

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	岩間 琢哉
学位論文題目			
Bacteria-derived ferrichrome inhibits tumor progression in sporadic colorectal neoplasms and colitis-associated cancer (細菌由来のフェリクロームは散発性大腸腫瘍および大腸炎関連癌の腫瘍進行を抑制する)			
共著者名			
藤谷 幹浩、小西 弘晃、田中 宏樹、村上 雄紀、久野木 健仁、 佐々木 貴弘、高橋 慶太郎、安藤 勝祥、上野 伸展、嘉島 伸、 盛一 健太郎、田邊 裕貴、奥村 利勝			
<i>Cancer Cell Int.</i> 2021 Jan 6;21(1):21. doi: 10.1186/s12935-020-01723-9.			
研究目的			
大腸癌の発生経路には、APCやKRAS、p53などの遺伝子変異の蓄積によるadenoma-carcinoma sequence pathwayと消化管炎症に関連するcolitis associated pathwayなどが知られている。一方で、大腸癌患者の腸内細菌叢は健常人とは異なることが報告されており、腸内細菌叢の変化が大腸癌の発生や進展に深く寄与していることが示唆されている。我々はこれまでに、 <i>Lactobacillus casei</i> (<i>L. casei</i>) がシデロフォア（細菌由来の金属キレート分子）の一種であるフェリクロームを分泌し、大腸癌細胞における細胞死誘導転写因子DDIT3の発現を増加させることで顕著な抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。本研究では、大腸癌のadenoma-carcinoma sequence pathway および colitis associated pathwayにおける <i>L. casei</i> 由来フェリクロームの抗腫瘍効果をヒト大腸腫瘍由来オルガノイドや異種移植癌モデルマウス、大腸炎関連化学発癌モデルマウスを用いて調べることを目的とした。			
材料・方法			
1. オルガノイド培養 旭川医科大学倫理委員会承認のもと大腸内視鏡下において生検組織を採取し、ヒト大腸腫瘍由来オルガノイドを構築した。Matrigel®-crypt 懸濁液を5% CO ₂ 、37度で10分間培養し固化させた後、IntestiCult™ Organoid Growth Medium、10 μMのY-27632を含有する培養液で5% CO ₂ 、37度で培養した。			
2. レサズリンアッセイ 100～500/wellのオルガノイドを96ウェルマイクロプレートに播種し、96時間培養した。オルガノイドに10mg/mlの濃度となるレサズリンを添加して6時間培養後、レサズリンを添加した培養液を96ウェルマイクロプレートに移し、OD _{590nm} を測定することで細胞数を定量化した。			

3. MTTアッセイ

レザズリンアッセイ後のオルガノイドに10 μ L/wellのMTT標準試薬を添加した培養液を加えて4時間培養後、100 μ L/wellの可溶化溶液を添加した。さらに24時間培養後に、OD_{570nm}を測定した。オルガノイドを含まないマトリゲルを生存率0%、未処理のオルガノイドを生存率100%とした。相対的なMTT吸光度減少量をレザズリン吸光度で除して、オルガノイドの生存率を補正した。

4. スルフォローダミンB (SRB) アッセイ

細胞を96ウェルマイクロプレートに1.0 \times 10⁴cells/wellで播種し、遺伝子導入を行った。細胞を4 $^{\circ}$ Cの5%トリクロロ酢酸中で固定し、蒸留水で洗浄した。マイクロプレートを室温で乾燥させ、0.057%SRB液で染色し、0.1%酢酸で洗浄したのち、室温で再び乾燥させた。染色した細胞を10mM Tris液で溶解し、OD_{510nm}を測定した。

5. Real-time PCR

ランダムプライマーを用いてRNAを逆転写し、DDIT3に対して特異的プライマーを用いてPCRを行った。18S rRNAの発現量を内部コントロールとして標準化した。

6. 異種細胞移植モデル

BALB/cヌードマウスの背面にSW620細胞あるいはHCT116細胞を2 \times 10⁶細胞/腫瘍で移植した。フェリクロームあるいは5-FUは連日腹腔内に投与した。腫瘍量は長径 \times 短径 \times 短径/2で評価した。

7. AOM/DSS化学発癌モデル

アソキシメタン (10mg/kg) をBALB/cマウスに腹腔内投与で処置した後1週間飼育し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を1週間処置し炎症関連発癌を誘発した。フェリクロームあるいは5-FUは腹腔内に投与し、腫瘍面積はImage Jを用いて計測した。

成 績

1. 大腸癌細胞におけるフェリクロームの抗腫瘍効果の評価

SRBアッセイにより大腸癌細胞株6種 (Caco2/bbe、HT29、SKCO1、HCT116、SW480、SW620) に対するフェリクロームの増殖抑制作用を確認した。また、SW620細胞およびHCT116細胞を用いた異種細胞移植モデルマウスではフェリクローム投与により腫瘍径縮小効果を認めた。さらに、MTTアッセイ/レザズリンアッセイにより患者由来の大腸腺腫および大腸癌オルガノイドにおけるフェリクロームの増殖抑制効果を確認した。また、フェリクロームは患者由来オルガノイドにおいてDDIT3誘導依存的に細胞死を誘導し、抗腫瘍効果を発揮することを示した。

2. 大腸炎関連大腸癌におけるフェリクロームの抗腫瘍効果の評価

AOM-DSS発癌モデルマウスにフェリクロームを腹腔内投与すると腫瘍面積が縮小した。また、腫瘍組織内では細胞死マーカーである断片化PARPおよび断片化Caspase-3の発現が増加していた。一方で、DSS大腸炎モデルマウスにフェリクロームを腹腔内投与しても、大腸の長さや炎症性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β mRNA発現量は変化しなかった。

3. フェリクロームと既存の抗癌剤との抗腫瘍効果の比較

SW620細胞にフェリクロームあるいは5-FUを投与してSRBアッセイを行った。フェリクロームの抗腫瘍効果は5-FUより優れていた。同様にSW620細胞移植モデルマウスでは、フェリクロームの抗腫瘍効果は5-FUよりも優れていた。続いて、SW620細胞にフェリクロームおよび5-FUを併用してSRBアッセイを行った。フェリクロームと5-FUの併用によりそれぞれの単剤投与よりも優れた抗腫瘍効果を示した。同様に、SW620細

胞移植モデルマウスでは、フェリクロームと5-FUを腹腔内投与するとそれぞれの単剤投与よりも優れた抗腫瘍効果を認めた。AOM-DSS発癌モデルマウスでは、フェリクロームと5-FUを腹腔内投与するとそれぞれの単剤投与よりも平均腫瘍面積が縮小した。

4. フェリクロームの安全性の評価

マウスの尾静脈から薬効量（5mg/kg）の60倍に相当する300mg/kgのフェリクロームを静脈注射し、下大動脈から血清を採取した。この間、死亡個体は認めず、AST、ALT、クレアチニン、血清鉄含量に変化を認めなかった。

考 案

ヒト由来オルガノイドを用いた解析から、*L. casei*由来フェリクロームはadenoma-carcinoma sequence pathway 関連大腸癌に対し抗腫瘍効果を示した。その作用メカニズムとして、細胞死誘導転写因子DDIT3の発現増強が関与していた。また、前癌病変である腺腫の段階から抗腫瘍効果があることから、フェリクロームはadenoma-carcinoma sequence pathwayにおいて癌化予防と癌治療の両方に効果が期待できる。

また、フェリクロームは炎症関連発癌モデルでも同様に抗腫瘍効果を示した。しかし、炎症自体への抑制効果は認めなかった。従って、フェリクロームは colitis associated pathwayにおいては発生した癌細胞の増殖を抑制することで抗腫瘍効果発揮することが示された。

フェリクロームは、*in vitro*および異種細胞移植モデルにおいて既存の抗癌剤よりも高い抗腫瘍効果を示したことから、既存薬耐性の大腸癌にも有効性が期待できる。また、作用機序が異なる5-FUとの併用によりフェリクロームの抗腫瘍効果が増強したことから、既存薬との組み合わせによる併用化学療法としての有用性も期待される。さらに、マウスに薬効量の60倍のフェリクローム静脈内単回投与を行っても副作用は認められなかった。以上から、フェリクロームは安全性、有効性に優れた大腸癌治療薬の候補分子である可能性が示された。

結 論

乳酸菌由来のフェリクロームは、散発性大腸癌や大腸炎関連癌に対して抗腫瘍効果を示した。フェリクロームは、DDIT3の発現誘導による細胞死の誘導というユニークなメカニズムで抗腫瘍効果を発揮しており、その抗腫瘍効果は5-FUよりも優れていた。以上の結果から、フェリクロームは、大腸癌に対する新規抗癌剤となりうることが示唆された。

引 用 文 献

1. Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. Nat Commun. 2016 Aug 10;7:12365.
2. Ijiri M, Fujiya M, Konishi H, et al. Ferrichrome identified from *Lactobacillus casei* ATCC334 induces apoptosis through its iron-binding site in gastric cancer cells. Tumour Biol. 2017 Jun;39(6):01010428317711311.