1欠損により発癌頻度が低下するが、老齢マウスでは逆に上昇することからも、発癌母地が幹細胞からTA細胞側にシフトする可能性が考えられ、さらに検証を進める。

文 献

1. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 457:608-611.2009
2. Beyaz S, Mana MD, Roper J, Kedrin D, Saadatpour A, Hong SJ, Bauer-Rowe KE, Xifaras ME, Akkad A, Arias E, Pinello L, Katz Y, Shinagare S, Abu-Remaileh M, Mihaylova MM, Lamming DW, Dogum R, Guo G, Bell GW, Selig M, Nielsen GP, Gupta N, Ferrone CR, Deshpande V, Yuan GC, Orkin SH, Sabatini DM, Yilmaz ÖH. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature*. 531:53-58.2016
3. Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell*. 166:436-450.2016
4. Igarashi M, Miura M, Williams E, Jaksch F, Kadowaki T, Yamauchi T, Guarente L. NAD⁺ supplementation rejuvenates aged gut adult stem cells. Igarashi M, Miura M, Williams E, Jaksch F, Kadowaki T, Yamauchi T, Guarente L. e12935.2019
5. Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, Hahn WC, Guarente LP, Sinclair DA. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One*. 3:e2020.2008
6. Leko V, Park GJ, Lao U, Simon JA, Bedalov A. Enterocyte-specific inactivation of SIRT1 reduces tumor load in the APC (+/min) mouse model. *PLoS One*. 8:e66283.2013
7. Tsujita T, Peirce V, Baird L, Matsuyama Y, Takaku M, Walsh SV, Griffin JL, Uruno A, Yamamoto M, Hayes JD. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes. *Mol Cell Biol*. 34:3800-3816.2014