

報告

卵巣摘出マウス大腸における 細胞増殖・細胞死関連蛋白の発現

新谷 路子¹⁾ 今西 麻樹子¹⁾ 吉川 豊²⁾ 鴨志田 伸吾³⁾

Expression of proteins related to cell death and proliferation in the colorectal mucosa of ovariectomized mice

Michiko SHINTANI¹⁾, Akiko IMANISHI¹⁾, Yutaka YOSHIKAWA²⁾,
and Shingo KAMOSHIDA³⁾

要旨

卵巣摘出マウスの大腸粘膜における細胞増殖および細胞死関連タンパクの発現を解析し、エストロゲンの大腸粘膜への作用について検討した。3群（OVX：卵巣摘出、OVX + Mg：卵巣摘出+マグネシウム投与、コントロール：偽手術）のマウス結腸・直腸切片を対象とし、caspase 3、beclin 1、cyclin D1、Ki-67の各抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。OVXとコントロールを比較すると、beclin 1、cyclin D1、Ki-67の発現に有意差は認められなかったが、caspase 3の発現はOVXで有意に高くなった。OVX + Mgとコントロールを比較すると、caspase 3の発現はOVX + Mgで有意に高く、beclin 1はOVX + Mgで有意に低かった。以上から、卵巣摘出マウス大腸ではアポトーシスが促進し、さらにMg投与はアポトーシスを促進させオートファジーを抑制する可能性が示唆された。

キーワード：大腸粘膜、細胞増殖、アポトーシス、エストロゲン

Abstract

Although the inhibitory or proliferative role of estrogen in the colorectal mucosa has been previously studied, the results remain controversial. To help resolve these controversies, we assessed cell death and proliferation in the colorectal mucosa of ovariectomized mice to determine the effects of estrogen. In addition, the effect of magnesium (Mg) administration was evaluated, as Mg is associated with osteoporosis prevention and alleviation of colorectal cancer risks. Proteins expression was analyzed in three groups of mouse colorectal tissue sections (OVX: ovariectomized,

1) 保健科学部医療検査学科 2) 神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科 3) 神戸大学大学院保健学研究科

OVX + Mg: ovariectomized + Mg administration, control: sham operation) by immunostaining using antibodies specific for caspase 3, beclin 1, cyclin D1, and Ki-67. Caspase 3 expression was significantly higher in the OVX group than in control mice. No significant differences in beclin 1, cyclin D1, and Ki-67 expression were observed between OVX and control mice. Comparing the OVX + Mg colorectal tissue sections with the controls, caspase 3 expression was significantly higher in the OVX + Mg group, whereas beclin 1 were significantly lower in the OVX + Mg group. These results suggest that apoptosis could be accelerated in the colorectum of ovariectomized mice. Furthermore, Mg administration might promote apoptosis and inhibit autophagy.

Key words: colorectal mucosa, cell proliferation, apoptosis, estrogen

はじめに

近年、大腸癌による死亡者数が男女ともに増加し、女性の臓器別癌死亡者数では第1位が続いている。女性は閉経後に大腸癌が増加することから、エストロゲンと大腸癌との関係について多くの研究が行われているが、エストロゲンが大腸粘膜に対して、増殖促進に働くか、抑制的に働くかについて一致した見解は得られていない¹⁻⁸⁾。エストロゲンレセプター (ER) β が第2のERとして同定され、種々の組織に対するエストロゲンの影響が検討されており、大腸粘膜もその一つで、ER- β により制御されることが報告されている¹⁾。大腸粘膜の発癌および進展におけるER- β の役割は不明で、正常組織から進行癌へと進むにつれER- β の発現が低下するといわれている一方で、大腸癌組織では非癌部と比較するとエストロゲン活性が高レベルに認められるという報告もある³⁾。

大腸粘膜上皮は、陰窩の底部に存在する腸管上皮幹細胞の増殖により数日ごとに細胞回転 (ターンオーバー) を繰り返し新しくなっており、消化管の機能的恒常性を保っている⁹⁾。腸粘膜にとって恒常性を保つために大きな役割を果たしているのが細胞死であるが、アポトーシス以外の細胞死については報告が少ない。

本研究は、大腸粘膜の増殖に関わるエストロゲン

に着目し、卵巣摘出 (閉経後骨粗鬆症モデル) マウスを用いて、低エストロゲン状態における大腸粘膜の細胞死と細胞増殖について解析を行った。また、マグネシウム (Mg) は、骨粗鬆症の予防効果や大腸癌リスクとの関連が報告されていることから、Mg投与による大腸粘膜への影響も検討した¹⁰⁻¹⁴⁾。

材料と方法

使用動物および実験材料

実験には日本エスエルシー株式会社より購入した10週齢のICR雌性マウスを用いた。イソフルラン (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本) 麻酔下で卵巣摘出手術 (OVX) および卵巣を摘出しない偽手術 (Sham) を行った。マウスには飼料として低カルシウム食 (AIN-93M (低カルシウム飼料); 日本クレア社、東京、日本) を与えた (表1)。飲料水として、Sham (n=4) およびOVX (n=5) には純水を与え、マグネシウム投与群 (OVXマウスにマグネシウムを投与: OVX+Mg) (n=5) には、純水に硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、フジフィルム和光純薬株式会社) を25 mg metal/kg BW となるように混入したものを与えた。飼料と飲料水は自由摂取下で120日間飼育した。これらマウスは、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度40~60%に保たれた環境下で飼育を行った。その後、摘出し

表 1 低カルシウム飼料

コーンスターチ (%)	52.0692
グラニュー糖 (%)	20
ミルクカゼイン (%)	14
セルロース (%)	5
大豆油 (%)	4
ミネラルミックス (AIN-93M Ca 抜 ; %)	3.5
ビタミンミックス (AIN-93VX)	1
重酒石酸コリン	0.25
L-シスチン	0.18
tert-ブチルヒドロキノン	0.0008

た大腸はホルマリン固定・パラフィン包埋を行い 3 μm の薄切切片を作製した。すべての動物実験は、神戸女子大学動物倫理委員会の承認 (A133、A157) を得て、神戸女子大学大学院健康栄養学研究科吉川研究室において実施した。

免疫組織化学染色

アポトーシスの検出に caspase 3 (ASP175、ウサギポリクローナル抗体、Cell Signaling Technology、MA、USA)、オートファジーの検出に beclin 1 (ウサギポリクローナル抗体、Proteintech、IL、USA)、細胞周期制御 (進行) タンパクと

して cyclin D1 (SP4、ウサギモノクローナル抗体、Abcam、Cambridge、UK)、細胞増殖能の指標として Ki-67 (ウサギポリクローナル抗体、Proteintech、IL、USA) の各一次抗体を用いて免疫組織化学染色を行った (表 2)。反応は、ペルオキシダーゼ標識ポリマー法を用いて以下の通り行った。

切片を脱パラフィンし、流水水洗後、抗原性賦活処理のため、圧力鍋 (ティファール、クリプソアーチ、グループセブジャパン、東京、日本) を用いて、121℃で8分間加熱した。加熱溶液として caspase 3 および beclin 1 には 1 mM EDTA 溶液

表 2 一次抗体と染色条件

抗体	製造元	抗原性賦活液	希釈倍率
caspase 3 ASP175	Cell Signaling Technology	1 mM EDTA 溶液 (pH8.0)	1 : 200
beclin 1	Proteintech	1 mM EDTA 溶液 (pH8.0)	1 : 1000
cyclin D1 SP4	Abcam	Tris-EDTA 緩衝液 (pH9.0)	1 : 200
Ki-67	Proteintech	Tris-EDTA 緩衝液 (pH9.0)	1 : 10000

表3 免疫組織化学染色法

1.	パラフィンブロックを薄切し、剥離防止処理を行ったスライドガラスに貼り付ける。	
2.	薄切切片を十分に乾燥させる。	
3.	脱パラフィン	
4.	内因性ペルオキシダーゼのブロッキング：3% 過酸化水素水	室温30分
5.	流水水洗	5分
6.	抗原性賦活化：最適加熱溶液中で圧力鍋中にて加熱	8分
7.	圧力鍋から容器ごと取り出し、室温30分放置（自然冷却）	
8.	流水水洗	5分
	注意 切片および加熱溶液の入った加熱容器に、直接少量の水道水を入れ、オーバーフローさせながら、徐々に加熱溶液と水道水を入れ替える。その後、容器の水を捨て、完全に水道水と置き換える。	
9.	PBS洗浄	5分 2回
10.	一次抗体反応（湿潤箱中）	室温一晩
11.	PBS洗浄	5分 3回
12.	ペルオキシダーゼ・二次抗体結合ポリマー試薬の反応（湿潤箱中）	室温60分
13.	PBS洗浄	5分 3回
14.	ジアミノベンチジン（DAB）溶液で発色	鏡検しながら2～5分
15.	流水水洗	5分
16.	ヘマトキシリンで軽く核染	
17.	脱水、透徹、封入	

(pH8.0)、Ki-67 および cyclin D1 には Tris-EDTA 緩衝液 (pH9.0) を用いた。自然冷却後、流水水洗し、10 mM リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffer saline, PBS、pH7.2) で2回洗浄を行った。次に、一次抗体を湿潤箱内にて室温で一晩反応させた。PBS 洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬 (シンプルステイン MAX-PO、ニチレイバイオサイエンス社、東京、日本) を室温で60分間反応させた。PBS 洗浄後、diaminobenzidine 基質キット (DAB+、DAKO、アジレントテクノロジー社、東京、日本) で発色させ、ヘマトキシリンで核染色後、脱水・透徹・封入を行った (表3)。

陽性細胞計測方法

計測は各群でマウスごとに行い、あらかじめ粘膜上皮を観察し、偏りがないように計測部位を決定した。陽性細胞の分布状況、個数により細胞計測を以下の通り行った。

caspase 3：顕微鏡下 (400倍・HPF) で40視野を観察し、1視野当たりの陽性細胞数を算出した。

beclin 1：大腸粘膜の粘膜筋板の長さが1mmにあたる粘膜上皮の範囲 (基準範囲) を観察し、基準範囲内の全細胞数と陽性細胞数をカウントし、陽性細胞の割合 (%) を算出した。

cyclin D1 および Ki-67：顕微鏡下 (400倍) で40視野を観察し、1視野当たりの陽性細胞の割合 (%) を算出した。

統計学的解析法

陽性細胞数または割合は、平均値±標準誤差で表した。

統計的解析にはエクセル統計 (Statcel 3、東京、日本) を用いて、ウェルチ *t* 検定を行った。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

caspase 3

caspase 3 の陽性像は、細胞の核と細胞質に見られた (図 1a)。コントロールマウスにおける caspase 3 陽性細胞数は 1 視野あたり 0.25 ~ 0.83 個 (0.49 ± 0.07) であった。OVX では 0.13 ~ 2.03 個 (1.17 ± 0.17)、OVX+Mg では 1.63 ~ 2.00 個 (1.84 ± 0.08) であった。コントロールと比較すると、caspase 3 の発現は OVX で有意に高く ($P < 0.05$)、OVX + Mg においても有意に高くなった ($P < 0.001$) (図 2a)。

beclin 1

beclin 1 の陽性所見は細胞質に見られた (図 1b)。コントロールマウスにおける beclin 1 陽性率は 8.7 ~ 36.7% (16.4 ± 3.13)、OVX では 3.7 ~ 36.3% (13.8 ± 3.06)、OVX + Mg では 1.1 ~ 24.0% (7.0 ± 2.12) であった。beclin 1 の発現は、コントロールと比較すると OVX では有意差はなく ($P=0.559$)、OVX + Mg では有意に低かった ($P=0.027$) (図 2b)。

cyclin D1

cyclin D1 の陽性像は核に見られた (図 1c)。コントロールマウスにおける cyclin D1 陽性細胞率は 35 ~ 50% (42.5 ± 1.89) であった。OVX では 40 ~ 60% (48.0 ± 2.81)、OVX + Mg では 35 ~ 50% (41.0 ± 1.25) であった。cyclin D1 の発現には有意差は認められなかった (図 2c)。

Ki-67

Ki-67 の陽性像は核に見られた (図 1d)。コントロールマウスにおける Ki-67 陽性細胞率は 28 ~ 58% (42.3 ± 2.32) であった。OVX では 29 ~ 66% (45.7 ± 2.50)、OVX + Mg では 18 ~ 75% (47.9 ± 3.22) であった。Ki-67 の発現には有意差は認められなかった (図 2d)。

考察

本研究は、低エストロゲン状態における大腸上皮細胞の細胞増殖および細胞死の状態を解析す

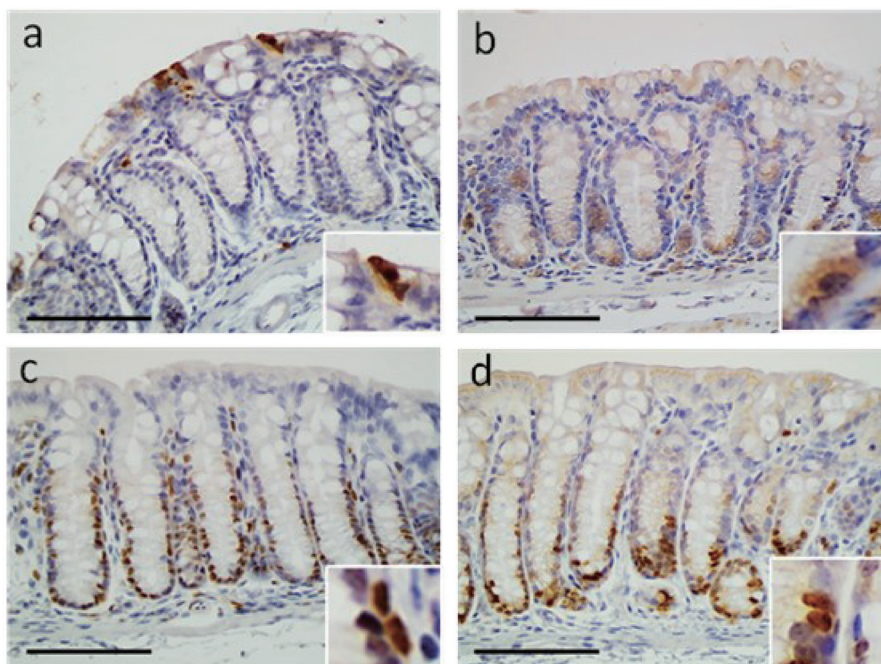


図 1 代表的な染色像

caspase 3 の陽性像は核と細胞質に見られた (a)。beclin 1 (b) は細胞質に陽性を示した。cyclin D1 (c) および Ki-67 (d) 陽性像は核に見られた。a は OVX+Mg、b,c,d はコントロールマウス。Scar bar : 100 μ m。

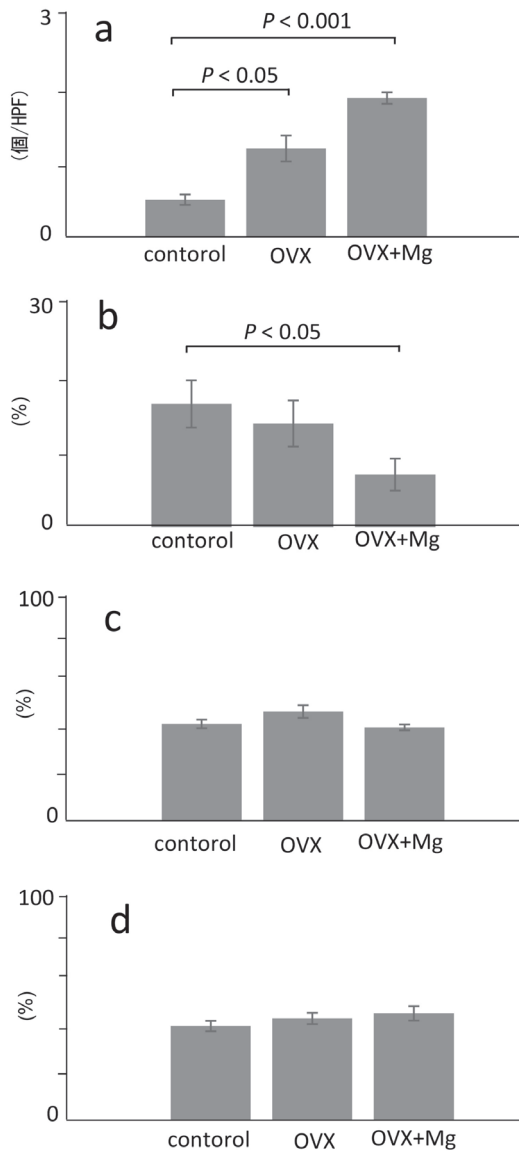


図2 コントロールマウス、OVX、OVX-Mgにおける各タンパクの発現

caspase 3の発現は、コントロールと比較するとOVXで有意に高く ($P < 0.05$)、OVX + Mgにおいても有意に高くなった ($P < 0.001$) (a)。beclin 1の発現は、コントロールと比較するとOVXでは有意差はなく ($P=0.559$)、OVX + Mgでは有意に低かった ($P < 0.05$) (b)。cyclin D1 (c) および Ki-67 (d) の発現には有意差は認められなかった。

ることを目的とし、アポトーシス実行因子である caspase 3、オートファジーマーカーである beclin 1、細胞周期促進タンパクとして cyclin D1、細胞増殖能の指標として Ki-67 に対する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。

大腸粘膜は、陰窩の最底部にある幹細胞の増殖と表層に向かって分化した細胞の死により上皮は

絶えず置き換わっており、この細胞死は主にアポトーシスであると考えられている。また、一般的にアポトーシスがうまく機能しないときにオートファジーやネクロトーシスによる細胞死が代償的に働くと報告されている^{15,16)}。本研究結果から、卵巣摘出マウス (OVX、低エストロゲン状態) では、コントロールマウスと比較し、アポトーシス実行因子である caspase 3 の発現が有意に高く、アポトーシスが促進していることが示唆された。オートファジーマーカーである beclin 1 の発現には有意差は認められず、亢進は見られなかった。さらに、細胞増殖を促進する cyclin D1 と細胞増殖の指標である Ki-67 の発現についても、どちらも有意差は認められなかった。

これまでのところ、低エストロゲン状態ではアポトーシスが抑制され、細胞増殖が促進するという報告が多いが^{1,4,8)}、本研究では、低エストロゲン状態下でアポトーシスの亢進がみられ、細胞増殖傾向は示さなかった。エストロゲンが大腸粘膜に対して細胞増殖に働くか、または増殖抑制に作用するかは重要な問題であるが、答えが一致しない理由として、腸粘膜には個々の複雑な背景 (性別、年齢、栄養状態、腸内細菌叢の状態、粘液分泌、免疫機能、遺伝子修復機能など) が影響し、実験材料の違いによる結果の相違があげられており、特に大腸の部位による違いや年齢の影響の重要性が指摘されている^{5,6)}。本研究は、卵巣摘出マウスを対象とし、コントロールマウスとの比較による検討を行ったが、今後はさらに細胞老化関連因子やムチンマーカー、遺伝子修復蛋白の発現など、個体年齢や部位による差異を考慮した検討が必要と考える。

次に、マグネシウム投与による大腸上皮細胞への影響を検討したところ、アポトーシスは促進したが、オートファジーは低下を示した。マグネシウムは細胞増殖、細胞分化、血管新生、アポトーシスなどの幅広い生化学反応に関与すると報告されており、その働きは複雑で多岐にわたっている^{10,13)}。大腸癌

との関連性について研究されており、女性では血清マグネシウム濃度が低いほど大腸癌のリスクが高いことが報告され、マグネシウム摂取が大腸がん予防に効果的であると考えられている¹²⁾。また、マグネシウムのレベルと大腸癌リスクに関連性はないとする報告もある¹⁴⁾。本研究では、低エストロゲン状態においてマグネシウムを投与したところアポトーシスは促進し、オートファジーは抑制された。マグネシウムの適切な投与は、細胞死誘導の制御に応用できる可能性があると考ええる。

今後は、Estrogen Receptor- β の発現や、他の細胞増殖因子（サイクリンA、サイクリンB）、細胞周期抑制因子であるp16、p21の発現についても検討が必要と考える¹⁷⁾。さらに、大腸粘膜に作用する他の細胞死として、ネクロプトーシスや炎症性細胞死であるパイロトーシス、また新規細胞死であるエレボーシスについても解析していく¹⁸⁻¹⁹⁾。

謝辞

本研究は、2018、2019年度神戸常盤大学テーマ研究費の助成を受けて実施しました。

本研究の進行を支えてくれた新谷ゼミ卒業生諸氏に深謝いたします。

文献

- 1) Topi, G.; Ehrnström, R.; Jirström, K. et al. Association of the oestrogen receptor beta with hormone status and prognosis in a cohort of female patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2017, vol.83, p.279-289.
- 2) López-Calderero, I.; Carnero, A.; Astudillo, A. et al. Prognostic relevance of estrogen receptor- α Ser167 phosphorylation in stage II-III colon cancer patients. 2014, *Hum pathol*. vol.45, no.12, p.2437-46.
- 3) Zervoudakis, A.; Strickler, H.D.; Park, Y. et al. Reproductive history and risk of colorectal cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2011, vol.103, no.10, p.826-34.
- 4) Kennelly R.; Kavanagh OD.; Hogan A.M. et al. Oestrogen and the colon: potential mechanisms for cancer prevention. *Lancet Oncol*. 2008, vol.9, p.385-391.
- 5) Honma N.; Arai, T.; Matsuda, Y. et al. Estrogen concentration and estrogen receptor- β expression in postmenopausal colon cancer considering patient/tumor background. 2022, *J Cancer Res Clin Oncol* vol.148, no.5, p.1063-1071.
- 6) 本間尚子. 大腸癌発生・進展への女性ホルモンの関与 *Nippon Rinsho* 2014, vol.72, no.1, p.49-55.
- 7) Hartman, J.; Gustafsson, J.A. Estrogen receptors in colorectal cancer: goalkeepers, strikers, or bystanders? *Cancer Prev Res (Phila)* 2010, vol.3, p.897-899.
- 8) Osamu Wada-Hiraike. Role of estrogen receptor β in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, vol.103, p.2959-2964.
- 9) 油井史郎, 中村哲也, 渡辺守. 腸管上皮幹細胞と大腸癌幹細胞 *医学のあゆみ*. 2009, vol.230, no.10, p.855-860.
- 10) Pilchova, I.; Klacanova, K.; Tatarkova, Z. et al. The Involvement of Mg²⁺ in Regulation of Cellular and Mitochondrial Functions. *Oxid Med Cell Longev*. 2017, 6797460.
- 11) Cappadone, C.; Merolle, L.; Marraccini C. et al. Intracellular magnesium content decreases during mitochondria-mediated apoptosis induced by a new indole-derivative in human colon cancer cell. *Magnes Res*. 2012, vol.25, no.3, p.104-11
- 12) Polter, E. J.; Onyeaghala, G.; Lutsey P. L. et al. Prospective Association of Serum and Dietary

- Magnesium with Colorectal Cancer Incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019. Vol.28, no.8 p.1292-1299.
- 13) Wolf, F. I. ; Maier, J. A. M.; Nasulewicz, C. et al. Magnesium and neoplasia: from carcinogenesis to tumor growth and progression or treatment. *Arch Biochem Biophys* . 2007. Vol.458, no.1 p.24-32.
- 14) Ma, E.; Sasazuki, S.; Inoue, M. et al. High dietary intake of magnesium may decrease risk of colorectal cancer in Japanese men. *J Nutr*. 2010, vol.140, no.4, p.779-85.
- 15) Eisenberg-Lerner, A.; Bialik, S.; Simon, H-U. et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009, vol.16, no.7, p.966-75.
- 16) Nikoletopoulou, V.; Markaki, M.; Palikaras, K. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013, vol.1833, no.12, p.3448-3459.
- 17) Al-Ahwal, M.; Gomaa, W.; Emam, E. et al. p16 protein is upregulated in a stepwise fashion in colorectal adenoma and colorectal carcinoma. *Saudi J Gastroenterol*. 2016, vol.22, no.6 p.435-440.
- 18) Tsuchiya, K.; Nakajima, S.; Hosojima, S. et al. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nat Commun*. 2019, vol.10, no.1, p.2091.
- 19) Bergmann, A. Erebosis is a new type of cell death for tissue homeostasis in the *Drosophila* intestine. *PLoS Biol*. 2022, Vol.20, no.4, e3001614.