

学 位 論 文 題 名

Study of Activin A functions in Relation
to Butyrate Action in Colon Cancer Cells

(大腸ガン細胞に対する酪酸の生理作用発現における
アクチビン A の役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

アクチビン A は TGF- β スーパーファミリーに属するペプチド性増殖因子であり、広範な組織分布を示すとともに、細胞増殖抑制、細胞分化誘導、アポトーシス誘発などの多彩な生理作用を有している。アクチビン A の発現と機能についてはこれまでに様々な組織において研究されてきているものの、腸においてはほとんど明らかにされていなかった。しかしながら最近の我々の研究により、アクチビン A が腸上皮細胞の増殖停止ならびに分化成熟の開始あるいは維持に関与する可能性が示唆された。腸上皮細胞の増殖・分化・細胞死は複雑な機構により厳密に統御されており、大腸ガンの病態はその統御の破綻を示している。そこで本研究では、大腸ガンとアクチビン A とのかかわりについて検討を加えた。

最近、ヒトの大腸ガン組織において、アクチビン A の発現が著しく増加していることが報告され、アクチビン A が大腸ガンのプロモーターとなる可能性が示唆された。一方、大腸ガンの発生・進展には食事因子が関与すると考えられており、とりわけ食物繊維は抑制的に働くと考えられている。食物繊維の主要な腸内発酵産物のひとつである酪酸は、大腸ガン細胞株の増殖を抑制して分化及びアポトーシスを誘導することから、食物繊維の大腸ガン抑制作用を説明するもののひとつと考えられてきた。そこで本研究では、大腸ガンのプロモーターとなりうるアクチビン A の発現を酪酸が抑制することによって大腸ガン抑制に貢献しているという仮説を立て、検討を加えた。その概要を示すと、以下の通りである。

(1) ヒト結腸ガン細胞株 HT-29 を酪酸添加培地で培養したときのアクチビン A (β A サブユニット) mRNA の発現レベルを半定量的 RT-PCR により解析した結果、前述の仮説に反して酪酸は濃度及び時間依存的にアクチビン A mRNA レベルを増加させることが明らかとなった。酪酸は腸上皮細胞の分化を促進させることが知られており、また我々の以前の研究によってアクチビン A の発現は腸上皮細胞の分化にともなって増加することが明らかになっているので、酪酸によるアクチビン A 遺伝子の発現増加は細胞分化を反映

している可能性が考えられた。そこで、自発的に小腸吸収上皮細胞様に分化することが知られているヒト結腸ガン細胞株 Caco-2 を用いてそのことを検討した結果、未分化細胞のみならず既に分化した細胞においても酪酸はアクチビン A mRNA レベルを増加させることが示された。つまり、酪酸によるアクチビン A 遺伝子発現の亢進は細胞分化とは関係しないことが示唆された。

(2) 酪酸はヒストンの脱アセチル化の阻害を介して特定の遺伝子の発現に影響を及ぼすことが知られている。そこで、ヒストン脱アセチル化酵素の特異的阻害剤であるトリコスタチン A がアクチビン A 遺伝子の発現に及ぼす影響を調べたところ、時間依存的にアクチビン A mRNA レベルを増加させた。したがって、酪酸によるアクチビン A 遺伝子の発現増加の機構として、ヒストン脱アセチル化の阻害が関係していることが示唆された。

(3) 正常細胞におけるアクチビン A 遺伝子に対する酪酸の影響について解析した。ヒト胎児由来正常結腸上皮細胞株 FHC、ラット正常腸上皮細胞株 IEC-6、及びラット結腸組織培養において、酪酸はアクチビン A mRNA レベルを変化させなかった。つまり、酪酸によるアクチビン A 遺伝子の発現増加はガン細胞に特異的なものであることが示唆された。

(4) ヒト結腸ガン細胞株 HT-29 の細胞周期に酪酸が及ぼす影響をフローサイトメーターにより解析した結果、酪酸は細胞周期を G1 期で停止させ、また濃度依存的にアポトーシスを誘導した。このとき、ゲノム DNA がクロマチン単位に分断されていることがアガロースゲル電気泳動により示され、このこともアポトーシスを示唆した。細胞周期の停止ならびにアポトーシスは、サイクリン依存性キナーゼインヒビター、p21^{WAF1/Cip1} mRNA の増加ならびにアポトーシス抑制タンパク Bcl-XL mRNA の減少と関連していた。ラット正常腸上皮細胞株 IEC-6 の細胞増殖が外因性に添加したアクチビン A により抑制されることを以前に観察しているので、酪酸による細胞周期の停止やアポトーシスの誘導をアクチビン A が仲介する可能性を予測したが、外因性に添加したアクチビン A は HT-29 細胞の細胞周期の停止やアポトーシスを誘導しなかった。すなわち、結腸ガン細胞において酪酸によりアクチビン A の発現が増加するが、それは自己分泌性に作用するものではないことが示唆された。

(5) HT-29 細胞におけるアクチビン A に対する不応答性について、細胞内情報伝達経路に着目して解析した。TGF- β /アクチビン A は細胞膜上に存在する膜貫通型受容体に結合すると、その細胞質領域に存在するセリン/スレオニンキナーゼを活性化し、その結果、細胞内情報伝達タンパクである Smad2/Smad3 がリン酸化され、更に Smad4 と複合体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を活性化する。そこでアクチビン A により刺激した HT-29 細胞のライセートを抗 Smad2 抗体により免疫沈降し、それを抗リン酸化 Smad2 抗体を用いたウェスタン解析に供した。その結果、アクチビン A 刺激により Smad2 タンパクの一過性のリン酸化が観察されたが、抗 Smad4 抗体を用いた解析では、

アクチビン A 刺激により Smad2/Smad4 複合体の形成が観察されなかった。更に、ウェスタン分析ならびに RT-PCR により HT-29 細胞において Smad4 タンパクならびに mRNA が発現していないことが明らかとなった。以上の結果より、HT-29 細胞におけるアクチビン A に対する不応答性は、細胞内情報伝達に関わるタンパクである Smad4 が欠損していることによるものであることが示唆された。

以上の結果より、ヒト結腸ガン細胞株 HT-29 は、アクチビン A の細胞内情報伝達に関わる Smad4 の発現を欠いているために、アクチビン A に応答して細胞増殖が抑制されたり細胞分化が促進されたりすることはなく、すなわちアクチビン A は自己分泌性に作用せず、おそらくガン細胞周囲の細胞に傍分泌性に作用して腫瘍の血管新生の促進や腫瘍免疫の抑制を介してガンの進展に寄与することが示唆された。当初、食物繊維の腸内発酵産物である酪酸がガン細胞におけるアクチビン A の発現を減少させることによりガンの進展を抑制するという仮説を立てたが、本研究の結果はむしろ酪酸が結腸ガン細胞におけるアクチビン A の発現を増加させることを明確に示しており、このことは一定の条件下においては酪酸ひいては食物繊維は大腸ガンの進展に寄与する因子として作用する可能性もあることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 園 山 慶

副 査 教 授 川 端 潤

副 査 教 授 原 博

学 位 論 文 題 名

Study of Activin A functions in Relation to Butyrate Action in Colon Cancer Cells

(大腸ガン細胞に対する酪酸の生理作用発現における
アクチビンAの役割に関する研究)

本論文は総頁数 84 の英文論文で、図 16、表 4、引用文献 74 を含み、5 章で構成されている。別に参考論文 2 編が添えられている。

アクチビン A は TGF- β スーパーファミリーに属するペプチド性増殖因子であり、広範な組織分布を示すとともに、多彩な生理機能を有している。最近、ヒトの大腸ガン組織においてアクチビン A の発現が著しく増加していることが報告され、アクチビン A が大腸ガンのプロモーターとなる可能性が示唆された。大腸ガンの発生・進展には食事因子が関与すると考えられており、とりわけ食物繊維は抑制的に働くと考えられている。食物繊維の主要な腸内発酵産物のひとつである酪酸は、大腸ガン細胞株の増殖を抑制して分化及びアポトーシスを誘導することから、食物繊維の大腸ガン抑制作用を説明するもののひとつと考えられてきた。筆者は、酪酸は大腸ガンのプロモーターとなりうるアクチビン A の発現を抑制することによって大腸ガン抑制に貢献しているという仮説を立て、主として培養細胞を用いて実験的検討をしている。本研究は、酪酸はヒト結腸ガン細胞株 HT-29 および Caco-2 におけるアクチビン A の発現をむしろ増加させることを明確に示し、一定の条件下においては酪酸ひいては食物繊維は大腸ガンの進展に寄与する因子として作用する可能性もあると指摘している。また、アクチビン A の細胞内情報伝達に関しても解析し、結腸ガン細胞がアクチビン A に対して不応答である機構を明らかにしている。第一章では本研究の歴史的背景、現時点での研究意義、問題点、目的等について論じている。第二章から第四章までは筆者自身による培養細胞を用いた実験に基づく研究内容が記載され、本論文の中心をなすものである。第五章では、本研究を要約している。

主な内容は以下の如く要約される。

(1) ヒト結腸ガン細胞株 HT-29 を酪酸添加培地で培養したときのアクチビン A mRNA レベルを半定量的 RT-PCR により解析し、酪酸が濃度及び時間依存的にアクチビン A mRNA レベルを増加させることを明らかにした。酪酸は腸上皮細胞の分化を促進させることが知られており、酪酸によるアクチビン A 遺伝子の発現増加は細胞分化を反映している可能性が考えられたので、腸上皮細胞の分化モデルとして Caco-2 細胞を用いてそのことを検討し、酪酸によるアクチビン A 遺伝子発現の亢進は細胞分化とは関係しないことを示唆した。

(2) 酪酸はヒストンの脱アセチル化の阻害を介して特定の遺伝子の発現に影響を及ぼすことが知られている。本研究は、ヒストン脱アセチル化酵素の特異的阻害剤であるトリコスタチン A もアクチビン A mRNA レベルを増加させることを明らかにした。したがって、酪酸によるアクチビン A 遺伝子の発現増加の機構として、ヒストン脱アセチル化の阻害が関係していることが示唆された。

(3) ヒト胎児由来正常結腸上皮細胞株 FHC、ラット正常腸上皮細胞株 IEC-6、及びラット結腸組織培養において、アクチビン A mRNA レベルは酪酸によって変化しないことが示され、酪酸によるアクチビン A 遺伝子の発現増加はガン細胞に特異的なものであることが示唆された。

(4) HT-29 細胞の細胞周期に酪酸が及ぼす影響をフローサイトメーターにより解析し、酪酸が G1 期停止およびアポトーシスを誘導することを示した。一方、外因性に添加したアクチビン A は HT-29 細胞の細胞周期の停止やアポトーシスを誘導しなかった。すなわち、結腸ガン細胞において酪酸によりアクチビン A の発現が増加するが、それは自己分泌性に作用するものではないことが示唆された。

(5) HT-29 細胞におけるアクチビン A に対する不応答性について、細胞内情報伝達経路に着目して免疫沈降ならびにウェスタンブロッティングにより解析し、アクチビン A の細胞内情報伝達を担うタンパクである Smad4 の欠損がアクチビン A に対する不応答性に関与することを明らかにした。

以上のように、本研究は、食物繊維の腸内発酵産物である酪酸が結腸ガン細胞におけるアクチビン A の発現を増加させることを明らかにし、このことから、一定の条件下においては酪酸ひいては食物繊維がアクチビン A を介して結腸ガンの進展に寄与する因子として作用する可能性もあると指摘している。また結腸ガン細胞におけるアクチビン A に対する不応答の機構について、細胞内情報伝達に着目して解明するなど、結腸ガン細胞におけるアクチビン A の発現様式ならびに酪酸の生理機能との関わりにおいて新しい知見を加えた点で、国内外で高い評価を得ている。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 ピ
マラ・ポヌクルキットは博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定し
た。