

主論文の要旨

**Effects of growth arrest and DNA
damage-inducible protein 34 (GADD34) on
inflammation-induced colon cancer in mice**

〔 マウス炎症関連大腸癌発症における
ストレス応答遺伝子 GADD34 の役割 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子細胞免疫学分野

(指導：荒川 宜親 教授)

田中 ゆりこ

【緒言】

高齢化、食の欧米化により大腸癌は日本でも増加傾向にあり、その要因の一つとして大腸粘膜の持続的炎症が挙げられる。潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患が大腸癌発生のリスクを高めることが報告されているが、潰瘍性大腸炎の発症機構や大腸癌誘導のメカニズムは詳細には解明されていない。GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible protein 34) は DNA 傷害、小胞体ストレス、飢餓ストレスなど、様々な細胞傷害性ストレスにより誘導されることが知られており、近年、炎症の制御に関与することが示唆された。そこで、本研究では炎症および炎症に起因する炎症関連大腸癌の発生において、ストレス応答遺伝子である GADD34 の関与ならびにそのメカニズムの解明を目的とした。

【対象及び方法】

C57BL/6 をバックグラウンドとした 6-8 週齢の野生型 (WT) および GADD34 遺伝子欠損型 (KO) の雌マウスを用い、発癌剤であるアゾキシメタン (AOM) と腸炎を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与して炎症関連大腸癌モデルを作製した (Figure 1a)。このモデルを用いて、処理開始後 62 日の大腸における腫瘍の形成、および DSS 処理後早期の炎症反応について、組織学的解析、およびリアルタイム PCR やウエスタンブロットティングなどの分子生物学的・生化学的解析を行い、比較検討した。本研究は名古屋大学動物実験委員会の承認を得て行った。

【結果】

処理開始から癌がみられる 62 日後までの体重変化を解析した結果、DSS 処理後に体重の減少がみられ、特に WT マウスは、GADD34KO マウスよりも著しい体重減少を示した (Figure 1b)。処理開始後 62 日において、AOM/DSS 処理によって大腸に腫瘍の発生が確認されたが、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べて腫瘍形成と腫瘍サイズが有意に抑制されていた (Figure 1c, d)。H&E 染色した腫瘍を光学顕微鏡により観察し、low grade adenoma、high grade adenoma、adenocarcinoma に分類したところ、WT マウスでは high grade adenoma、adenocarcinoma が多かったが、GADD34KO マウスではより軽度な low grade adenoma が多いという結果になった (Figure 1e, f)。

次に、GADD34 の炎症反応における機能を解析するために、WT マウスと GADD34KO マウスに対して DSS を 5 日間飲水投与し、DSS 後の炎症について解析した (Figure 2a)。DSS 誘導性の腸炎では、DSS 処理後 10 日において GADD34 の一時的な誘導がみられ (Figure 2b)、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、組織の損傷が有意に抑制されていた (Figure 2c, d)。大腸における炎症性サイトカイン産生 (IL-6、TNF α 、IL-1 β) も GADD34KO マウスでは WT に比べて、mRNA レベル、タンパクレベルともに有意に抑制されていた (Figure 3)。

炎症性サイトカインを産生する細胞を同定するために、大腸組織の蛍光免疫染色を

行った。その結果、炎症性サイトカイン IL-6 は F4/80 陽性マクロファージマーカーを発現する細胞に発現しており、炎症性サイトカインを産生する細胞はミエロイド系細胞であることを確認した (Figure 4a)。免疫系細胞の浸潤に GADD34 が関与するかどうかを明らかにするために、DSS 後の大腸におけるケモカインとケモカイン・レセプターの発現についてリアルタイム PCR により解析したところ、DSS 処理によってケモカインおよびケモカイン・レセプターの発現が誘導されたが、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べて発現が抑制されていた (Figure 4b)。また、大腸の粘膜固有層に浸潤している細胞を EDTA 処理とコラゲナーゼ処理によって分離し、FACS により浸潤細胞の数を解析した結果、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べてマクロファージと好中球の浸潤が有意に抑制されていた (Figure 4c, d)。

炎症性サイトカイン IL-6 は IL-6/STAT3 経路を活性化して大腸癌の形成・増殖を促進することが知られている。Western blotting により大腸組織における炎症期のタンパク発現を解析したところ、IL-6/STAT3 経路は DSS 処理により活性化されたが、GADD34KO マウスでは WT マウスよりも STAT3 の活性化が有意に弱かった (Figure 5a, b)。さらに、免疫組織化学染色によって DSS 処理後の大腸組織の増殖を調べた結果、DSS 処理によって大腸上皮細胞の増殖が促進されていたが、GADD34KO マウスでは WT マウスよりも有意に増殖が抑制されることを確認した (Figure 5c, d)。

【考察】

GADD34KO マウスでは、AOM/DSS 処理による大腸癌の数や大きさが抑制されていたことから (Figure 1)、GADD34 は炎症関連大腸癌の形成・増殖を促進することが示唆された。また、DSS 誘導性の大腸炎症を解析した結果、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べて大腸の組織傷害・炎症性サイトカイン産生・細胞浸潤が抑制されており (Figure 2, 3, 4)、GADD34 は DSS 誘導性の大腸炎症を促進すると考えられた。さらに、DSS 処理後の大腸では IL-6/STAT3 の活性化と上皮細胞の増殖が誘導されるが、それらは GADD34 の欠損によって抑制されることを明らかにした (Figure 5)。以上から、DSS 処理によって GADD34 の発現が誘導され、大腸への免疫細胞の浸潤が誘導されることにより、炎症性サイトカイン産生と大腸組織の炎症が促進されると考えられた。また、IL-6/STAT3 経路が活性化し、異常化した上皮細胞の増殖が促進されることにより大腸癌の形成が促進されると推察された。

【結論】

以上の結果から、GADD34 は炎症性サイトカイン、特に IL-6 の産生を促進することにより、DSS 誘導性の潰瘍性大腸炎およびそれに起因する大腸癌の発生を促進することが示された。