

Trefoil Factor (TFF)2 遺伝子の発現と機能解析に
関する研究

2024

長崎国際大学大学院薬学研究科

医療薬学専攻

増本 唯

Research on the expression and functional analysis of *Trefoil Factor (TFF) 2*

Yui Masumoto

目次

緒言.....	1
第1章 培養条件の違いが <i>TFF</i> の発現に与える影響.....	7
1. 実験材料及び実験方法.....	8
1-1. 細胞及びトランスフェクション.....	8
1-2. 高温培養条件.....	9
1-3. 酸性培養条件.....	10
1-4. pH 6.5 での細胞数の測定.....	11
1-5. RNA 抽出.....	12
1-6. 定量的リアルタイム RT-PCR (Quantitative real-time reverse transcription- polymerase chain reaction) による解析.....	12
1-7. マウス.....	13
1-8. ウェスタンブロッティング.....	14
1-9. 免疫組織化学染色.....	15
1-10. 統計処理.....	16
2. 実験結果.....	16
2-1. 温度変化が <i>TFF</i> 遺伝子発現に与える影響.....	16
2-2. pH 6.5 における細胞生存率評価.....	17

2-3. 酸性 pH が <i>TFF</i> 遺伝子発現に与える影響.....	20
2-4. 酸性添加剤の違いによる <i>TFF</i> 遺伝子発現への影響.....	23
2-5. 酸性 pH が DLD-1 細胞以外の細胞株において <i>TFF2</i> 遺伝子発現に与える影響	25
2-6. 酸性 pH が <i>TFF2</i> タンパク質発現に与える影響.....	27
3. 考察	31
4. 小括	33
第 2 章 酸性培地および、 <i>TFF2</i> を含む条件培地が DLD-1 細胞の mRNA の発現に与え る影響.....	34
1. 実験材料及び実験方法	35
1-1. 細胞及び継代.....	35
1-2. マイクロアレイに用いた試料	35
1-3. RNA 抽出.....	37
1-4. ウェスタンブロッティングによる検出	38
1-5. マイクロアレイ解析.....	39
1-6. データ解析とフィルター基準	39
1-7. Gene Ontology (GO) 分析及びパスウェイ解析	40
2. 実験結果	40
2.1. 酸性条件下における DLD-1 細胞の発現遺伝子の GO 解析	40

2.2. 酸性条件下での DLD-1 細胞の発現遺伝子のパスウェイ解析	44
2.3. TFF2 を含む条件培地下における DLD-1 細胞の発現遺伝子の GO 解析	44
2.4. TFF2 を含む条件培地下における DLD-1 細胞の発現遺伝子パスウェイ解析.	48
3. 考察	50
4. 小括	53
第 3 章 TFF2 siRNA がフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子群に与える影響.....	54
1. 実験材料及び実験方法	55
1-1. 細胞及び継代.....	55
1-2. RNA 抽出.....	55
1-3. ウェスタンブロッティング	55
1-4. TFF2 siRNA の配列及び KATOIII細胞へのトランスフェクション	56
1-5. 定量的リアルタイム RT-PCR による TFF2 遺伝子のノックダウン効率の測定	57
1-6. 統計解析	58
2. 実験結果	58
2.1. KATOIII細胞における TFF2 siRNA の発現抑制効果	58
2.2. TFF2 siRNA がフィブロネクチンIIIドメインファミリーの FNDC3B 遺伝子 及び FNDC5 遺伝子の mRNA とタンパク質に与える影響	60

3. 考察	63
4. 小括	65
第4章 TFF2 を含む条件培地が細胞内代謝経路へ与える影響	66
1. 実験材料及び実験方法	67
1-1. 試料	67
1-2. 細胞及び継代.....	68
1-3. メタボローム解析のためのサンプル調製【細胞】	68
1-4. メタボローム解析のためのサンプル調製【培養上清】	69
1-5. 代謝産物の抽出と誘導体化.....	70
1-6. メタボローム分析	71
1-7. 多変量解析	72
1-8. Pathway 解析.....	72
2. 結果	73
2-1. TFF2 を含む条件培地が DLD-1 細胞の代謝経路に与える影響	73
2-2. TFF2 を含む条件培地による DLD-1 細胞内の代謝経路の変化	76
2-3. TFF2 を含む条件培地中の代謝産物の変化.....	80
3. 考察	84

4. 小括	88
総括.....	89
謝辞.....	93
参考文献	94

略語集

本論文では、以下の略語を用いた。

BP	biological process
CC	cellular component
DAVID	Database for annotation, Visualization and Integrated Discovery
FBS	fetal bovine serum
FNDC3B	fibronectin type III domain containing 3B
FNDC5	fibronectin type III domain containing 5
GABA	4-aminobutanoic acid
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	Gene Ontology
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMDB	Human Metabolome Database
HSP90 α	heat shock protein 90 α
LOH	loss of heterozygosity
MetPA	metabolic pathway analysis
MF	molecular function
MSEA	metabolite set enrichment analysis
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4
RT-PCR	reverse-transcription polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
TFF	Trefoil Factor Family
TME	Tumor microenvironment

緒言

2020年の「厚生労働省人口動態統計」によると、我が国のがんによる死亡者数は39万2千人であり総死亡者数の約3割を占め、死因の第一位となっている [2]。日本人が一生のうちにがんと診断される確率は男性が65.5%、女性が51.2%であり、2人に1人ががんに罹患する [3]。さらに、日本人のがんで死亡する確率は、男性が25.1%、女性が17.5%であり、男性では4人に1人、女性では6人に1人を占める。がんの死亡数は、男性では肺、大腸（結腸及び直腸）及び胃の順に高く、女性では大腸、肺、膵臓の順に高い [4]。国立がん研究センターによるがん統計において、2019年の臓器別がん罹患患者数で1位となっている大腸がんは、男女ともに高い罹患率を示し、生活習慣の欧米化などの関与で、今後も増加していくことが推察されている。

大腸がんは複数のがん原遺伝子、がん抑制遺伝子の異常が多段階的に蓄積することで引き起こされることから、大腸がんの起因遺伝子を探ることは重要なことである。大腸がんの発生に関わる *APC* 遺伝子は、がん抑制遺伝子の1つである。*Apc*^{Min/+} (C57BL/6J) マウスは、*Apc* 遺伝子に点突然変異（ナンセンス変異）を持つヘテロ接合体であり、そのヘテロ接合体欠損（LOH）により Wnt 経路が活性化され、すべての個体で小腸および大腸に良性腫瘍が自然発生する。当研究室におけるこれまでの研究において、若齢期 *Apc*^{Min/+} マウスと老齢期 *Apc*^{Min/+} マウスでは、腸管の良性腫瘍数に有意な差はみられないものの、発生している腸管腫瘍のサイズは様々であることを報告した。特に、若老に関わらず腫瘍サイズが大きいものは腫瘍内において浸潤が見られ、悪性度が進んでいることがわかった。一般的には、若齢における良性腫瘍の発生から老齢期にかけて腫瘍の悪性化が進行していくと考えられるが、腫瘍サイズの増大化は一定速度ではなく、急速に腫瘍サイズが拡大する場合もあることから、腫瘍サイズのばらつきには何かしらの因子が関わっていると考えられたため、中齢期のマウスを用いて大きさ別に腫瘍が採取され、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析が行

われた。その結果、*Trefoil Factor 2 (TFF2)* 遺伝子の発現上昇が顕著であることが見出された [5]。*TFF2* 遺伝子を高発現させたヒト大腸がん DLD-1 細胞をヌードマウスに移植した実験においては、移植腫瘍がコントロールよりも早く大きくなることが確認され、腫瘍増大化に *TFF2* 遺伝子が関与していることが明らかとされた [6]。

TFF は消化管などの粘液産生細胞から分泌されている分泌型タンパク質で、分子量 6-12kDa でシステインが豊富な小さいペプチドである。ヒトにおける *Trefoil Factor (TFF)* は TFF1、TFF2 及び TFF3 が知られている。また主要な発現部位は、TFF1 は胃のピット細胞や上皮細胞、TFF2 は胃粘膜頸部細胞や十二指腸のブルナー腺、TFF3 は小腸や大腸の杯細胞で発現することが報告されている [7]。TFF は消化管腔の分泌だけでなく血清及び尿中においても確認されている。また、TFF タンパク質は乳がんや肺がんの悪性化に関与している可能性があり、バイオマーカーになり得るか研究が進められている [8]。TFF をコードする遺伝子は染色体 21q22.3 の 50kb 領域にクラスター化されていることが知られている [9]。TFF はヒト、マウス、ラットやウシにおいて構造上の機能ドメインが保存されておりオーソログが存在する [10]。この機能ドメインは、分子内ジスルフィド結合によって形成された「三つ葉のクローバー」様 (trefoil) 構造をしており、これを TFF ドメイン (旧名称: P-ドメインおよびトレフォイル因子) という (Fig.1)。TFF1 (ヒト: 60 アミノ酸) 及び TFF3 (ヒト: 59 アミノ酸) は 3 つの分子内ジスルフィド結合 (Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6) によってループを形成した単一の TFF ドメインを持ち [11]、さらに TFF ドメインの外側で、C 末端から 3 番目のアミノ酸残基に 7 つ目のシステイン残基を遊離型としてもつ。一方、TFF2 (ヒト: 106 アミノ酸) には 2 つの TFF ドメインが含まれており、N 末端と C 末端は TFF ドメインの外側の 2 つのシステイン残基を介してジスルフィド結合している (Fig.1) [9]。いずれもこのクローバー様の構造によって、酸、熱、消化酵素などの元でも安定して存在することができる [11-14]。TFF1 は胃表面上皮のムチン (MUC) タンパク質 MUC5AC

と、TFF2 は胃小窩から深部腺および頸部細胞の MUC6 と、及び TFF3 は腸の MUC2 と局在化する。この際、TFF1 と TFF3 は、MUC5AC や MUC2 の他、ガストロカイン 2 (GKN2) および 免疫グロブリン G (IgG) Fc 結合タンパク質 (FCGBP: ムチン様糖タンパク質) などの単量体とジスルフィド結合した、ヘテロ二量体の形成 (TFF1-GKN2, TFF1-FCGBP, TFF1-MUC5AC, TFF3-FCGBP, TFF3-MUC2 など) が報告されている。さらに TFF1 と TFF3 では、ヘテロ二量体だけでなく、ホモ二量体 (TFF1-TFF1, TFF3-TFF3) としても局在するようだが、存在する構造において不明な点は多い。FCGBP とのヘテロ二量体 (TFF1-FCGBP 及び TFF3-FCGBP) は、粘膜上皮の自然免疫防御の一部であり、微生物の侵入を防止している。TFF2 は MUC6 と高分子量複合体を形成することで保護機能を果たし、粘液バリアを物理的に安定化させる。正常なヒトの胃における TFF2 の発現と胃液への分泌を測定した実験により、TFF2 の大きさは 12kDa とされるがそれより大きなタンパク質も検出された [15]。これはタンパク質の翻訳後修飾とされるもので、エンドグリコシダーゼであるペプチド N グリコシダーゼ F を用いて N グリコシル化 TFF2 であることが示され、正常な胃粘膜中の TFF2 の大部分もグリコシル化されていることが報告されている [15]。

TFF のノックアウトマウス作製による研究はいくつか報告されており、特に TFF1 ノックアウトマウスでは、胃において幽門前腺腫を発症し、そのうちの 30% がさらに多発性胃がんに行進した [14]。一方で TFF2 のホモ接合性変異マウスは、明らかな胃腸状態の異常はなく、生存可能で繁殖力があつた。しかし、定量的測定の結果、胃粘膜の厚さと胃粘膜の増殖速度が大幅に減少していることが明らかになった [14]。

1924 年 Otto Warburg により、がん細胞は酸素の有無にかかわらず解糖系を亢進させて ATP を産生するというワールブルク効果が提唱された [16]。腫瘍細胞は盛んに分裂するため多くのエネルギーを必要とするが、有酸素下であっても ATP を産生するには効率の悪い解糖系を利用している。この代謝異常の発見は、がん細胞の特徴の 1 つと

して広く知られるようになり、腫瘍細胞を取り巻く環境として腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: 以下 TME という) を形成している。現在は、がんの進行のために必要な核酸、タンパク質、脂質などの生体分子の前駆体を産生するためにも解糖系の活性化が重要であると考えられている [17]。また、解糖系の他に、ペントースリン酸回路、ヌクレオチド生合成、TCA 回路、アミノ酸生合成、グルタチオン生合成、グルタミノリシス、脂肪酸生合成、 β 酸化などのさまざまな代謝経路が、がん細胞で変動することが分かっている [18,19]。がん組織では構造が脆弱な血管が無秩序に張り巡らされており、栄養の供給も不安定である。そのため、TME では栄養、酸素、pH レベルが正常細胞とは異なることが明らかになっている [20]。栄養源であるグルコース、アミノ酸、脂質などは、代謝の重要な基質であるため、これらの TME の変化 (栄養源の低濃度化、低酸素、pH など) とそれに応じたがん細胞内の代謝は容易に変動する。

1950 年代頃から TME の一つとして酸性環境の存在が知られていたが、低酸素環境における解糖系亢進の「結果」として捉えられており、腫瘍の悪性化との関連は注目されていなかった。しかし近年の研究により、酸性環境が、特異的な細胞応答やがん細胞の代謝変化を通じて腫瘍の増殖を示し、悪性化に寄与することが明らかになってきた。さらに劣悪な環境にがん細胞自らが適応することで、がんのさらなる進展や治療抵抗性を起こすとも考えられている [21,22]。TME に着目することは、細胞内の代謝変動に関わる遺伝子群の発現変化へとつながるため、ゲノム医療のような個別化医療を目指す上で非常に重要である。

TFF と TME の関係について、低酸素症により誘導される低酸素誘導因子 HIF-1 は胃上皮細胞における *TFF* 遺伝子の発現誘導を媒介することが明らかとなった [23]。アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬により胃が損傷を受けると、粘膜の微小循環が損なわれ、上皮細胞への酸素供給が減少する [23]。ラットによる実験では、胃損傷

部位において低酸素状態で低酸素誘導因子 HIF-1 が誘導されることで *TFF2* 遺伝子の発現誘導することが示唆された [23]。

TFF とがんとの関わりについては、TFF2 は EGFR/MAPK 活性化を介することで胆管癌の増殖を促進する報告や、TFF1 や TFF3 は細胞遊走や浸潤との正の相関を示す報告などがある [9,24,25]。一方で、TFF2 の発現減少が腫瘍発生を促進するとの報告もあり [26]、がん促進もしくは抑制効果のどちらを有しているか長年議論が続いている [24]。

最近、TFF2 の新たな機能として KO マウスの表現型解析及び分泌型 TFF2 の投与解析により膵臓の発生分化に関与するとの報告があり、注目されている [27]。膵臓は、外分泌系と内分泌系を併せ持つ臓器であり、その発生分化はほとんど分かっていない。この研究では、TFF2 は CXCR4 を介してインスリン産生細胞のアポトーシスを抑制し、細胞の生存を助ける報告がされている [27]。分泌型 TFF2 が膵臓の発生・分化に関与することから、その作用メカニズムが明らかとなれば、induced pluripotent stem (iPS) 細胞によるシャーレ内における膵臓の作製へとつながり、インスリン分泌低下による糖尿病の治療に大きく貢献できる可能性がある。したがって、*TFF2* 遺伝子の発現メカニズムを明らかにすることは、TFF2 が腫瘍に対して悪性化に働くかまたは制御するかなどを含め、非常に重要な意味を有していることになる。

そこで本研究では *TFF2* 遺伝子の発現機構に着目するとともに、分泌した TFF2 タンパク質が周囲のがん細胞にどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的に解析を行った。*TFF2* 遺伝子の発現は、膵臓がん、大腸がん、胆管がん、その他の腫瘍で高発現するとの報告は多数あるが [28-30]、ヒト結腸腺がん由来細胞 DLD-1 や膵臓がん由来細胞 PANC-1、胆管がん由来細胞 KMBC において *TFF2* 遺伝子の発現は確認されていない [31] ため、がん組織と培養細胞では *TFF2* 遺伝子の発現に相違がみられる。第 1 章では、がん特有の代謝変動により生じる微小環境に着目し、*in vitro* のがん

細胞の培養環境を *in vivo* の腫瘍環境（酸性環境や温度変化） に近づけた際の *TFF2* の発現について検討した。第 2 章では、酸性条件下におけるその他の遺伝子群の発現動向を網羅的に解析した。加えて、培養上清中に含まれる *TFF2* タンパク質が他の遺伝子発現に与える影響についても解析を行った。第 3 章では、*TFF2* を siRNA で抑制したときのフィブロネクチンファミリー遺伝子の発現変化を確認した。第 4 章では、メタボローム解析により分泌タンパク質である *TFF2* が周囲のがん細胞の代謝経路にどのような影響を及ぼしているのか明らかにすることを試みた。これらの実験を通して、長年ベールに包まれていた *TFF2* 遺伝子の新たな一面を明らかにしたので報告する。

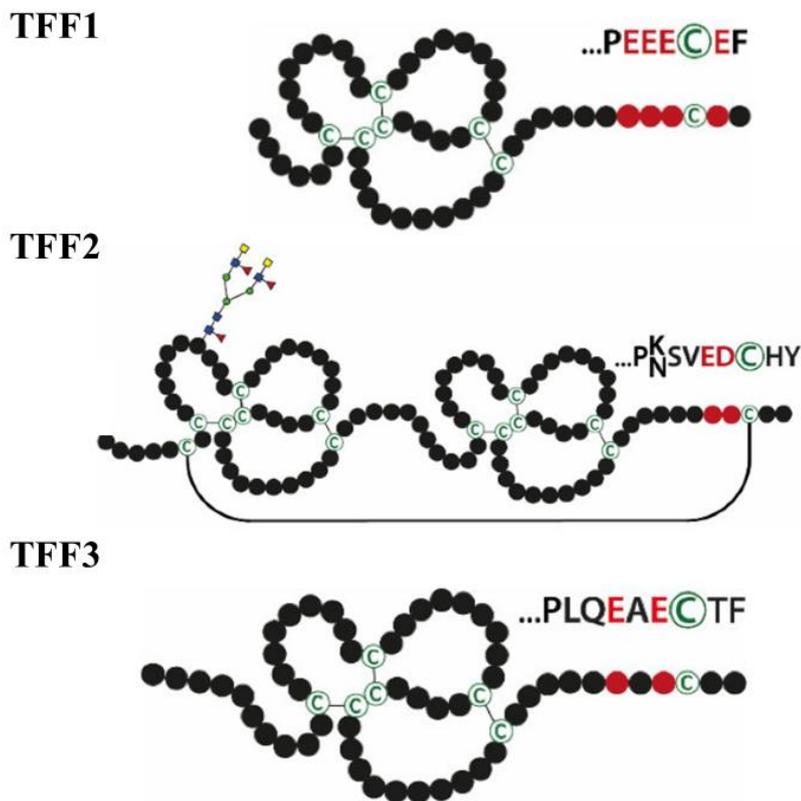


Figure 1. Structures of human TFF peptides.

(W. Hoffmann,, *Int J Mol.* 21(2020) 4535)

第1章

培養条件の違いが *TFF* の発現に与える影響

低酸素、栄養不足、酸性などの特徴を持つがんの微小環境は、ゲノム不安定性、エピゲノム変化、エネルギー代謝の変化、転移・浸潤の促進などを誘発し、がんの悪性化に深く関わっている。この腫瘍微小環境 (Tumor microenvironment : TME) は、細胞死耐性、薬剤耐性、免疫逃避の獲得を促進することにより、さらにがんの悪性化を加速させる [32]。トリプルネガティブ乳がん患者のトランスクリプトーム解析では、TME によるエピジェネティックな調節異常などが遺伝子発現のパターンに影響を及ぼすことが報告されている [33]。実際、TME 下ではない培養がん細胞における遺伝子発現は、がん組織における遺伝子発現とは異なっていることから、エピゲノム変化 (プロモーター領域の DNA の脱メチル化やヒストン活性化修飾など) が反映されていない可能性も考えられる。TME における慢性的な低酸素状態は、乳酸などの分泌により嫌気呼吸の促進と pH の低下を引き起こすことが報告されており、がん組織の pH は約 6.2-6.9 となっている [32]。腫瘍内の酸性環境は、転移の基礎となる様々な細胞プロセスやシグナル伝達経路に関与し、血管新生を促進すると報告されている [34-36]。また、腫瘍組織内では温度変化と悪性化の関係が報告されており、悪性度が高い腫瘍組織内は正常組織内の温度 (37°C) より 2-3°C 高いことが明らかとなっている [37,38]。

TFF2 遺伝子は、正常組織では胃で発現が高く、がん組織では大腸がんを始め、膵臓がんや胆管がんなど多くの腫瘍において発現上昇が報告されているが [28-30]、ヒト結腸腺がん由来細胞 DLD-1 において *TFF2* 遺伝子の発現は確認されず矛盾が生じている。そのため、*in vitro* における TME が異なることにより、*TFF2* 遺伝子の発現に相違がみられているのではないかと考えた。そこで本章では、TME を決定する重要な因子である温度と pH が *TFF2* の mRNA やタンパク質発現に及ぼす影響を検討した。

1. 実験材料及び実験方法

1-1. 細胞及びトランスフェクション

本研究に使用した細胞株は以下の通りである。ヒト結腸腺がん由来細胞 DLD-1 (American Type Culture Collection [ATCC] CCL 221, ATCC, Manassas, VA, USA)、ヒト結腸腺がん由来細胞 Caco-2 (ATCC HTB-37)、ヒト子宮頸がん由来細胞 HeLa (ATCC CCL-2) 及びヒト肝がん由来細胞 HepG2 (ATCC HB-8065) を用いた。これら細胞を使用した理由は、DLD-1 は [5] において大腸がんの腫瘍増大化について研究で使用されていたこと、Caco-2 は DLD-1 と同様のヒト結腸腺がん細胞、HeLa は一般的なヒト細胞モデルとして多くの研究で使用されていること、HepG2 は酸性 pH で機能できるさまざまな加水分解酵素 (リソソーム酵素) を発現することから今回の研究において適すと判断した。

HepG2 細胞については、分析サービスプロバイダーの Promega (Promega Corporation, Wisconsin, USA) に受託し、ショートタンデムリピート (STR) を利用して、細胞株の認証及び同定を行った。

DLD-1 細胞は、10% ウシ胎児血清 (以下 FBS、Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) 及び 1% ペニシリン (10,000 U/mL) / ストレプトマイシン (10,000 µg/mL) 混合溶液 (終濃度が 100U/mL、以下 1% PC/SM、Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した RPMI GlutaMax Medium 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で培養した。Caco-2 細胞 と HeLa 細胞 は、10% FBS、1% NEAA (Thermo Fisher Scientific) 及び 1% PC/SM を添加した MEM (Thermo Fisher Scientific) で培養した。HepG2 細胞 (ATCC HB-806) は、10% FBS、1% PC/SM 添加 DMEM (Thermo Fisher Scientific) で培養した。

さらに、ヒトの *TFF2* 遺伝子を発現プラスミド *pcDNA 3.1 -/c-(K)-DYK-TFF2* (Biotech Corporation, New Jersey, USA) として一時的にトランスフェクションした DLD-1 細胞 (以下、*hTFF2* 細胞とする) を作製した。トランスフェクションは、メーカー推奨のプロトコルに従い、1 μ L の Lipofectamin[®]3000 (Life Technologies Invitrogen, California, USA) を使用して行った。この *hTFF2* 細胞は、*TFF2* を標的とした免疫組織染色の陽性コントロールとして使用した。陰性コントロールは、DLD-1 に *pcDNA 3.1 -/c-(K)-DYK* (空ベクター) を一時的にトランスフェクションしたものを使用し、これを mock 細胞とした。

温度実験で使用した細胞を除く全ての細胞は、37°Cの加湿型、5% CO₂ 条件下で培養し、継代は70%コンフルエント直前に PBS で洗浄後、トリプシン-EDTA 溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で細胞を剥離し、遠心で回収し適当な細胞密度になるように培地に懸濁した。

1-2. 高温培養条件

[37,38] の文献を参考に、CO₂ インキュベーターの設定温度は高温条件 40°Cとした。6 well (10 cm²/well) プレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に 1.2×10^5 cells/well の密度で播種し、24 時間と 48 時間培養後にそれぞれの細胞と培養上清を回収した。培地は温度変化によるタンパク質の変性を考慮し、それぞれ Opti-MEM (低血清培地: MEM 含有の FBS が 50%削減された) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。インキュベーターはすべて CO₂濃度 5%とした (Fig.2)。これらの操作は2回繰り返した。

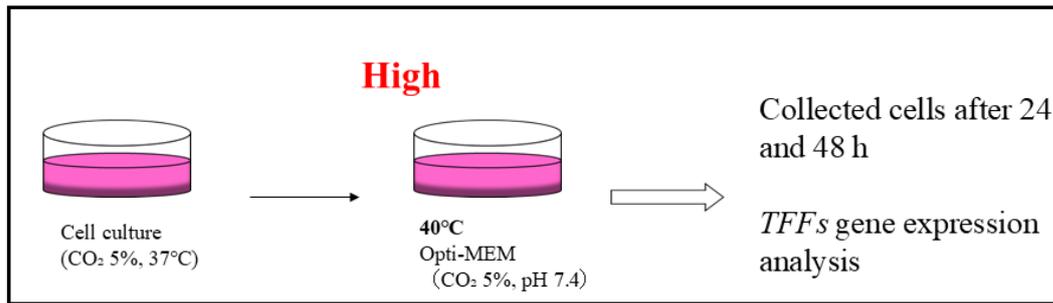


Figure 2. High temperatures conditions on DLD-1 cells. DLD-1 cells were seeded onto 6-well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at densities of 1.2×10^5 cells/well, cultured at 40°C. DLD-1 cells were collected after 24 and 48 h, respectively. We used Opti-MEM (Reduced Serum Medium; Thermo Fisher Scientific) culture medium to limit temperature-induced protein denaturation.

1-3. 酸性培養条件

[39] の文献を参考に、酸性条件は pH 6.5 と pH 6.8 に調整した。酸性にするために使用した試薬は、4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; Dojindo; PJ072, Osaka, Japan)、塩酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 及び酢酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いた。培養液は、低血清培地である Opti-MEM を使用した [39]。DLD-1 細胞は、6 well (10 cm²/well) プレート(Thermo Fisher Scientific) に 1.2×10^5 cells/well の密度で播種し、24 時間と 48 時間培養後にそれぞれの細胞と培養上清を回収した (Fig.3)。Caco-2、HeLa 及び HepG2 細胞も同じ条件下で培養し、回収を行った。インキュベーターはすべて 37°C で、CO₂ 濃度 5% とした。これらの操作は 2 回繰り返した。

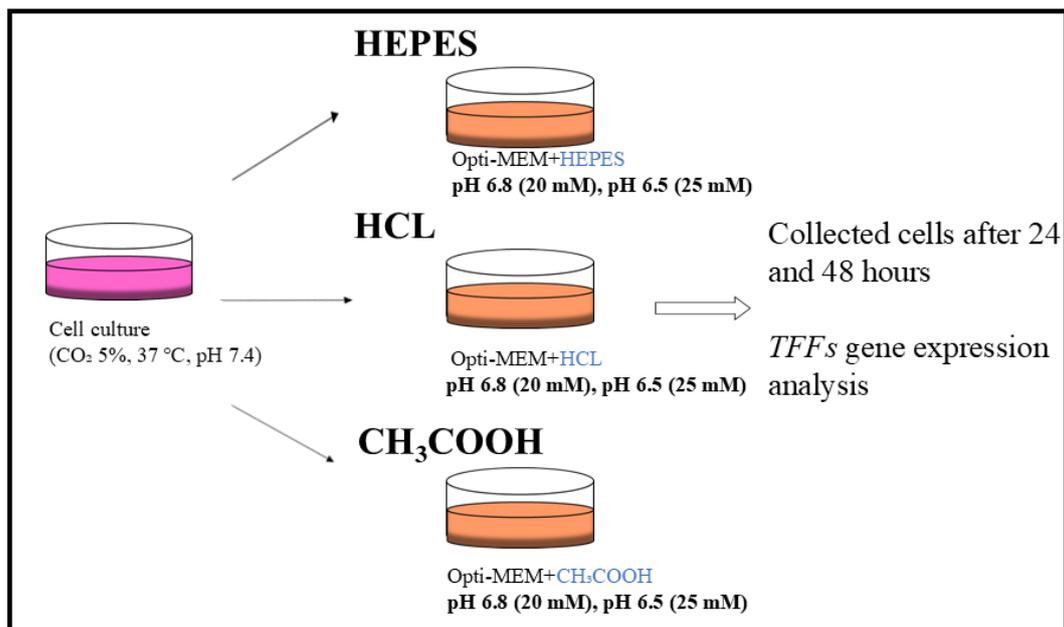


Figure 3. Acidic conditions by HEPES, HCL and CH₃COOH. DLD-1 cells were cultured under acidic conditions (pH 6.5 and 6.8). 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (Dojindo; PJ072, Osaka, Japan), hydrochloric acid and acetic acid were added to Opti-MEM medium, which was used to reduce protein denaturation. DLD-1 cells were seeded in 6-well plates (Thermo Fisher Scientific) at a density of 1.2×10^5 cells/well.

1-4. pH 6.5 での細胞数の測定

低 pH が細胞の生存率に与える影響を評価するために、細胞生存分析を実施した。4 ウェルの培養ディッシュ (WATSON Co., Ltd., CA, USA) の 2 つのウェルに DLD-1 細胞を 1×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し、合計 8 つのディッシュ (WATSON) を同時に用意した。底部への細胞接着を確認した後に、4 つのディッシュの培地を HEPES で調整した pH 6.5 の Opti-MEM 培地に交換し (詳細は、細胞培養 pH セクションを参照)、残りの 4 つのディッシュの培地は通常の Opti-MEM に交換した。コントロールである

Opti-MEM は pH 7.4 であった。培地交換後、24 時間間隔で EVE 自動細胞カウンター (AR BROWN Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用して細胞数を計測した。同様の実験を、酸性条件下での生存が難しいことで知られる HeLa 細胞でも実施した [40]。細胞数は各ウェルで 2 回計測し、再現性の確保のため実験を 2 回繰り返した。

1-5. RNA 抽出

TRIZOL LS (Thermo Fisher Scientific) を使用して、製造元のプロトコルに従い全 RNA 抽出を行った。RNA の純度は、Nanodrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA) の 260/280 および 260/230 nm の吸光度比を使用して評価した。抽出された全 RNA は、260/280 nm 比が約 2.0、260/230 nm 比が 2.0 ~ 2.2 であり、RNA の品質を確認した。全 RNA は、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して逆転写した。

1-6. 定量的リアルタイム RT-PCR (Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction) による解析

リアルタイム RT-PCR は、Fast SYBRTM Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、製造者のプロトコルに従って実施した。熱サイクル条件は以下の通りであった。初期変性には 95°C で 20 sec を行い、次に変性を 95°C で 1 sec、アニーリングや伸長操作を 60°C で 20 sec 行い、全部で 40 サイクル行った。

使用したヒト遺伝子用プライマー配列は以下の通りである。

TFF1 (5'-AGACAGAGACGTGTACAGTGG-3'及び
5'-TAGGATAGAAGCACCCAGGGGAC-3')、

TFF2 (5'-CAAAGCAAGAGTCGGATCAG-3'及び

5'-CCAGGGCACTTCAAAGATG-3')、

TFF3 (5'-ATGAAGCGAGTCCTGAGCTG-3'及び

5'-GCTTGAAACACCAAGGCAC-3')、

PDK4 (5'-TG TTCCTTCTCACCTCCATC-3'及び

5'-GCAAGCCGTAACCAAAACC-3')、

HSP90 α (5'-CATAACGATGATGAGCAGTACGC-3'及び

5'-GACCCATAGGTTACCTGTGT-3')、

GAPDH (5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'及び

5'-TGGGATTTCCATTGATGACA-3')。

GAPDH は内在性コントロールとして使用した。検出は、Applied Biosystems[®]7900HT

Fast リアルタイム PCR システムで行った。プライマーセットの特異性を評価するために、各 PCR アンプリコンの融解曲線を分析した。

1-7. マウス

本研究では、メス 2 匹とオス 1 匹の合計 3 匹の *Apc*^{Min/+} (C57BL/6J) マウスを使用した。これらの *Apc*^{Min/+} マウスは、ジャクソン研究所 (Bar Harbor, Maine, USA) から入手され、特定の病原体フリーの条件下で、12 時間明暗サイクルでエサと水は自由に摂取できる環境で飼育した。マウスは 13 週齢から 15 週齢で解剖した。組織採取には、麻酔器具 (MK-A110D, 室町機械, Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用し、吸入によってイソフルランを投与しながらの組織採取 (0.5L/min、5 分間の導入: 1.5%、維持: 1.5%) を行った。安楽死には、二酸化炭素吸入 (30%/min) を使用した。マウスの実験は、長崎国際大学動物実験委員会から承認を受け(承認番号 168)、委員会の定めたガイドラインに厳

密に従った。飼育時のマウスのストレスを最小限にするため、ケージ内の環境は委員会の規定に従い良好な環境を維持した。マウスの健康状態は厳密に監視され、少なくとも週に2回のチェックを行った。健康状態が悪いと判明したマウスは、二酸化炭素ガスを穏やかに投与して人道的に安楽死させた。死亡の確認は、呼吸と反射動作の停止、および死後硬直の開始に基づいて行われた。

1-8. ウェスタンブロッティング

Apc^{Min/+}マウスの組織 (正常な腸管、胃、腸に発現したポリープ) における TFF2 タンパク質の発現を調べた。この場合の正常な腸管とは、顕微鏡で可視することでポリープが発生していない箇所を選んで採取したサンプルである。タンパク質分解酵素阻害剤 (Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany) を添加した RIPA Lysis バッファー (COSMO BIO Co., Ltd., Tokyo, Japan) により組織を溶解しタンパク質を回収した。抽出した総タンパク質濃度は、BCA を使用して標準曲線を作成し、BCA タンパク質アセットキット (TAKARA BIO Co., Ltd, Shiga, Japan) で測定した。抽出したタンパク質 (50 µg) は、4 × Sample Buffer (277.8mM Tris, 4.4% SDS, 44.4% Glycerol, 0.02% Bromophenol Blue, pH 6.8) に2-メルカプトエタノール (2-ME) を添加し可溶化後、5%-20% SDS-ポリアクリルアミドゲル (ATTO CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて、20 mA でおよそ1時間泳動後、PVDF膜 (ポリフッ化ビニリデン膜) (Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany) に転写した。細胞内に存在する TFF2 と *Gapdh* の量は大きく異なるため、検出に必要な暴露時間が異なる。したがって、転写後メンブレンをハサミで切断し、ウェスタンブロッティング分析を行った。転写メンブレンは、5%スキムミルク中 (in TBS-T) において 25°Cで30分間ブロッッキング反応した後、一次抗体として抗 TFF2 抗体 (1:500; Proteintech Group Inc., Rosemont, IL, USA) を片方の膜に適用し、もう一方の膜には抗

Gapdh 抗体 (1:5000; Gene Tex, CA, USA, GTX100118) をローディングコントロールとして用い、4°Cで一晩反応させた。次いでに両サンプルと二次抗体である HRP (Horseradish peroxidase) 標識された抗 rabbit 抗体 (1:2000 希釈; Dako, California, USA) とともに 25°Cで1時間インキュベートした。なお、全ての抗体は 1%スキムミルク (in TBS-T) で希釈し用いた。検出は、ELC 検出キット (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて発光を確認し、ChemiDoc Touch イメージングシステム (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) でサンプルを画像化した。

1-9. 免疫組織化学染色

細胞 (4×10^4 細胞/ウェル) を 8 ウェルスライドチャンバー (WATSON Co., Ltd., CA, USA) に播種し、24 時間インキュベートした。24 時間後、HEPES により pH 6.5 に調整した培地に交換し細胞を培養した (調整の詳細は細胞培養 pH セクションを参照)。次に、細胞を新しく調製した 4%パラホルムアルデヒド溶液で 10 分間固定し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した。細胞を 0.2% TritonX-100/PBS で 15 分間細胞の透過処理をした。ブロッキングには 1%BSA (New England Biolabs, Ipswich, USA) を使用した。10 分間のブロッキング後は、細胞を一次抗体抗 TFF2 抗体 (1:100 希釈、Protein tech, Rosemont, IL, USA, 13681-1-AP) とともに 25°Cの室温で 1 時間インキュベートした。細胞を PBS で 3 回洗浄し、さらに HRP (Horseradish peroxidase) 標識された抗ウサギ抗体 (1:1,000 希釈、Dako, Glostrup, Denmark) とともに室温で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄した後、スライドを 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (0.5mg/mL) (DAB; Sigma-Aldrich) で 20 分間インキュベートし、すぐに水道水で洗浄した。DAB は、50mM Tris-HCL (pH7.6) で作製し、0.03%過酸化水素を添加した。ヘマトキシリン及び水性グリセリン・ゼラチンによる封入剤を使用して対比染色を行った。顕微鏡を

使用して、染色された細胞領域の4つの画像を保存し、画像解析ソフトウェア Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>, Bethesda, Maryland, USA) を使用して染色領域をピクセル単位で定量化した。

1-10. 統計処理

2群間の比較にはノンパラメトリック検定である Mann-Whitney U 検定を使用した。3群以上の比較には分散分析を行い、その後 Dunnett's Post-hoc test 検定によりコントロール群とその他の群を比較した。これらの統計解析には、GraphPad Prism 5 ソフトウェア (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。P < 0.05 を統計的に有意であると判断した。

2. 実験結果

2-1. 温度変化が *TFF* 遺伝子発現に与える影響

腫瘍微小環境を模倣するために、DLD-1 細胞を 40°C で培養した。それぞれ 24 時間及び 48 時間培養した後に細胞回収し、RNA を抽出した。Fig.4 では、40°C の温度条件下での各遺伝子の相対的な定量を示している。*GAPDH* は内在性コントロールとした。各遺伝子の発現レベルは、37°C での発現値によって正規化した。その結果、*HSP90α* は、40°C で有意に発現が増加しており (*P < 0.05) (Fig.4A)、*TFF1* と *TFF3* の発現は、40°C で 24 時間及び 48 時間の培養後に遺伝子発現が増加する傾向があったが、*TFF2* の mRNA 発現は増加しなかった (Fig.4B)。相対定量法による PCR の実験では、DLD-1 細胞 (コントロール) における *TFF2* 遺伝子の発現量を 1 として解析している。実際の発

現量は極わずかであり、ウエスタンブロット法による TFF2 タンパク質の発現は確認することはできなかったが、TFF2 mRNA は再現性よく定量化可能性あった。

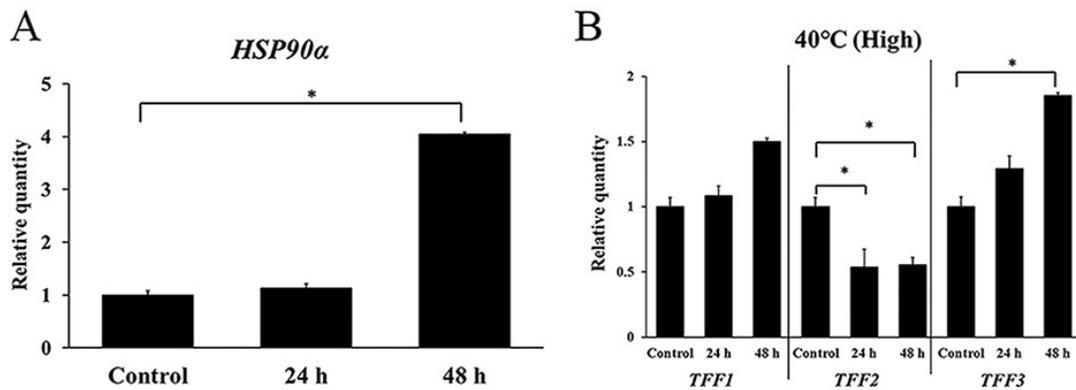
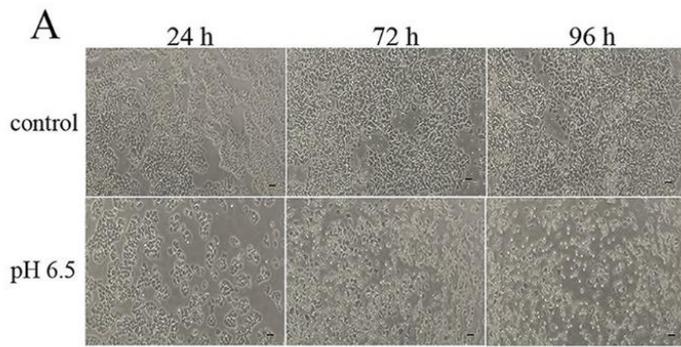


Figure 4. Effect of high temperature on TFF expression. To mimic the cancer microenvironment, DLD-1 cells were cultured at 40°C for 24 and 48 h, and RNA was extracted. The graph illustrates the relative quantification, standardized by the expression levels of each gene, using the expression at 37°C as a control (*P<0.05; nonparametric Mann-Whitney U test, n=4). *GAPDH* was employed as the reference gene. Data are presented as the mean ± standard error. *TFF*, trefoil factor; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *HSP90α*, heat shock protein 90 α.

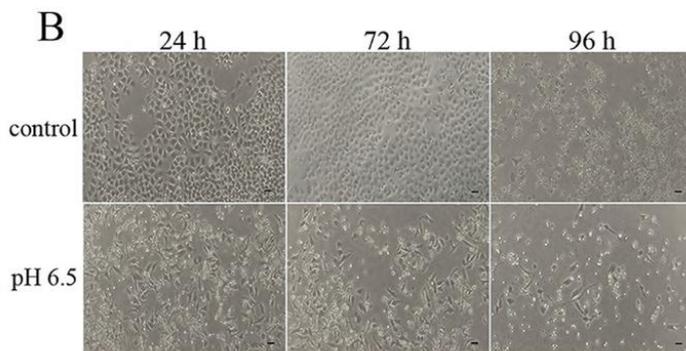
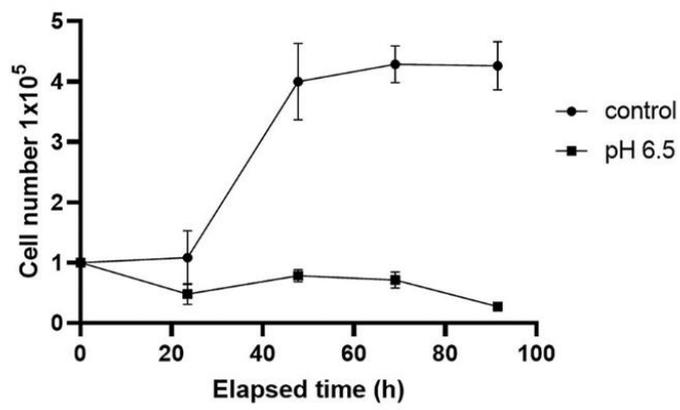
2-2. pH 6.5 における細胞生存率評価

生体内の腫瘍微小環境 (pH 範囲 6.2-6.9) で一般的に観察される酸性環境 (HEPES, pH6.5) について、*in vitro* での DLD-1 及び HeLa 細胞の生存に及ぼす影響を検討した。DLD-1 細胞は、pH7.4 のコントロール培地では 44 時間後まで増殖し、92 時間後まで細胞数は保たれたが、酸性培地に暴露された群では、細胞数の増加は無く、72 時間後までに生細胞数は約半数に減少した (Fig.5A)。一方、HeLa 細胞は、コントロール培地では

72 時間まで増殖した後、98 時間後にはほぼ死滅した。また、酸性培地群では増殖はなく、98 時間後にかけて生細胞数はゆるやかに減少した (Fig.5B)。



DLD-1



HeLa

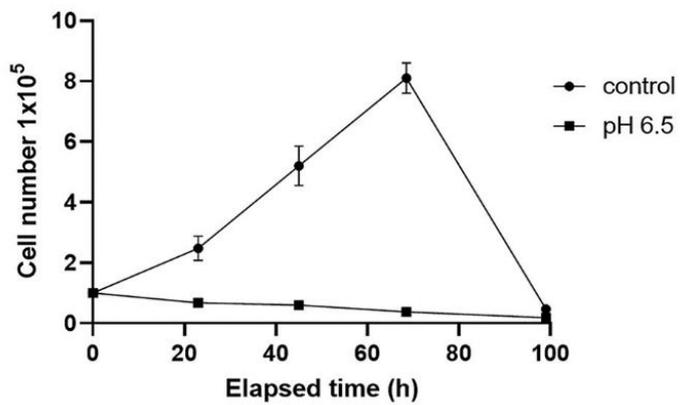


Figure 5. Effect of pH 6.5 on survival of DLD-1 and HeLa cells; graph depicts the number of surviving cells cultured in Opti-MEM under normal pH conditions and in medium at pH 6.5 by HEPES. (A) DLD-1 colon cancer and (B) HeLa cervical carcinoma cells. Data are presented as the mean \pm standard error (n=4). Under $\times 40$ magnification microscope observation (scale bar, 10 μm).

2-3. 酸性 pH が *TFF* 遺伝子発現に与える影響

DLD-1 細胞を酸性条件 (HEPES, pH 6.8 および pH 6.5) で 48 時間培養した。pH 7.4 で 48 時間培養した細胞は、リアルタイム RT-PCR による定量を行う際のコントロールとして使用した。低 pH で発現する *PDK4* [38] は、酸性培地により遺伝子発現の上昇が確認された (Fig.6A)。*TFF2* の mRNA 発現は、pH 6.5 及び pH 6.8 の酸性培地で培養された細胞において、定量値で 42.8 倍及び 5.8 倍増加した (Fig.6B)。次に、細胞の培養時間を調整し、いくつかの時点で細胞を回収し、*TFF2* mRNA の発現量を測定した。リアルタイム RT-PCR で定量を行う際、pH 7.4 で 1 時間培養した細胞をコントロールとして使用した。中性 (pH 7.4) 培養条件下では、培養細胞での *TFF2* の mRNA 発現は低かった。酸性培養条件下で 24 時間培養した後、*TFF2* の mRNA 発現は有意に増加した ($P < 0.0001$) (Fig.6C)。次に、生体内において低 pH 環境に曝露された組織における *TFF2* の mRNA やタンパク質の発現を調べた。

13 から 15 週齢の *Apc*^{Min/+} マウスにおいて、酸性環境であると考えられる胃及び腸ポリープ内において *TFF2* のタンパク質発現は、ウエスタンブロッティングにより確認することができたが、弱アルカリ性である正常腸管部位においては確認されなかった (Fig.7B)。mRNA の発現も、胃や腸管ポリープでのみ確認することができた (Fig.7A)。

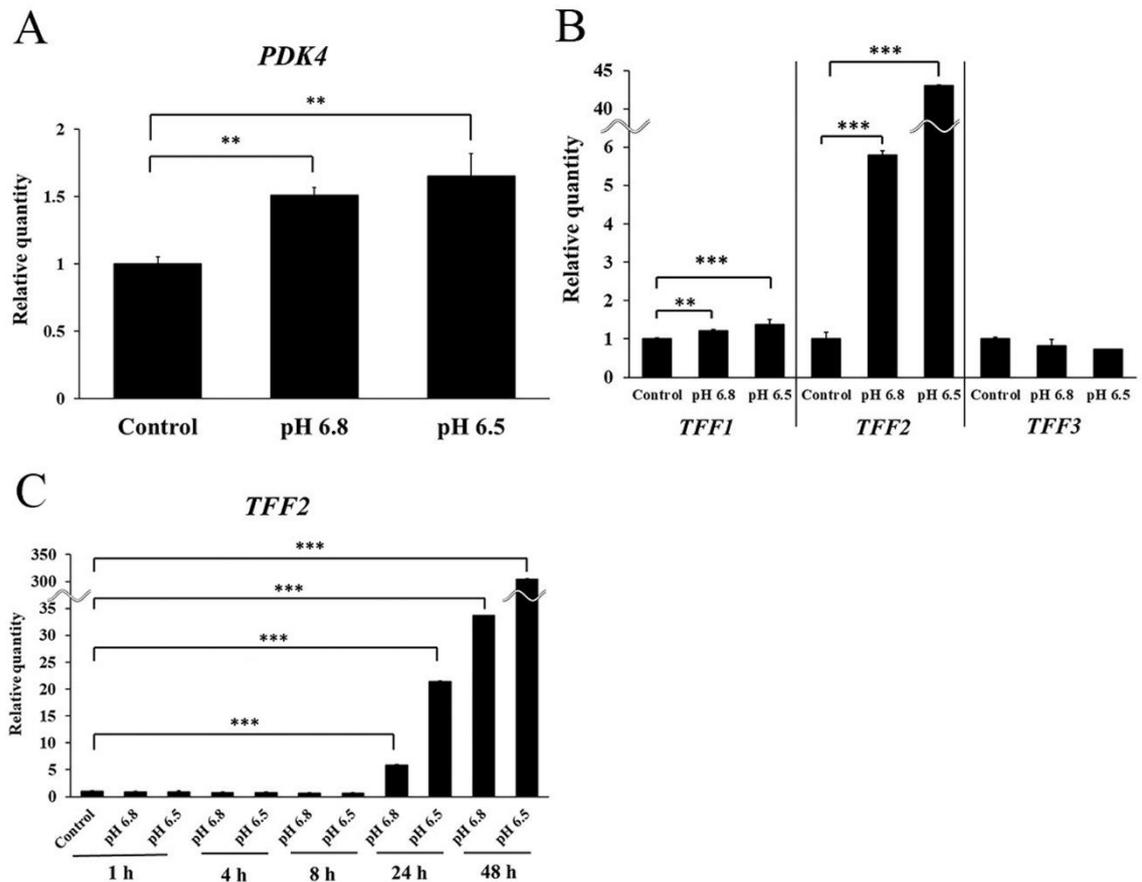


Figure 6. Effect of acidic medium on *TFF* expression. We cultured DLD-1 cells under acidic conditions (pH 6.5 and 6.8) adjusted by HEPES for 48 h. Cells cultured at pH 7.4 for 48 h were used as a control when performing relative quantification with real-time RT-PCR. The graph provides a visual representation of the relative quantification, standardized by the expression levels of each gene, with pH 7.4 expression serving as a control. Subsequently, P-values were calculated using relative quantification values through one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.0001$). Each assay was performed in quadruplicate. Data are presented as the mean \pm standard error. *TFF*, trefoil factor; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *PDK4*, pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4.

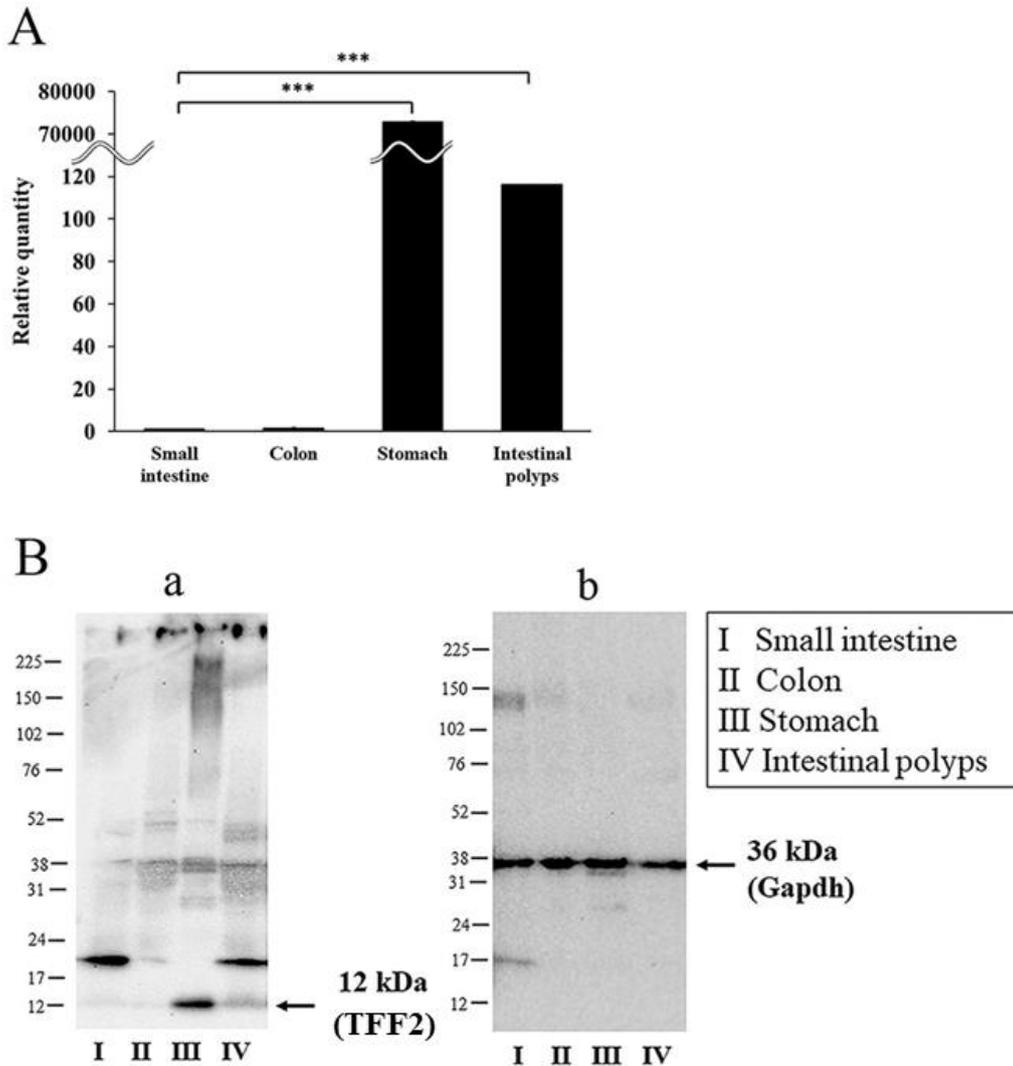


Figure 7. TFF2 expression in *Apc*^{Min/+} mouse tissues. (A) *TFF2* expression in the small intestine served as a control for relative quantification. Subsequently, P-values were calculated using relative quantification values through one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test (***)P<0.0001). (B) Western blot analysis of mouse tissue extracts; (a) TFF2 antibody and (b) Gapdh antibody; each lane was loaded with 50 µg of protein extracted from the respective tissues, including the small intestine, colon, stomach, and intestinal polyps. Three mice were used in this study. TFF2, trefoil factor 2; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2-4. 酸性添加剤の違いによる *TFF* 遺伝子発現への影響

塩酸と酢酸による酸性培地 (pH 6.5 および 6.8) を用いて、DLD-1 細胞を 48 時間培養した。リアルタイム RT-PCR による定量を行う際、pH 7.4 で 48 時間培養した細胞をコントロールとして使用した。低 pH で発現する *PDK4* は、塩酸、酢酸どちらにおいても有意に発現が増加した (** $P < 0.0001$) (Fig.8A 及び Fig.9A)。塩酸を用いた酸性培地による *TFF2* の mRNA 発現は、pH 6.5 および pH 6.8 の両方で有意に (** $P < 0.0001$) 上昇が見られ (Fig.8C)、酢酸を用いた酸性条件下による *TFF2* の mRNA 発現では 48 時間後の pH 6.8 において有意な発現上昇 (** $P < 0.0001$) がみられた (Fig.9C)。しかし、pH 6.5 では発現は誘導されなかった。*TFF1* と *TFF3* の mRNA 発現は、塩酸を用いた酸性培地では発現上昇はみられず、酢酸を用いた酸性培地では pH 6.8 の 48 時間後ではわずかな上昇 (** $P < 0.01$ 及び ** $P < 0.0001$) がみられたが、pH 6.5 では発現上昇は見られなかった。

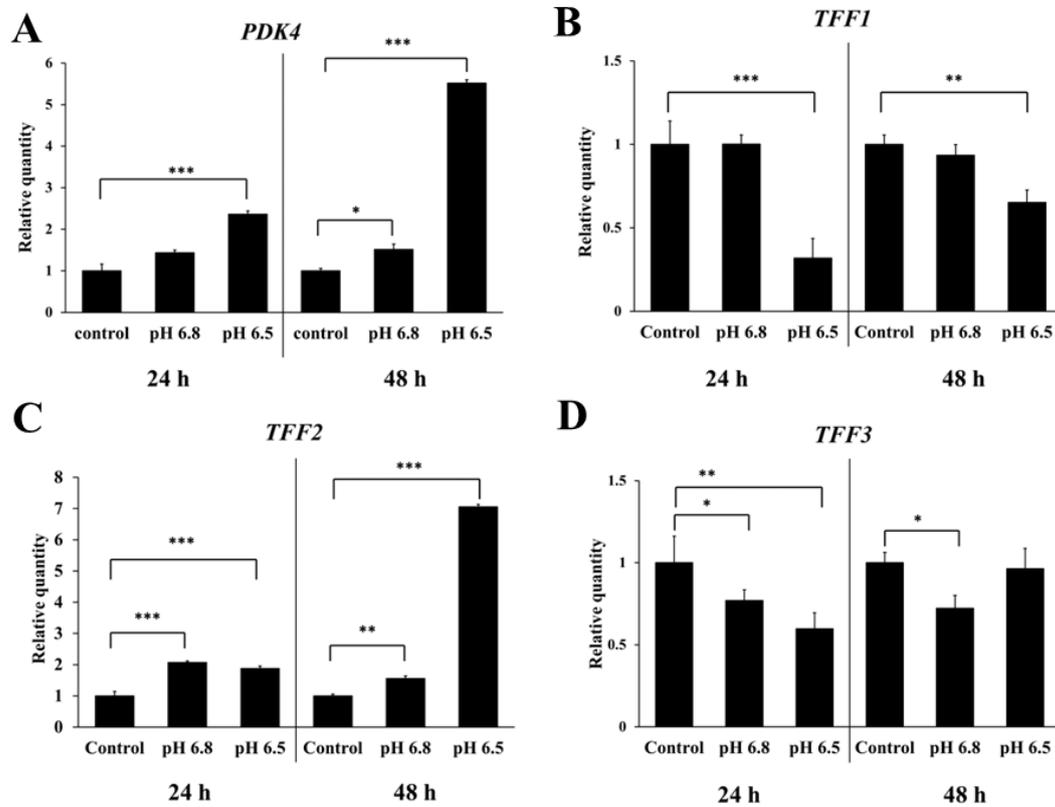


Figure 8. Effect of acidic medium supplemented with hydrochloric acid (HCL) on *TFF* expression. We cultured DLD-1 cells under acidic conditions (pH 6.5 and 6.8) for 24 and 48 h. Acidic pH was adjusted using HCL. Cells cultured at pH 7.4 for 24 and 48 h were used as a control when performing relative quantification with real-time RT-qPCR. Subsequently, P-values were calculated using relative quantification values through one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.0001$). Each assay was performed in quadruplicate. Error bars indicated mean standard error (*SE*).

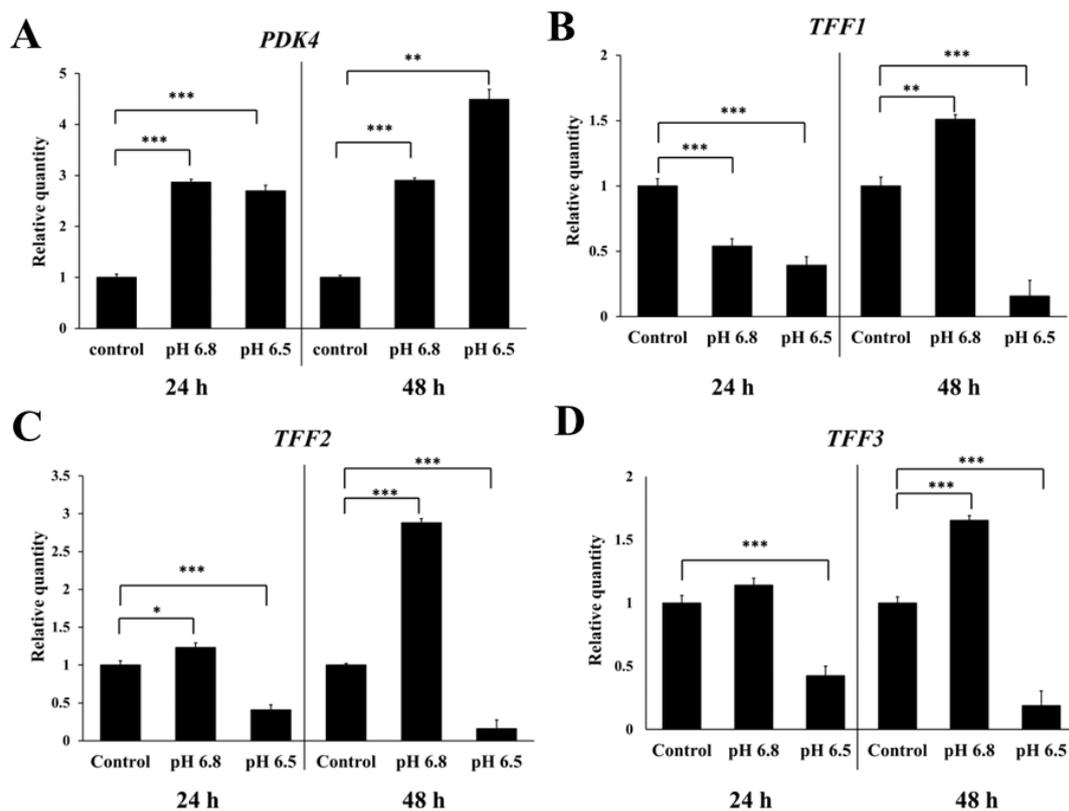


Figure 9. Effect of acidic medium supplemented with acetic acid (CH_3COOH) on *TFF* expression. We cultured DLD-1 cells under acidic conditions (pH 6.5 and 6.8) for 24 and 48 h. Acidic pH was adjusted using CH_3COOH . Cells cultured at pH 7.4 for 24 and 48 h were used as a control when performing relative quantification with real-time RT-qPCR. Subsequently, P-values were calculated using relative quantification values through one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.0001$). Each assay was performed in quadruplicate. Error bars indicated mean standard error (*SE*).

2-5. 酸性 pH が DLD-1 細胞以外の細胞株において *TFF2* 遺伝子発現に与える影響

DLD-1 細胞以外の他の細胞種ではどのように変化するかを調べるために以下の実験を行った。Caco-2、HeLa、HepG2 細胞における *TFF2* の mRNA 発現を酸性条件下

で評価した。酸性 pH の調整は HEPES を用いて行った。*PDK4* (Fig.10A) および *TFF2* (Fig.10B) は、pH6.8、pH6.5 の両条件で、いずれの細胞株において有意に発現が増加した (**P < 0.01 および ***P < 0.0001)。しかし、HeLa 細胞においては、pH6.8 では *TFF2* と *PDK4* ともに有意な発現増加が見られたが、pH 6.5 では *TFF2* の mRNA 発現は増加が見られたものの、*PDK4* の発現上昇はほとんどみられなかった。これは HeLa 細胞を pH6.5 で培養すると、増殖せずに死滅していくことと関連があると考えられる [41]。

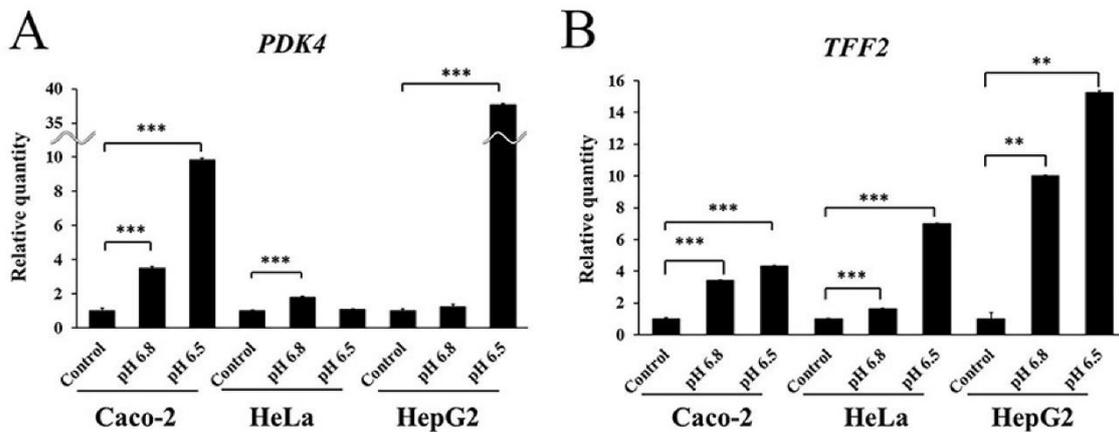


Figure 10. Effect of acidic medium on *TFF2* mRNA level in other cell lines. Cells were cultured for 48 h in medium with pH of 6.5 and 6.8 (HEPES). *TFF2* mRNA level at pH 7.4 was used as a control for relative quantification. P-values were calculated using relative quantification values via one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test. *GAPDH* was used as an endogenous control. (A) Comparison of *PDK4* expression in Caco-2 colon cancer, HeLa cervical carcinoma and HepG2 hepatocellular carcinoma cells cultured in acidic media and in each cell cultured at pH 7.4 for 48 h as a control (***)P<0.0001). (B) Comparison of *TFF2* expression in Caco-2, HeLa, and HepG2 cells cultured in acidic media and in each cell cultured at pH 7.4 for 48 h as a control (**P<0.01,

***P<0.0001). Each assay was performed in quadruplicate. Data are presented as the mean \pm standard error. *TFF2*, trefoil factor 2; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *PDK4*, pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4.

2-6. 酸性 pH が TFF2 タンパク質発現に与える影響

次に、タンパク質の発現を確認した。DLD-1 及び Caco-2 細胞を用いて酸性培地曝露における TFF2 タンパク質の発現を免疫組織化学染色により検討した。陽性コントロールは、発現プラスミド *pcDNA 3.1 -/c-(K)-DYK-TFF2* で一時的にトランスフェクションした DLD-1 細胞 (hTFF2 細胞) を用いた。抗体を用いた特異的な染色により TFF2 タンパク質の発現は確認することができた (Fig.11)。

今回すべての免疫組織化学実験では同じロットの一次抗体 (TFF2) を使用して実施した。pH 7.4 で培養したトランスフェクトされていない DLD-1 及び Caco-2 細胞では TFF2 の発現は確認されなかった (Fig.12Ab,Bb, pH7.4)。抗体特異性を検討するために行った、一次抗体抗 TFF2 抗体を除いた条件では、中性および酸性条件下でも染色されなかった (Fig.12Aa,Ba)。対照的に、酸性条件下で培養された一部の DLD-1 および Caco-2 では TFF2 のタンパク質発現がみられた (Fig.12Ab,Bb, pH6.5)。DAB 染色の定量化では、TFF2 の発現は pH 7.4 より pH 6.5 において有意に増加することが分かった (Fig.12Ac,Bc)。

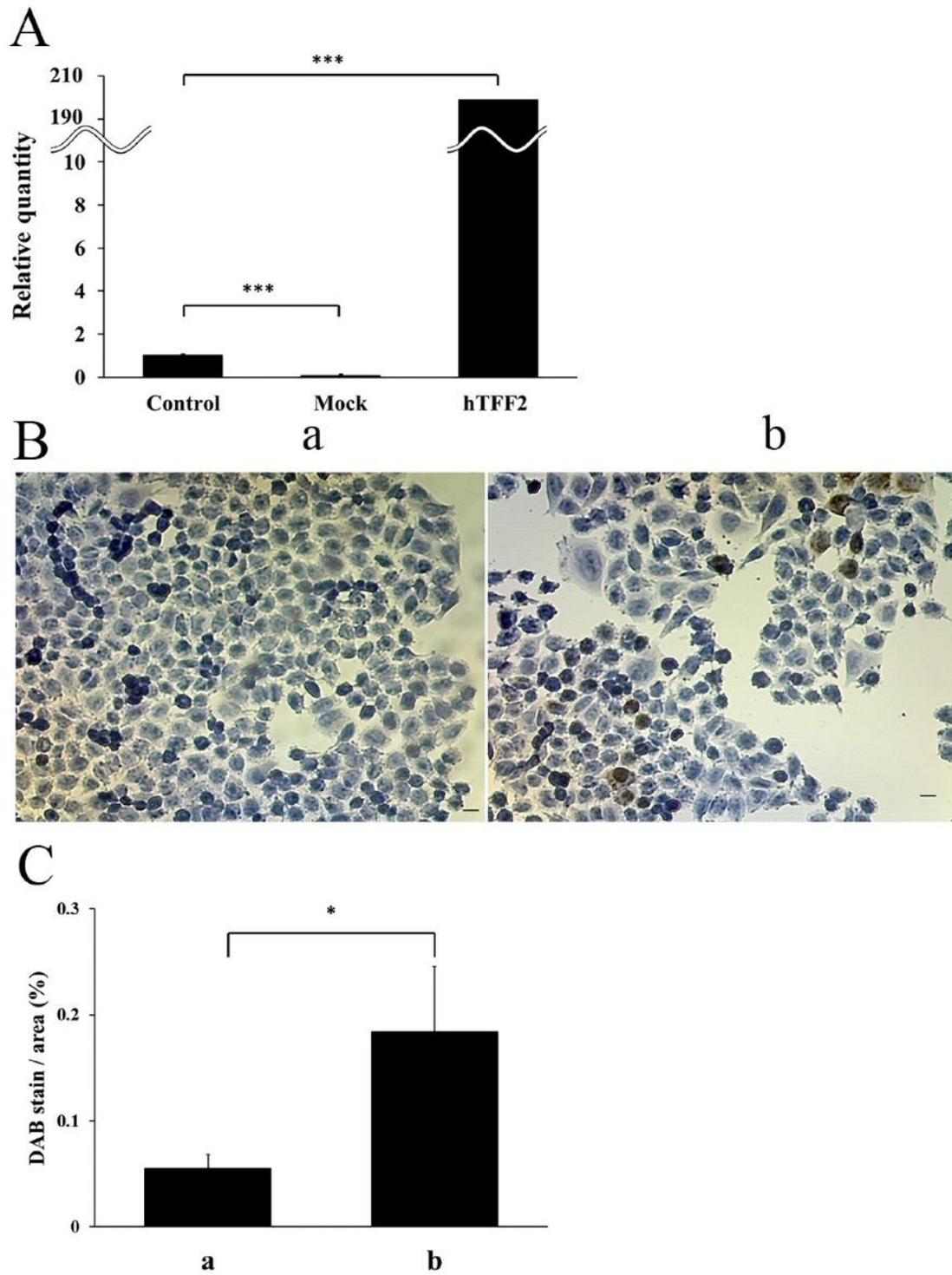


Figure 11. Validation of immunostaining with the TFF2 antibody. Immunostaining with TFF2 antibody was performed using transiently transfecting DLD-1 cells with *pcDNA 3.1-/c-(K)-DYK-TFF2* (hTFF2 cells). Additionally, mock cells were prepared by transiently

transfecting DLD-1 cells with *pcDNA 3.1-/c-(K)-DYK* (empty vector). P-values were calculated using relative quantification values via the nonparametric Mann-Whitney U test. (A) Relative comparisons using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction were shown; *TFF2* expression in untransfected DLD-1 cells served as a control for relative quantification, with *GAPDH* as the reference gene. Each assay was conducted in quadruplicate, and the bar and error bar represent the mean and standard error (SE), respectively. (B) Immunohistochemistry against TFF2 (TFF2 expression in transfected DLD-1 cells and untransfected DLD-1 cells.). (a) To mitigate false positives or nonspecific binding, the primary antibodies were omitted and considered them as negative controls. (b) Images of DLD-1 cells in the presence of the TFF2 primary antibody. Cells were observed under x100 magnification (scale bar=10 μ m). (C) Quantification of TFF2-specific DAB staining of (B). (a) and (b) refer to those shown in (B). Quantification of DAB staining was performed using the ImageJ software, utilizing images from four different fields of view (*P<0.05). TFF2, trefoil factor 2.

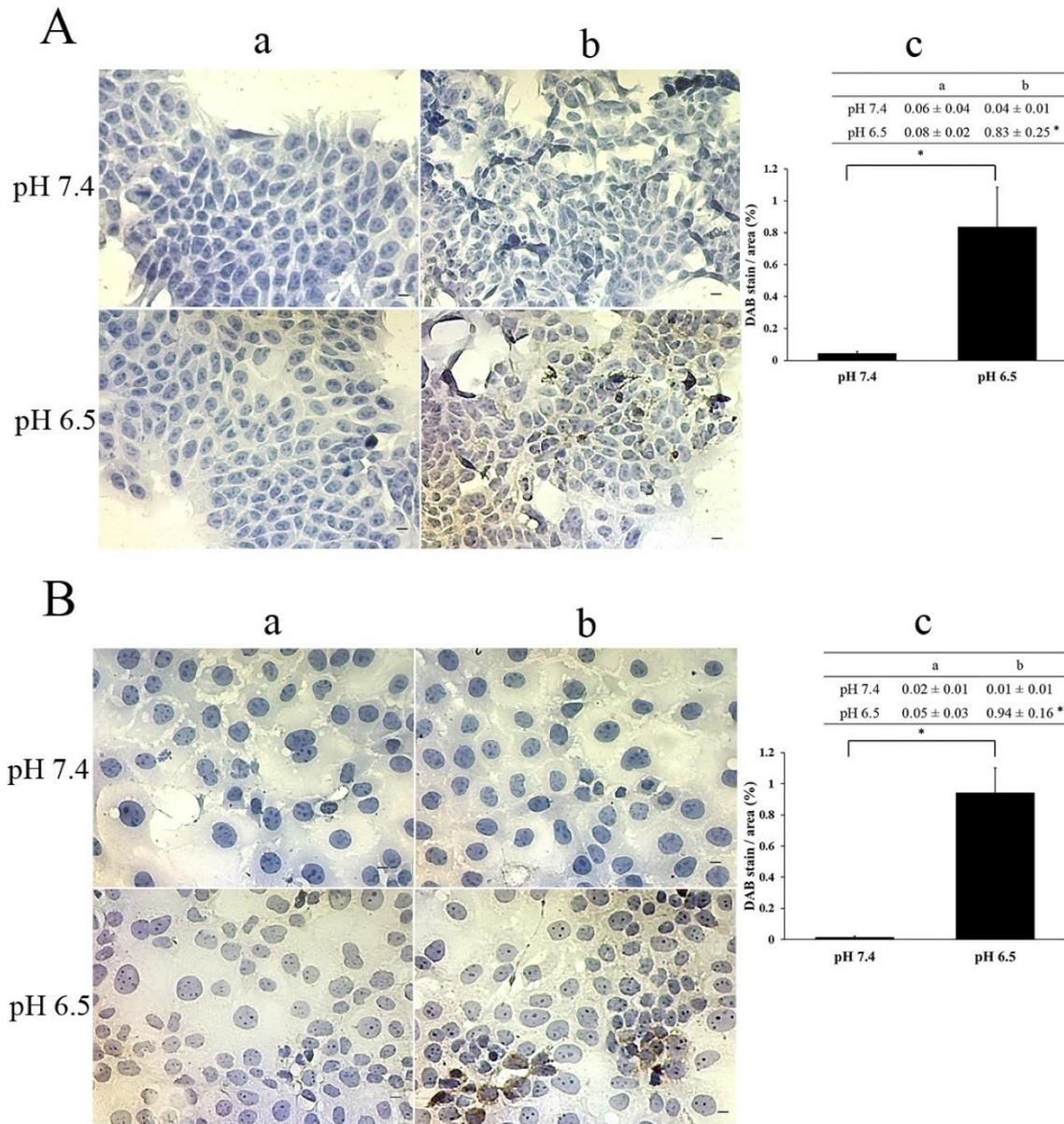


Figure 12. TFF2 immunohistochemistry staining of DLD-1 colon cancer and Caco-2 colon cancer cells. (A) DLD-1 cells and (B) Caco-2 cells. Cells were cultured under normal pH (pH 7.4) and acidic medium (pH 6.5 with HEPES). Images show immunohistochemically stained cells with TFF2 primary antibody (b) or without primary TFF2 as negative control (a). Under $\times 100$ magnification microscope observation (scale bar=10 μm). (c) Quantification of TFF2 specific DAB staining was performed using ImageJ software (mean \pm standard error; n=4).

*P<0.05 (nonparametric Mann-Whitney U test).

3. 考察

本章では、ヒト結腸腺がん由来 DLD-1 細胞において、*TFF2* 遺伝子やタンパク質が酸性条件下で誘導されることを明らかにした。酸性 pH による *TFF2* の誘導は、同じくヒト結腸腺がん由来細胞である Caco-2 細胞でも認められた。この結果より、ヒト腸管の正常組織では発現が認められない *TFF2* が、腸管腫瘍において発現が確認されるのは、がん微小環境として酸性条件が形成されることによる可能性があると考えられる。興味深いことに、培養温度の変化は *TFF2* の mRNA 発現に大きな影響を与えなかった。逆に、*TFF1* と *TFF3* mRNA は温度変化に応じて発現がわずかに変化したことから、*TFF1* と *TFF3* とは異なる発現メカニズムが *TFF2* の mRNA 発現を促進していることが示唆された。

TFF1、*TFF2*、*TFF3* は同一染色体上にあり、遺伝子座は近接しているが、それぞれ独立した遺伝子である。*TFF1* と *TFF3* はそれぞれ 1 つのトレフォイル因子ドメインを持ちヘテロ二量体を形成するのに対し、*TFF2* は 2 つの TFF ドメインを持ちムチン MUC6 と共存する [42]。乳がん患者の血清中の *TFF1* と *TFF3* のタンパク質発現は健常者よりも有意に高いのに対し、*TFF2* のタンパク質レベルは有意に低い [8]。悪性度の高い腫瘍、特に乳がんの腫瘍の内部は正常組織よりも高温を示すことが報告されている [43]。また、乳がん患者では血清中の *TFF1* と *TFF3* のレベルが上昇すると *TFF2* の発現が抑制されるメカニズムが示された[8]。これらの報告は我々の研究結果を裏付けるものであり、*TFF2* の発現制御の根底にあるメカニズムは *TFF1* と *TFF3* のそれとは異なることを示している。

酸性培地で培養した DLD-1 細胞では *TFF2* の発現が有意に増加していることが明らかになった。この傾向は Caco-2、HeLa、HepG2 細胞でも観察された。恒常的に脂肪酸を代謝する HepG2 細胞では、*PDK4* の発現は pH 6.5 で有意に増加したが、pH 6.8 での発現はコントロール群と同様であった。逆に、*TFF2* の発現は酸性環境に依存してお

り、pH 6.8 でその発現が著しく上昇した。遺伝子発現の閾値は細胞によって異なり、一部の細胞タイプは pH に依存しない可能性がある。これは、さまざまな組織の細胞膜成分の違いによる可能性が考えられる [44]。

いくつかの臨床報告では、ヒトの大腸がんで *TFF2* の発現が増加したことが詳述されている [45,46]。培養細胞における *TFF2* の mRNA 発現は、HEPES だけでなく、塩酸を含む酸性培地でも誘導されたが、*TFF1* や *TFF3* の mRNA 発現は誘導されなかった。一方で、酢酸を含む酸性培地では、*TFF* の mRNA 発現誘導は確認されなかった。酢酸は酪酸やプロピオン酸などを含む短鎖脂肪酸であり、腸内細菌からも産生されている。細胞外に存在する酢酸の影響により通常よりも pH が下がりすぎる状況では、*TFF* の転写は抑制されているのかもしれない。大腸がんの細胞株 (HT-29 細胞、HCT116 細胞) において、酢酸を含む短鎖脂肪酸がアポトーシスを誘導するとの報告があり、*TFF* の発現応答が妨げられたことも考えられる [47,48]。

今回の結果より、酸性環境が *TFF2* の発現を誘導することが明らかになった。*TFF2* の発現増加が腫瘍の発達を促進するか阻害するかは長年不明であった [7,9]。*TFF2* の発現は、正常細胞とがん細胞のいずれにおいても酸性環境下で誘導される可能性が高いと思われる。腫瘍内における *TFF2* の高発現は、TME における低 pH が引き金となっており、腫瘍内環境の悪性を示す一つの指標となる可能性があることが示唆された。

4. 小括

本章では、培養条件の違いによる TFF の mRNA とタンパク質発現への影響について検討を行い、以下の知見を得た。

- 1) 高温培養条件は、DLD-1 細胞において *TFF1* と *TFF3* の mRNA 発現誘導に変化をあたえたが、*TFF2* の mRNA 発現誘導には関与しなかった。
- 2) DLD-1 細胞において、酸性 pH (HEPES による調整) は *TFF2* の mRNA とタンパク質発現を誘導した。
- 3) DLD-1 細胞において、酸性 pH (塩酸による調整) は *TFF2* の mRNA 発現を誘導した。
- 4) DLD-1 細胞に加えて、酸性培地による *TFF2* の mRNA 発現は Caco-2、HeLa、HepG2 細胞においても誘導され、*TFF2* のタンパク質発現は、Caco-2 細胞においても誘導されることが確認できた。

第 2 章

酸性培地および、TFF2 を含む条件培地が DLD-1 細胞の mRNA の発現に与える影響

腫瘍微小環境が細胞の遺伝子発現に大きく影響を及ぼしていることから、酸性培地により DLD-1 細胞の遺伝子発現がどのように変化したのかを明らかにすることを目的に、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。また、分泌タンパク質である TFF2 タンパク質の機能を調べるために、過去に当研究室で作製したマウスの腸管腫瘍からクローニングした *Trefoil factor 2 (TFF2)* 遺伝子を DLD-1 細胞に安定発現させた細胞株の培養上清を用いて、分泌された TFF2 タンパク質が DLD-1 細胞の遺伝子発現にどのような影響を及ぼしているのかについても同様に解析を行った。遺伝子の発現変動の解析には、生物学的機能を注釈するツールの Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID; <https://david.ncifcrf.gov/>) を用い、パスウェイ解析には Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>) Pathway を用いた。

1. 実験材料及び実験方法

1-1. 細胞及び継代

本研究に使用した細胞株は以下の通りである。ヒト結腸腺がん由来細胞 DLD-1 (American Type Culture Collection [ATCC] CCL 221, ATCC, Manassas, VA, USA) を用いた。培地は、10% ウシ血清由来アルブミン (以下 FBS、Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) 、ペニシリン (10,000 U/mL)/ストレプトマイシン (10,000 µg/mL) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) (終濃度が 1% となるように添加、以下 1%PC/SM) を添加した RPMI GlutaMax Medium 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。以前当研究室において作製されたマウスの *TFF2* 遺伝子を pEGFP-N3 ベクターにクローニングしたものを安定発現している DLD-1 細胞 (以下、*mTFF2* 細胞とする) は、10% FBS、1% PC/SM を添加した RPMI GlutaMax Medium 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) に、800 µg/mL G418 を加えたものを使用した [49,50]。それぞれ、37°C の加湿型、5% CO₂ 条件下で培養し、継代は 70% コンフルエント直前に PBS で洗浄後、トリプシン-EDTA 溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で細胞を剥離し、適当な細胞密度になるように培地に懸濁した。

1-2. マイクロアレイに用いた試料

Opti-MEM 培養液 (低血清培地, pH 7.4 : MEM 含有の FBS が 50% 削減された) (Thermo Fisher Scientific) と、Opti-MEM 培養液に緩衝剤である HEPES を添加した酸性培地 (pH 6.5、pH 6.8) を準備し、DLD-1 細胞をそれぞれ培養した。播種した細胞数は、6 ウェルシャーレ (Thermo Fisher Scientific) に 2.0×10^5 cells/well になるように調製した。5% CO₂ インキュベーターで 48 時間培養後、細胞を回収し RNA 抽出を行った。

た。マイクロアレイ解析時には、Opti-MEM 培養液 (pH 7.4) で培養した DLD-1 細胞をコントロールとした (Fig.13)。

次に、TFF2 を含む条件培地 (mTFF2 細胞を Opti-MEM 培地で培養した時の上清) と、コントロール条件培地 (DLD-1 細胞を通常 pH7.4 の Opti-MEM 培地で培養したときの上清) の 2 つを準備するために、75 cm² フラスコ (Thermo Fisher Scientific) に mTFF2 細胞と DLD-1 細胞それぞれを 8.4×10^6 cells になるように調製後、これらを Opti-MEM 培地でそれぞれ 24 時間 5% CO₂ インキュベーターで培養した。その後、それぞれの細胞の培養上清を回収したものを各条件培地とした。100 mm シャーレ (Thermo Fisher Scientific) に播種された DLD-1 細胞 (6×10^5 cells) をこの 2 つの条件培地を用いてそれぞれ培養した。これら条件培地で培養された各 DLD-1 細胞を 5% CO₂ インキュベーターで 48 時間培養後、細胞を回収し RNA 抽出を行った (Fig.14)。これらの操作は 3 回繰り返した。

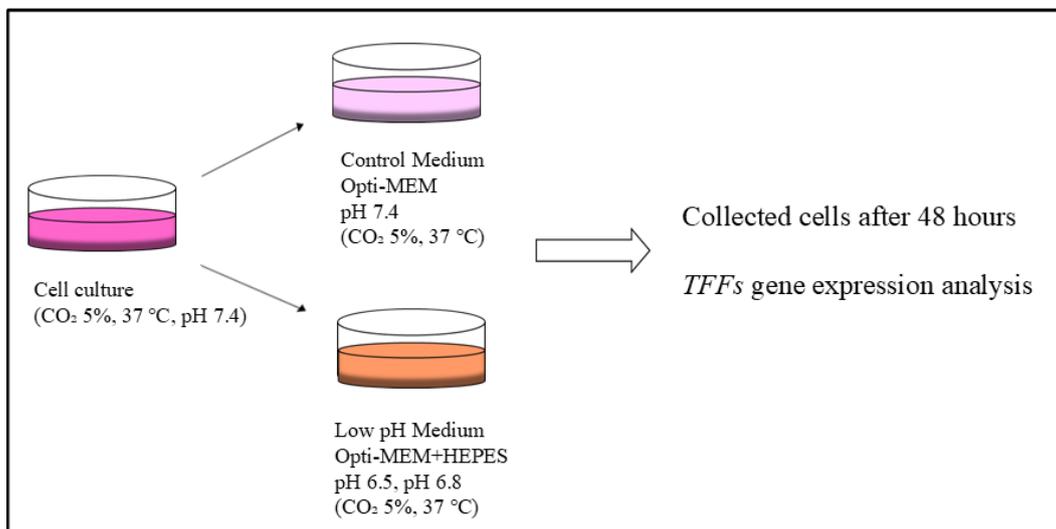


Figure 13. The acidic medium was adjusted with HEPES. DLD-1 cells were seeded onto 6-well plates (Thermo Fisher Scientific) at a density of 2.0×10^5 cells/well. We prepared pH 6.5 and pH 6.8 acidic medium by adding 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

(HEPES) (Dojindo; PJ072, Osaka, Japan) to Opti-MEM medium which was used to reduce protein denaturation.

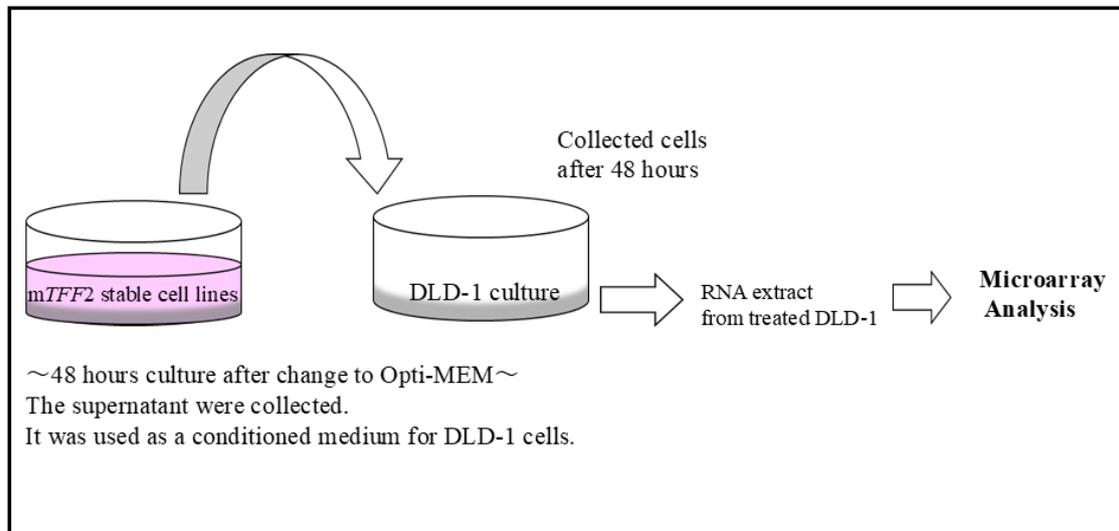


Figure 14. DLD-1 cells were cultured with Opti-MEM medium containing TFF2 protein.

DLD-1 cells stably expressing mTFF2-GFP protein were cultured with Opti-MEM medium (pH7.4) for 48 h, and culture supernatant containing secreted TFF2 protein was collected and used as conditioned medium. Conditioned medium using DLD-1 cells which was not expressing mTFF2 was used as control conditioned medium. Each of the conditioned mediums was used for culturing of DLD-1 cells to examine the effect of secreted TFF2 protein contained in the conditioned medium on mRNA expression. mRNA expression was tested by Microarray analysis.

1-3. RNA 抽出

RNA 抽出は、TRIZOL™ 試薬で細胞を回収後、クロロホルム処理をし、エタノール沈殿により核酸ペレットを獲得した。DEPC 水に溶解した沈殿物を DNase 処理し、フ

エノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿により RNA を獲得した。RNA の純度は、Nanodrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE USA) 上の 260/280 nm および 260/230 nm 吸光比を使用して評価した。

1-4. ウエスタンブロッティングによる検出

mTFF2 細胞中と培養上清中に分泌された TFF2 タンパク質の発現を確認するために、次の方法でサンプルを準備した。細胞 (3×10^5 cells/well) を 6-well 培養プレート (Thermo Fisher Scientific) に播種し、細胞の定着を確認した翌日、培地を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に交換し、その後 48 時間後に 2 ウェルから細胞と培養上清を回収した。培養細胞からのタンパク質抽出は、タンパク質阻害剤 (Merck Millipore Ltd, Darmstadt, Germany) を添加した RIPA Lysis バッファー (Santa Cruz biotechnology., Dallas, TX, USA) により行った。培養上清は、冷却したアセトン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) (サンプルを含む 4 倍量) と混和後、 -30°C で 2 時間以上一晩まで十分に反応させた。4000 rpm、 4°C で 20 分間の遠心分離を行い、上澄みを除去し、アセトンを蒸発させた後に RIPA Lysis バッファー (200 μL) (Santa Cruz biotechnology., Dallas, TX, USA) に溶解した。抽出したタンパク質は、 $4 \times$ Sample Buffer (277.8mM Tris, 4.4% SDS, 44.4% Glycerol, 0.02% Bromophenol Blue, pH 6.8) に 2-メルカプトエタノール (2-ME) を添加し可溶化後、5%-20% SDS-ポリアクリルアミドゲル (ATTO CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて、20 mA 固定でおよそ 1 時間泳動した。一次抗体として抗 TFF2 (1:500; Proteintech Group Inc., Rosemont, IL, USA)、抗 GFP 抗体 (1:200; 長崎国際大学薬学部分子生物学研究室田中宏光先生より授与) を用いて 4°C で一晩反応させた。二次抗体は、HRP (Horseradish peroxidase) 標識された抗 rabbit 抗体 (1:2000; Dako, California, USA) または抗 rat 抗体 (1:2000; Dako, California, USA) を用い

で室温 (25°C) で1時間インキュベートした。全ての抗体は1%スキムミルクで希釈した。検出は、ELC 検出キット (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて発光を確認し、ChemiDoc Touch イメージングシステム (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) で撮影した。

1-5. マイクロアレイ解析

マイクロアレイによる遺伝子発現解析は、株式会社セルイノベーター (福岡県、日本) に外部委託した。アジレントが推奨する下記の手順で実施された。アレイにスポットされたオリゴは、60K Agilent 60-mer oligo が用いられた。標識試薬は Low Input Quick Amp Labeling Kit を使用し、マイクロアレイチップは SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray 8×60K を使用した。ハイブリダイズされたマイクロアレイスライドはすべて Agilent 社のマイクロアレイスキャナでスキャンされた。相対的なハイブリダイゼーション強度とバックグラウンドハイブリダイゼーション値の両方は、Agilent Feature Extraction Software (9.5.1.1) を用いて算出された。

1-6. データ解析とフィルター基準

マイクロアレイデータの解析は、宮原ら [51] の方法に従い、各プローブの Raw (中央値) と フラグを算出し、それぞれ Z スコアを算出した。Z スコアとは、標準スコアと言われ、生スコアの値が測定されているものの平均値より上回るか下回るか標準偏差 (SD) の数である。評価方法としては、アップレギュレーション遺伝子と見なされるのが Z スコア ≥ 2.0 、比率 $\geq 1.5x$ の場合、またダウンレギュレーション遺伝

子が見なされるのが Z スコア ≤ -2.0 、比率 ≤ 0.66 の場合で設定された。

1-7. Gene Ontology (GO) 分析及びパスウェイ解析

マイクロアレイの結果をもとに、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; <https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて、Gene Ontology (GO) 解析と遺伝子パスウェイ解析により発現遺伝子を機能群別に分類した。Gene Ontology (GO)解析は、Biological Process (生物学的プロセス)、Cellular Component (細胞構成) 及びMolecular Function (分子機能) の3種類に分類される。今回 GO エンリッチメント解析を用いた。これは、遺伝子全体のうち特定の GO でアノテーションされた遺伝子の割合と、発現変動遺伝子のうち特定の GO でアノテーションされた遺伝子の割合を計算し、その割合を比べることによって、その GO が発現変動遺伝子の中で有意に多く観測できるか (エンリッチしているか) どうかを検定することである。パスウェイ解析は、分子間ネットワークに関する情報を統合したデータベースである Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway を用いて解析した。

2. 実験結果

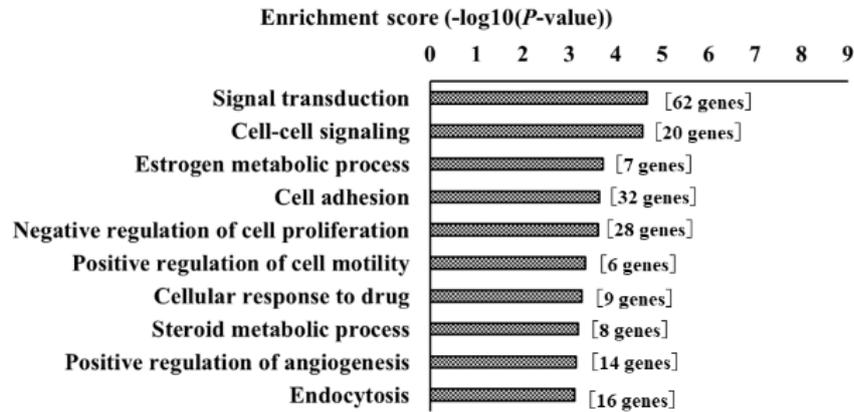
2.1. 酸性条件下における DLD-1 細胞の発現遺伝子の GO 解析

pH 7.4 で 48 時間培養したコントロール DLD-1 細胞と pH6.5/pH6.8 でそれぞれ 48 時間培養した DLD-1 細胞における遺伝子発現を比較し、pH6.5/pH6.8 で発現が有意に上昇している遺伝子群について検討した。pH 6.5 と pH 6.8 の培養条件下において発現量が変動していた遺伝子群のほとんどは共通していることがわかった。とくに pH 6.5 においては、有意な遺伝子変動が多く見られた。マイクロアレイ解析の結果、51680 個

の遺伝子の中から 916 個の遺伝子について有意な発現の上昇が見られた。その中で 706 個の遺伝子に DAVID に登録されている遺伝子 ID がヒットし、個々の遺伝子に割り当てられたに注釈 (アノテーション) 情報は 577 個同定された。GO 解析の生物学的プロセス (BP) では Signal transduction、Cell-cell signaling 及び Estrogen metabolic (Fig.15A)、分子構成 (CC)では Plasma membrane、Extracellular exosome 及び Cell surface (Fig.15B)、分子機能 (MF)では Scavenger receptor activity、Aldo-keto reductase (NADP) activity 及び Estrogen 16-alpha-hydroxylase activity などの遺伝子発現の亢進が見られた (Fig. 15C)。さらにマイクロアレイの結果から、遺伝子発現が有意に上昇した遺伝子群を GO 解析して得られた結果から有意な P 値を求めた結果、N-linked glycans、Glycoprotein 及び integral component of plasma membrane の遺伝子発現が有意に変化していること明らかとなった (Fig.16)。酸性条件下で発現量が有意に上昇した遺伝子群の中には、*TFF2* 遺伝子も含まれており、GO 解析では Disulfide bond、Signal に分類されていた。

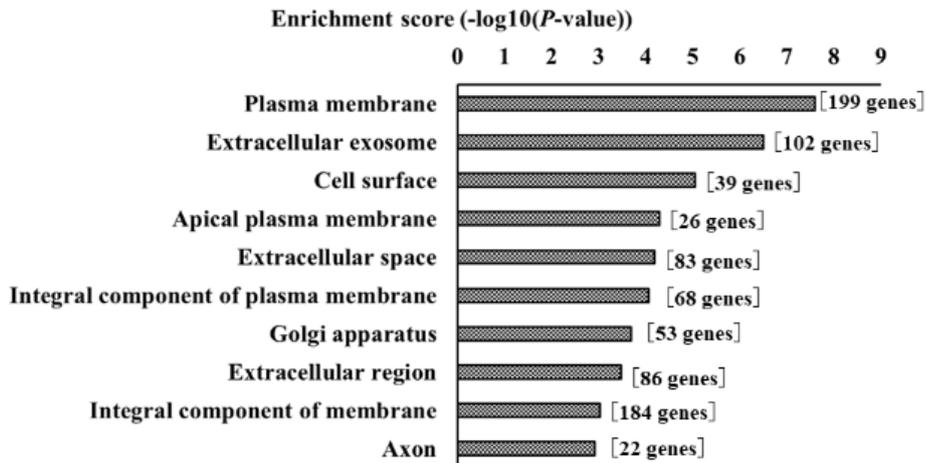
A

Biological process



B

Cell component



C

Molecular Function

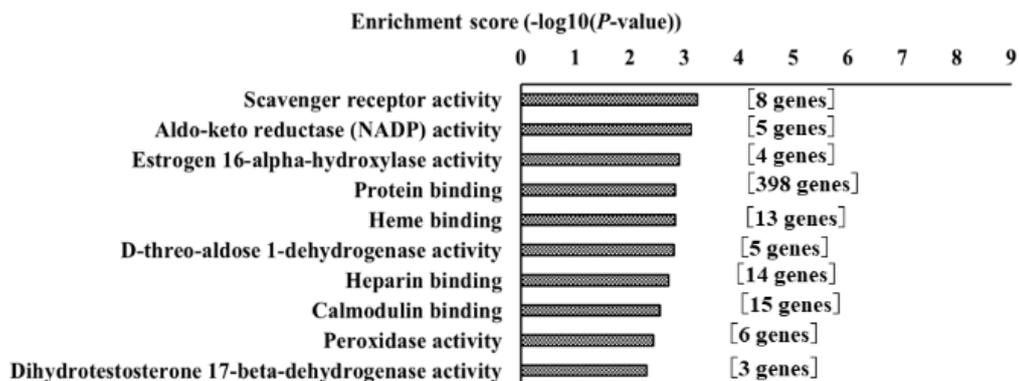


Figure 15. Alterations in gene expression in DLD-1 cells cultured in acidic medium (pH 6.5). The top ten enriched items were obtained from biological process, cellular components and molecular function analysis of GO analyses in acidic medium (pH 6.5) with differential expression.

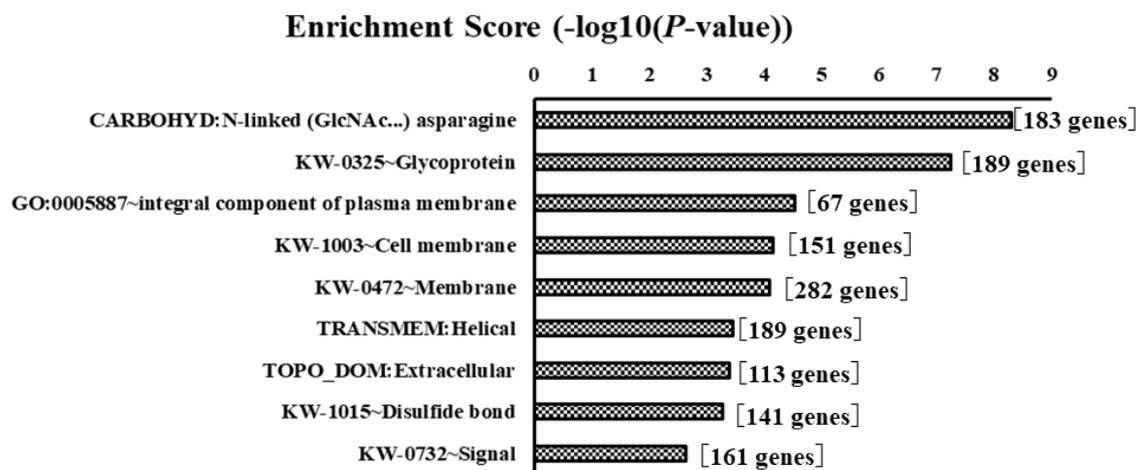


Figure 16. Alterations in gene expression in DLD-1 cells cultured in acidic medium (pH 6.5). The genes that were significantly up-regulated in the microarray analysis were analyzed by Gene Ontology with DAVID. The top 10 terms were selected by of enrichment score.

2.2. 酸性条件下での DLD-1 細胞の発現遺伝子のパスウェイ解析

GO 解析で得られた機能群から、その機能群がどのような分子間ネットワークのつながりがあるのか調べるために KEGG 解析を行った。pH 6.5 の培養液で培養された DLD-1 細胞において、pH 7.4 のときと比べて発現が有意に上昇した遺伝子群を KEGG Pathway で解析した。その結果、Steroid hormone biosynthesis、Protein digestion and absorption 及び cGMP-PKG signaling pathway などの経路が変動していることがわかった (Fig.17)。

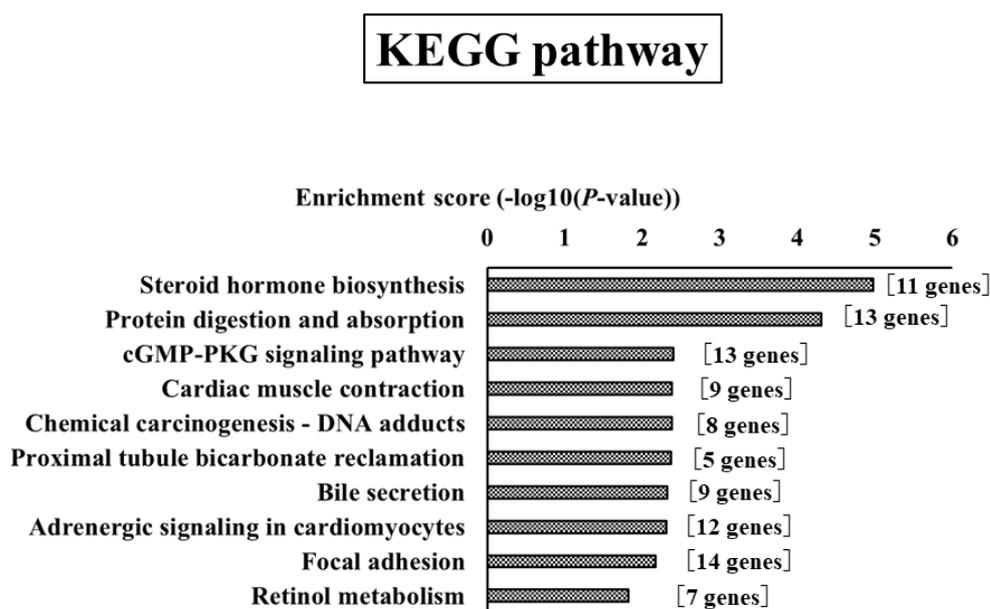


Figure 17. KEGG pathway analysis of expressed genes in DLD-1 cells cultured in acidic medium (pH 6.5). The top ten enriched pathways were identified in KEGG analysis under acidic medium (pH 6.5) with differential expression.

2.3. TFF2 を含む条件培地下における DLD-1 細胞の発現遺伝子の GO 解析

mTFF2 細胞の培養上清のサンプルにおいて、ウエスタンブロッティングにより TFF2 タンパク質の発現の確認を試みたところ、培養上清中に、mTFF2 が分泌されていることを確認することができた (Fig.18)。mTFF2 細胞が産生する TFF2 は、GFP との融合タンパク質として約 42kDa のタンパク質として分泌されると予想される。Fig.18 により、培養上清には抗 TFF2 抗体、あるいは抗 GFP 抗体により 42kDa から 52kDa の、複数のバンドが検出された。「緒言」で述べたように TFF2 は翻訳後の糖鎖修飾により 8-10kDa 程度の大きなバンドとして検出されることが報告されており [15]、42kDa から 52kDa のバンド群は、mTFF2-GFP の融合タンパク質であり、mTFF2 は培養上清に分泌されていることが確認された。次に mTFF2 を含む条件培地と mTFF2 を含まないコントロール条件培地を準備し、これらの条件培地で DLD-1 細胞をそれぞれ 48 時間培養し、細胞を回収してマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。2 つの条件培地で培養した DLD-1 細胞における遺伝子発現を比較した結果、51680 個の遺伝子の中から 557 個の遺伝子が、mTFF2 を含む条件培地を用いた場合に有意な発現上昇をしていることが分かった。その中で 357 個に DAVID の遺伝子 ID がヒットし、チャートによるアノテーションは 154 個同定された。TFF2 を含む条件培地により DLD-1 細胞の遺伝子発現が亢進したのは、生物学的プロセス (BP) では Lipid hydroxylation、Retinol metabolic process 及び、Cellular response to cAMP (Fig.19A)、分子構成 (CC) では Plasma membrane、Cell surface 及び Extracellular region (Fig.19B)、分子機能 (MF) では Actin binding、Estrogen 16 alpha-hydroxylase 及び Actin filament binding などであった (Fig.19C)。さらに発現が有意に変動した遺伝子群全体で GO 解析を行い、有意な P 値を示したものは、上位から Fibronectin type-III3、Plasma membrane 及び Actin binding に関連する遺伝子が増加したことが明らかとなった (Fig.20)。特に、Fibronectin type-III domain-containing protein 3B (FNDC3B) や Fibronectin type-III domain-

containing protein 5 (FNDC5) は、マイクロアレイの生データの結果においても有意に発現が上昇していることが明らかとなった。

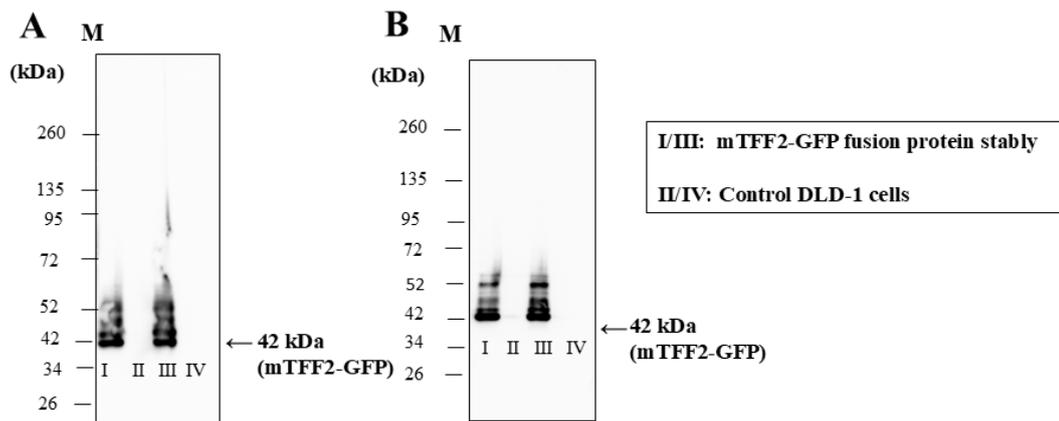


Figure 18. Secretion of mTFF2-GFP fusion from mTFF2 stably expressing DLD-1 cells.

Culture supernatant of DLD-1 cells expressing 42kDa mTFF2-GFP fusion protein stably (lane I and III) that of control DLD-1 cells (lane II and IV) were carried out for Western blotting using anti-TFF2 antibody or anti-GFP antibody. TFF2, Trefoil Factor 2; GFP, green fluorescent protein.

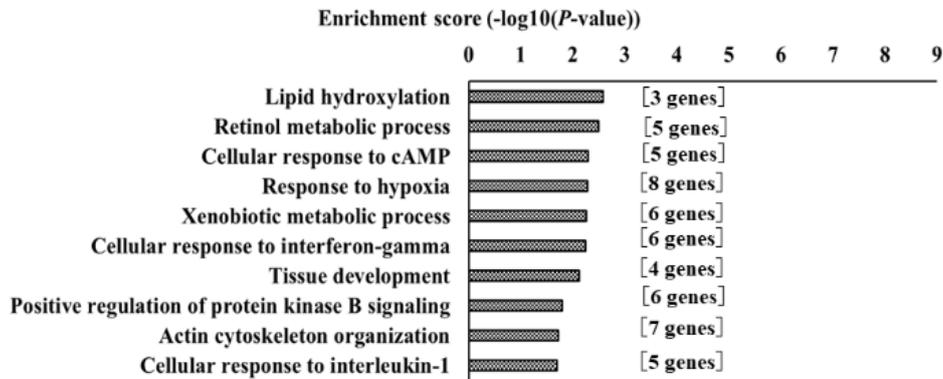
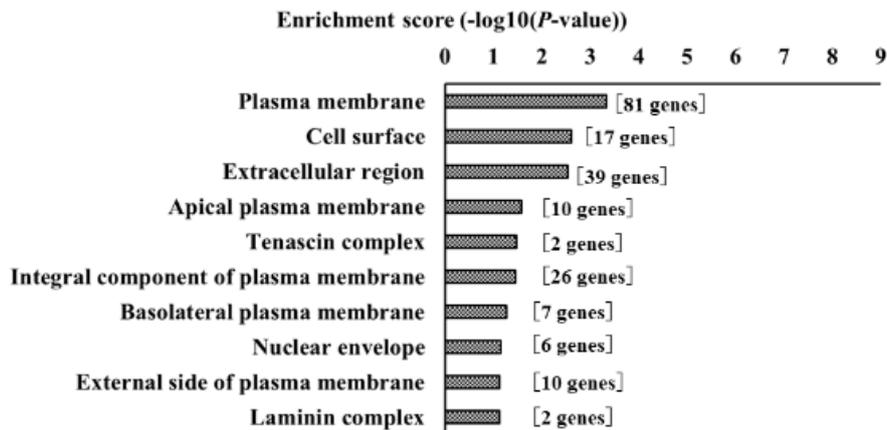
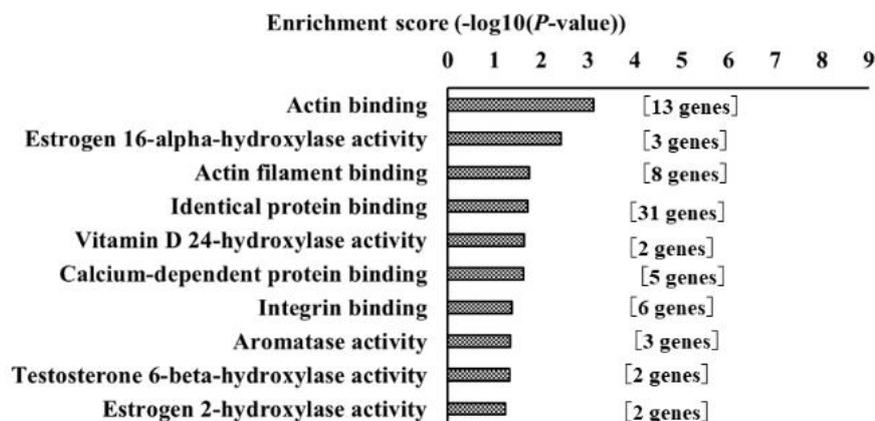
A**Biological process****B****Cell component****C****Molecular Function**

Figure 19. Gene ontology analyses on genes upregulated in DLD-1 cells by mTFF2-containing conditioned medium. Microarray analyses and following GO analyses were carried out on mRNAs from DLD-1 cells cultured 48 h in mTFF2-containing conditioned medium and those in its negative-control conditioned medium. The top ten enriched items by TFF2-containing conditioned medium on GO analyses of biological process, cellular components and molecular function were shown.

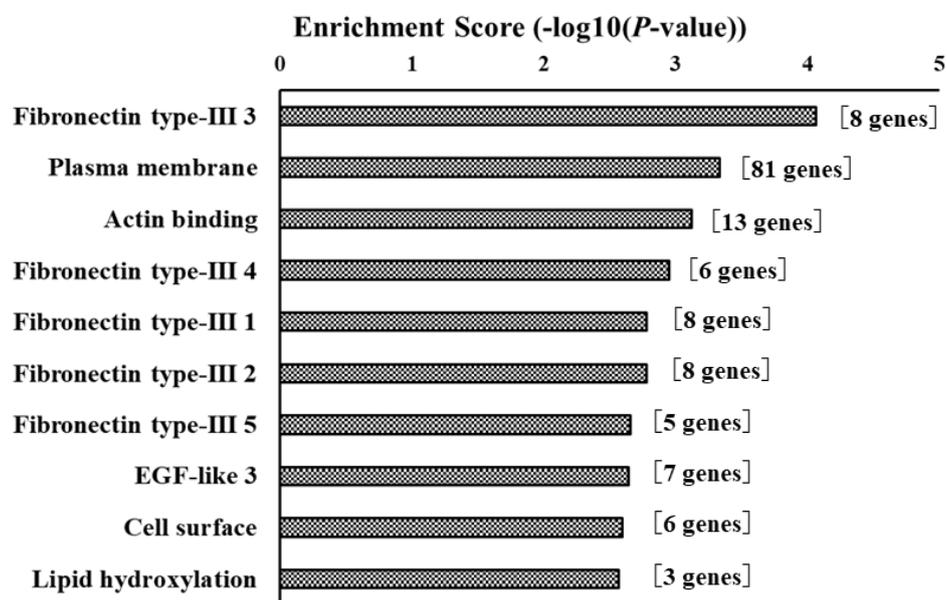


Figure 20. Up-regulated gene groups in DLD-1 cells cultured in mTFF2-containing conditioned medium. Microarray analyses and following GO analyses were carried out on as described in Figure 19 legend. Changes in gene expression in DLD-1 cells were comprehensively analyzed. The top 10 Gene Ontology terms are listed in order of enrichment score.

2.4. TFF2 を含む条件培地下における DLD-1 細胞の発現遺伝子パスウェイ解析

TFF2 を含む条件培地により、DLD-1 細胞において発現が上昇した遺伝子群を用いて KEGG Pathway 解析したところ、上位から ECM-receptor interaction、Steroid hormone biosynthesis 及び PI3K-Akt signaling pathway などの遺伝子群の変化が見られた (Fig.21)。

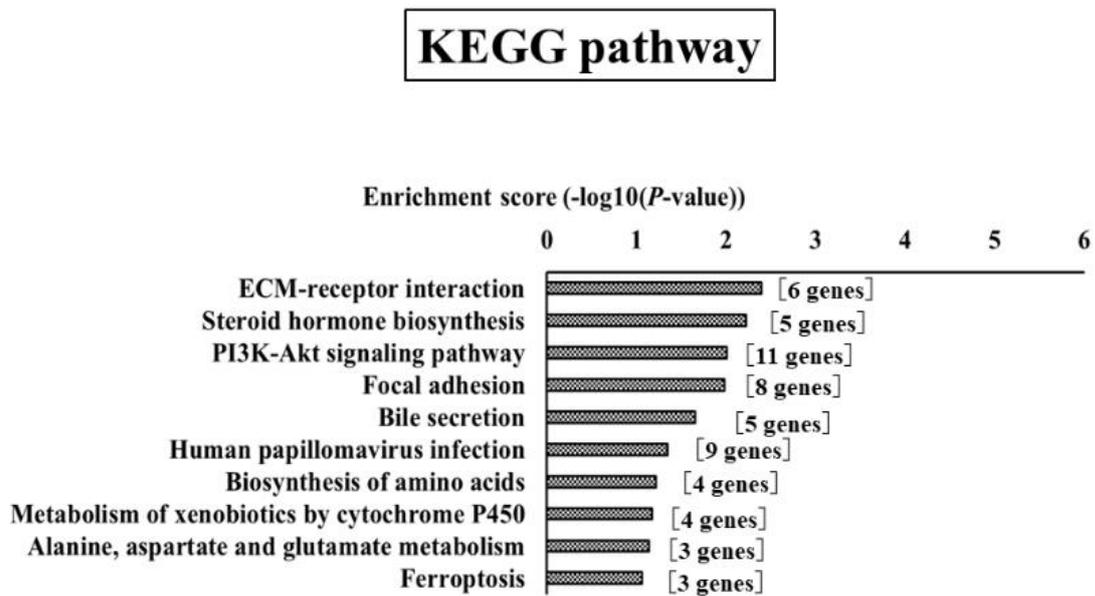


Figure 21. KEGG pathway analysis on upregulated genes in DLD-1 cells cultured in TFF2-containing conditioned medium. KEGG pathway analyses were carried out for upregulated mRNA by TFF2-containing conditioned medium revealed on microarray analyses. The top ten enriched pathways were shown.

3. 考察

本章では酸性培地で培養した DLD-1 細胞、及び TFF2 を含む条件培地で培養した DLD-1 細胞の遺伝子発現変動を調べる目的でマイクロアレイ解析を行い、DAVID による GO 解析やパスウェイ解析により、変動した遺伝子群を可視化した。酸性培地と TFF2 を含む条件培地では、共通して亢進する遺伝子群が存在した。これらの遺伝子には、酸性条件により誘導された TFF2 によって二次的に誘導される遺伝子が含まれることが想定され、腫瘍の悪性化に対する TFF2 の関与を研究する上で、生理的意義の深い遺伝子が含まれると思われる。そこで本項では、酸性培地と TFF2 を含む条件培地で共通に発現増大が認められた遺伝子について調べた。酸性培地と TFF2 を含む条件培地で共通して発現増大が認められた遺伝子群の第一は、Steroid hormone biosynthesis の経路に関する遺伝子群であることがわかった。また、ステロイドホルモン経路における分子機能 (MF) 分類では、estrogen 16-alpha-hydroxylase の酵素関連遺伝子群の発現が上昇していた。この酵素はエストラジオールの 16 位をヒドロキシル化する酵素であり、乳がんにおいて活性が高まっており [52,53]、乳がんのリスクマーカーとして腫瘍の発生率と相関していることが報告されている [54-56]。TFF はエストロゲンとの関連が報告されており、第 1 章で述べたように乳がん患者では TFF1 と 3 の血清レベルが高く悪性度と比例していると言われているが [8]、TFF2 においても乳がん細胞における運動活性やアポトーシス抑制作用がある報告があり、エストロゲンとの関与は否定できない [57,58]。TFF と estrogen 16-alpha-hydroxylase の直接的な関係についての報告は現在までに挙がっていないが、乳がんにおいても微小環境が酸性環境であることは腫瘍形成、転移、薬剤耐性を引き起こす課題となっているため [59]、TFF ファミリーとステロイド生合成経路との関係については、引き続き調べていく必要がある。

第二の遺伝子群は、cGMP-PKG signaling pathway、Cellular response to cAMP 及び PI3K-Akt signaling pathway などのシグナル伝達経路関連遺伝子群であり、細胞内のセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達に影響を与えることが分かった。cGMP 依存性プロテインキナーゼ/プロテインキナーゼ G は cGMP によって活性化されるセリン/スレオニン特異的プロテインキナーゼであり、標的をリン酸化して細胞分裂や核酸合成の調節に関与している。シグナル経路である cGMP/PKG-MAPK シグナル伝達経路において cGMP/PKG が下流の MEK-ERK 経路を活性化し、肺転移などを促進させることが報告されている [60]。cAMP は、カルシウムイオンとの $Ca^{2+}/cAMP$ シグナル伝達に関与しておりホメオスタシスの面からもがんについて関わりが報告されている [61]。

第三は、DLD-1 細胞は細胞膜 (cell membrane) に関する遺伝子の発現が誘導された。酸性環境において正常組織の特に胃における *TFF2* 遺伝子の発現上昇は、細胞膜に関連する遺伝子の発現を誘導することにより、酸性環境から細胞を保護している可能性がある。細胞膜には、酸ストレスから保護するメカニズムがあることが報告されており、膜流動性、膜脂質組成、代謝機能の変化は、酸性環境での生存戦略として機能しているのかもしれない [62,63]。また *TFF2* を含む条件培地使用時の結果では、Plasma membrane に関する遺伝子発現がみられており、細胞膜関連に共通して上がった。

TFF2 を含む条件培地の結果は DLD-1 細胞において、細胞外基質であるフィブロネクチンやアクチン結合遺伝子の発現を誘導した。図には示せていないが、酸性培地においてもフィブロネクチン系の遺伝子群が上昇していることが分かった。組織の分化発生段階における *TFF2* 遺伝子の高発現は、細胞外基質であるフィブロネクチンやアクチン結合遺伝子の発現を誘導し、細胞膜を保護している可能性が考えられた。がん細胞においてフィブロネクチンは、細胞の足場として働き、シグナル伝達経路を介して急速な細胞の増殖、浸潤、転移を煽ることが報告されている [64,65]。アクチン結合

遺伝子は、アクチン結合タンパク質である α -アクチニンなどが挙げられる。アクチン結合タンパク質は、アクチン細胞骨格のリモデリングにより、がん細胞の運動性増強を促進することが報告されており、がんの浸潤・転移のプロセスにおいて重要なステップであることが知られている [66,67]。

これらの結果から、腫瘍細胞における低 pH はさまざまな遺伝子発現を変動させることがわかった。特に、細胞膜や糖タンパク質関連遺伝子の発現を上昇させ、細胞外のストレスから膜成分を守るように働いている可能性が示唆された。また TFF2 タンパク質の機能としては、cell membrane、actin-binding 遺伝子及び Fibronectin など細胞保護や細胞強固に働く遺伝子群の発現を上昇させることが明らかとなった。フィブロネクチン系やアクチン系の上昇により、腫瘍の線維化に関与している可能性がある。大腸がんによる線維化は転移や浸潤しやすいとの報告もある [64]。これらの遺伝子は、組織の発生段階においても非常に重要な役割を果たしている。しかしその一方で、がん細胞においては、転移・浸潤を促すようにも機能するため、TFF2 タンパク質の発現は厳密に制御されなければならない。TFF2 タンパク質の発現制御については、今後も引き続き調べていく必要がある。

そこで第3章ではこれらの遺伝子のうち腫瘍の悪性化に関わるフィブロネクチン系遺伝子について、TFF2 への依存性の究明を進めることにした。

4. 小括

本章では、pH 6.5 の酸性培養条件と、TFF2 を含む条件培地が DLD-1 細胞の遺伝子発現に与える影響の解析について検討を行い、以下の知見を得た。

- 1) 酸性条件下と TFF2 を含む条件培地の結果、DLD-1 細胞は、共通して細胞膜関連遺伝子の発現を上昇させた。
- 2) 酸性条件下において DLD-1 細胞は、ステロイドホルモン生合成経路を活性化した。
- 3) TFF2 を含む条件培地の結果は、DLD-1 細胞の細胞外基質関連遺伝子の発現を上昇させた。

第3章

TFF2 siRNA がフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子群に与える影響

本章では、第2章の結果より、酸性条件と TFF2 を含む条件培地の影響により DLD-1 細胞において遺伝子発現の上昇が示唆されたフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子に注目した。フィブロネクチンは一次構造に3種類の内部ホモロジーが存在し、それぞれフィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメインとなっている。細胞外マトリックスの重要な成分であるフィブロネクチンはさまざまな種類の悪性腫瘍における腫瘍形成と悪性進行に関与していることがわかっている [68]。TFF2 遺伝子とフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子の関係を明らかにするために TFF2 遺伝子が恒常的に発現している胃癌細胞由来株 KATOIII細胞を用いて small interfering RNA (siRNA) を行った。KATOIII細胞は印環細胞型胃癌株で、細胞内に粘液を貯留する印環型の細胞からなる腺がんであり、恒常的に TFF2 遺伝子を発現している [69]。また、細胞間接着が喪失し、腺管形成がほとんどみられないという特徴的な病理組織像を示す。TFF2 に対する siRNA を3種類購入し、それらの組み合わせによる RNA interfering (RNAi) 効果の検討を行った。

1. 実験材料及び実験方法

1-1. 細胞及び継代

本研究に使用した細胞株は以下の通りである。ヒト印環細胞型胃癌細胞 KATOIII (ATCC HTB-103) は、医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクから入手、細胞番号 JCRB0611、樹立者は Sekiguchi. M. である。KATOIII細胞の培養液は、10% FBS、1% PC/SM、RPMI GlutaMax Medium 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) (pH7.4) を 45% 及び E-MEM (Eagle`s minimal essential medium) (Thermo Fisher Scientific) (pH7.4) を 45% 混合して作製した培地を使用した。37°Cの加湿型インキュベーターを使用し、5% CO₂ 条件下で培養した。継代は、70% コンフルエント直前に PBS で洗浄後、トリプシン溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で細胞を剥離し、遠心で回収し適当な細胞密度になるように培地に懸濁した。なお、この細胞は TFF2 の発現に酸性培地は必要無いことが分かっているが、TFF2 の発現は KATOIII細胞に特異的であり他の樹立した胃細胞や胃癌細胞では発現はみられていない [69]。

1-2. RNA 抽出

RNA 抽出は、TRIZOL™ 試薬で細胞を回収後、クロロホルム処理をし、エタノール沈殿により核酸ペレットを獲得した。DEPC 水に溶解した沈殿物を DNase 処理し、フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿により RNA を獲得した。RNA の純度は、Nanodrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE USA) 上の 260/280 nm および 260/230 nm 吸光比を使用して評価した。

1-3. ウェスタンブロッティング

抽出した総タンパク質濃度は、BCA を使用して標準曲線を作成して、BCA タンパク質アッセイキット (TAKARA BIO Co., Ltd, Shiga, Japan) で測定した。抽出されたタンパク質は、4×Sample Buffer (277.8mM Tris, 4.4% SDS, 44.4% Glycerol, 0.02% Bromophenol Blue, pH 6.8) に 2-メルカプトエタノール (2-ME) を添加し可溶化後、5%-20% SDS-ポリアクリルアミドゲル (ATTO CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて 20 mA 固定でおよそ 1 時間泳動した。PVDF 膜 (Merck Millipore Ltd) に転写した後、一次抗体として抗 TFF2 (1:500; Proteintech Group Inc, Rosemont, IL, USA) 、抗 FNDC3B (1:500; Proteintech Group Inc, Rosemont, IL, USA) と抗 β -actin (1:2000; Proteintech Group Inc, Rosemont, IL, USA) を用いて 4°C で一晩反応させた。二次抗体は、HRP 標識された抗 rabbit 抗体 (1:2000; Dako, California, USA) を用いて、25°C、1 時間インキュベートした。全ての抗体は 1% スキムミルク (in TBS-T) で希釈した。検出は、ELC 検出キット (PerkinElmer, Inc, Waltham, MA, USA) を用いて発光を確認し、ChemiDoc Touch イメージングシステム (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) で撮影した。

1-4. *TFF2* siRNA の配列及び KATOIII 細胞へのトランスフェクション

ヒトの *TFF2* 遺伝子のコード配列に対して設計された siRNA (Qiagen N.V., Venlo, NLD) のターゲット配列は、TFF2_2 は 5'-ATGGTTTAACATATAATTTCT-3'、TFF2_3 は 5'-TCGGAAGTGCTGCTTCTCCAA-3' 及び TFF2_7 は 5'-TTTCAATGGTTTAACATATAA-3' であり、QIAGEN 社より購入した。KATOIII 細胞は 6-well のプレート (Thermo Fisher Scientific) に 2×10^5 cells/well になるよう播種し、一晩インキュベートした。siRNA は、TFF2_2、TFF2_3、TFF2_7、TFF2_2/3、TFF2_2/7 及び TFF2_3/7 の 2 種類の混合液の組み合わせを検討した。ネガティブコントロー

ルとして、ポジティブな活性のある siRNA の配列をランダム化した Nega_siRNA を使用した。トランスフェクションの前に培地を Opti-MEM (低血清培地, pH7.4) に変更し、24 時間培養後、siRNA をトータル 41.625 μ L になるようにそれぞれ調製し、全体量 2000 μ L の培地に対して最終的な濃度が 25 nM になるようにした。濃度を均等にするためしっかり混合した後、培養液として加え、37°C、5% CO₂ インキュベーターに入れ 48 時間培養した。コントロールは、KATOIII細胞を Opti-MEM により 48 時間培養した細胞を用いた。ウエスタンブロッティングに用いる蛋白質溶液は、タンパク質分解酵素阻害剤 (Merck Millipore Ltd, Darmstadt, Germany) を添加済みの RIPA バッファー (Santa Cruz biotechnology., Dallas, TX, USA) を用いて作製した。

1-5. 定量的リアルタイム RT-PCR による *TFF2* 遺伝子のノックダウン効率の測定

KATOIII細胞を 2×10^5 cells/well になるよう 6 ウェルのプレート (Thermo Fisher Scientific) に撒いて一晩インキュベートした。抑制効率を比較するため siRNA は、TFF2_2、TFF2_3、TFF2_7、TFF2_2/3、TFF2_2/7 及び TFF2_3/7 の混合液を準備した。RNA 抽出は、TRIZOL™ で細胞を回収後、クロロホルム処理をし、エタノール沈殿により核酸ペレットを獲得した。DEPC 水に溶解した沈殿物を DNase 処理し、フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿により RNA を獲得した。RNA の純度は、Nanodrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE USA) 上の 260/280 nm および 260/230 nm 吸光比を使用して評価した。濃度測定した RNA から High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて cDNA を作製し、Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) を使い、リアルタイム PCR を行った。使用したプライマー配列は *TFF2* (5'-CAAAGCAAGAGTCGGATCAG-3' および 5'-CCAGGGCACTTCAAAGATG-3')、

FNDC3B (5'- CCACCTGTTACCGGACCTG -3'および 5'- TGATGTAGGTTGACATTC C-3'), *FNDC5* (5'- TGTTCCTTCTCACCTCCATC -3'および 5'- GCAAGCCGTAACCAAAACC -3')、*β-actin* (5'- CCTGGCACCCAGCACAAT-3'および 5'- GCCGATCCACACGGAGTACT -3')である。内在性コントロールとして β -actin を使用した。検出は、Applied Biosystems[®]7900HT Fast リアルタイム PCR システムで行った。プライマーセットの特異性を評価するために、各 PCR アンプリコンの融解曲線进行分析した。これらの操作は2回繰り返した。

1-6. 統計解析

2群間の比較にはノンパラメトリック検定である Mann-Whitney U 検定を使用した。3群以上の比較においては、有意水準が上がるため2群検定を繰り返すことはできないため、多重比較に適した Dunnett's 検定を行い、対照群と他群との比較を行った。これらの統計解析には、GraphPad Prism 5 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) ソフトウェアを使用した。P < 0.05 を統計的に有意とした。

2. 実験結果

2.1. KATOIII細胞における *TFF2* siRNA の発現抑制効果

TFF2 を恒常的に発現している胃がん細胞由来株 KATOIII細胞において、*TFF2* の発現が siRNA によって抑制できるかを調べた。内部標準は β -actin を用いた。コントロールは、siRNA を使用していない KATOIII細胞であり、Real time RT-PCR における相対比較において *TFF2* 遺伝子発現は1とした。siRNA *TFF2_2*、*TFF2_3* と *TFF2_7* による

発現抑制効果を Real time RT-PCR で確認したところ、それぞれ単独の siRNA において、*TFF2* mRNA の発現は有意に下がっていることがわかった。Fig.22 において、ネガティブコントロールは図に示せていないが *TFF2* 遺伝子発現量に影響を与えないことを確認した。*TFF2* 遺伝子の発現は、siRNA の組み合わせによっても有意に下がっていることがわかった (Fig.22)。siRNA_2 と siRNA_3 による *TFF2* タンパク質発現抑制効果はそれぞれで確認でき、siRNA_2/3 の混合液において *TFF2* タンパク質発現の抑制効果が確認された (Fig.23)。一方、Fig.23 のウエスタンブロッティングの結果では、 β -actin のタンパク質発現量低下がみられるので、Real time RT-PCR の補正に使うのには良い遺伝子では無かった。

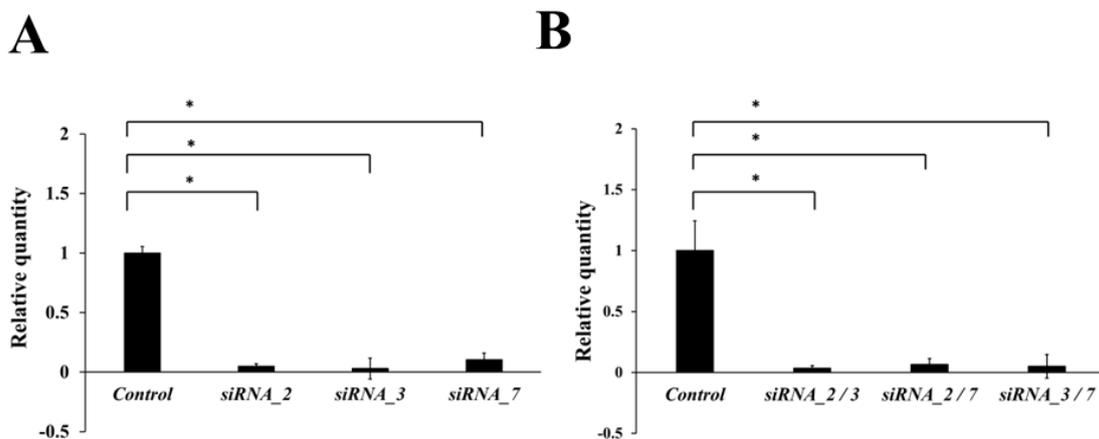


Figure 22. Inhibition of *TFF2* mRNA expression by *TFF2* siRNAs. KATO III cells were spread on 6-well plates (Thermo Fisher Scientific) to 2×10^5 cells/well, transfected with each *TFF2* siRNAs, and incubated further for 48h. Total RNA was applied for RT-PCR analyses with β -actin as a reference. (A) Inhibition of *TFF2* mRNA expression by siRNA_2, siRNA_3, and siRNA_7, respectively. (B) Inhibition of *TFF2* mRNA expression by siRNA_2 / 3, siRNA_2 / 7, and siRNA_3 / 7, respectively. (* $P < 0.05$; Mann–Whitney U test) Error bars indicated mean standard error (SE).

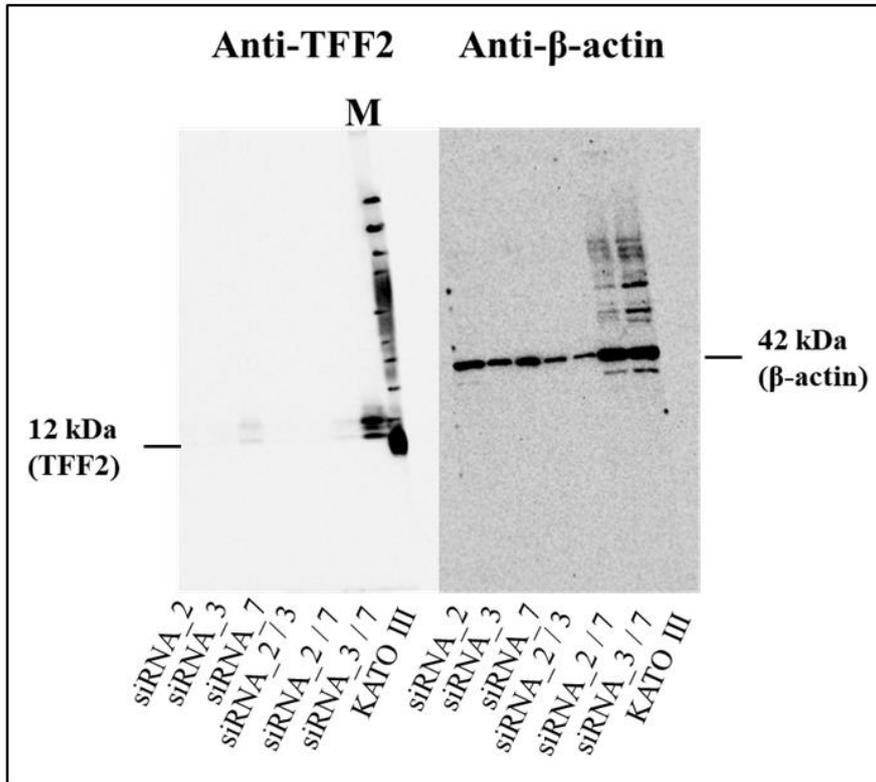


Figure 23. Inhibition of TFF2 protein expression by TFF2 siRNAs. KATO III cells were spread on 6-well plates to 2×10^5 cells/well, transfected with each TFF2 siRNAs, and incubated further for 48h. Total protein was applied for Western blot analyses with anti-TFF2 mAb. Inhibition of TFF2 protein expression by siRNA_2, siRNA_3, and siRNA_7, siRNA_2 / 3, siRNA_2 / 7, and siRNA_3 / 7, respectively.

2.2. TFF2 siRNA がフィブロネクチンIIIドメインファミリーの *FNDC3B* 遺伝子及び *FNDC5* 遺伝子の mRNA とタンパク質に与える影響

第2章において、TFF2 タンパク質により発現が上昇することが示唆された

Fibronectin type-III domain containing protein 3B (*FNDC3B*) と Fibronectin type-III domain

containing protein 5 (*FNDC5*) の発現変動を Real time RT-PCR で確認した。ネガティブコントロールである Nega_siRNA は図に示せていないが *TFF2*, *FNDC3B*, *FNDC5* 遺伝子の発現量に影響を与えない事を確認した。Fig. 25 のウエスタンブロッティングの結果では、 β -actin のタンパク質発現量低下がみられるので、Real time RT-PCR の補正に使うのには良い遺伝子では無かった。しかし、siRNA により *TFF2* 遺伝子の発現を抑制すると、 β -actin で補正してなお、*FNDC3B* と *FNDC5* 遺伝子は有意に mRNA が抑制されることが明らかとなった (Fig.24)。また、*FNDC3B* の発現をウエスタンブロットにより確認したところ、siRNA 2/3 の混合液においてタンパク質発現の抑制が確認された (Fig.25)。

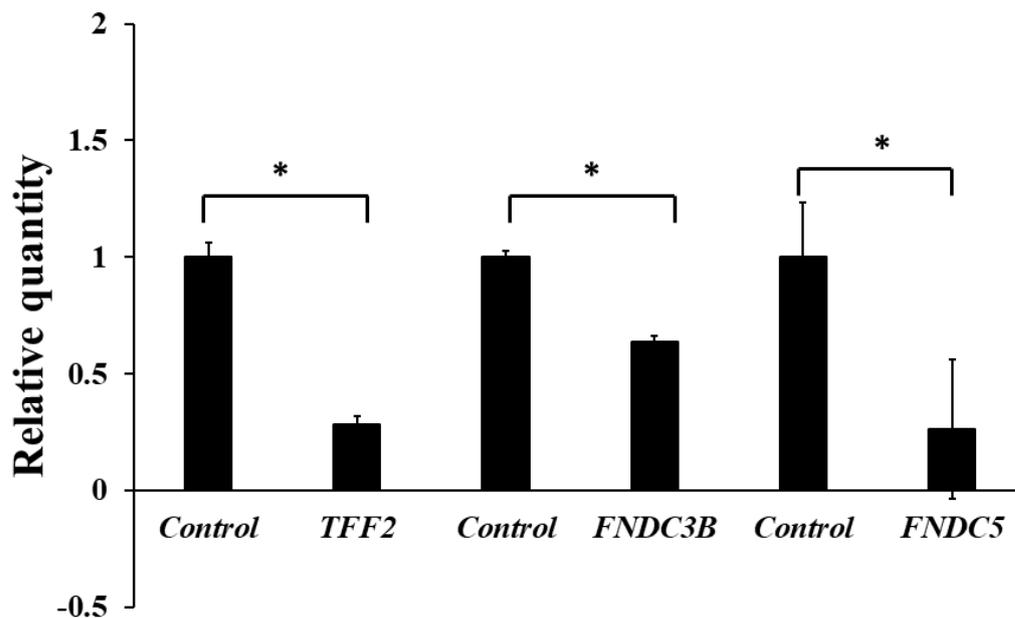


Figure 24. Alteration of *FNDC3B* and *FNDC5* mRNA expression by *TFF2* siRNA. KATO III cells were spread on 6-well plates to 2×10^5 cells/well, transfected with *TFF2_2/3* mixed siRNA, and incubated further for 48h. Total RNA was applied for RT-PCR analyses with b-

actin as a reference. (* $P < 0.05$; Mann–Whitney U test) Error bars indicated mean standard error (SE).

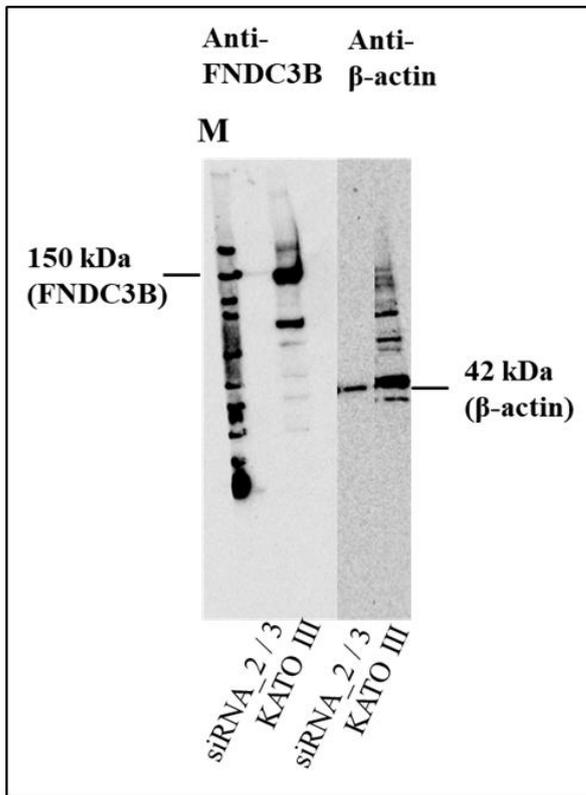


Figure 25. Alteration of FNDC3B protein expression by TFF2 siRNA. KATO III cells were spread on 6-well plates to 2×10^5 cells/well, transfected with TFF2_2/3 mixed siRNA, and incubated further for 48h. Total protein was applied for Western blot analyses with anti-FNDC3B mAb.

3. 考察

本章では、TFF2 siRNA を用いて *TFF2* の mRNA とタンパク質の発現が抑制されることを確認した。また、KATOIII細胞におけるフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子の *FNDC3B* の発現が *TFF2* の siRNA により抑えられることが mRNA とタンパク質の両方のレベルが明らかとなり、TFF2 が *FNDC3B* の発現を正に調節することが示唆された。

第2章のマイクロアレイ解析の結果では、TFF2 タンパク質を含む条件培地によりフィブロネクチンの遺伝子群の発現が有意に上昇していた。また、酸性条件下のマイクロアレイの解析結果でもフィブロネクチンIII型ドメインの遺伝子発現の上昇が確認されており、特に *FNDC3B* と *FNDC5* 遺伝子の発現が有意に上昇していた。本章の実験により、フィブロネクチンの遺伝子やタンパク質の発現は、*TFF2* 遺伝子の siRNA で抑制されるという新しい知見を得ることができた。これまでに、*TFF2* 遺伝子とフィブロネクチン遺伝子群との関係についての報告はなく、TFF2 タンパク質の新しい機能を明らかにした。フィブロネクチンIII型ドメイン含有タンパク質は膜結合タンパク質であり [70]、*FNDC3B* や *FNDC5* 遺伝子とがんとの関係についての報告は多い。*FNDC3B* は大腸がんにおいて、PI3K/mTOR シグナル伝達を介した複数の過程を経て増殖や浸潤作用があることが報告されており [71]、また、子宮頸部扁平上皮がんにおいては発がんから増殖、細胞周期プロセス、遊走及び浸潤作用を促す報告がある [72,73]。*FNDC5* タンパク質は一部が切断されることにより、イリシン (112aa ペプチド) を放出するというプロホルモンであり、肺がん、消化器がん及び卵巣がんなど、がん組織においてイリシンレベルの上昇が報告されている [74-76]。がんの悪性を抑制するためには、これら *FNDC3B* や *FNDC5* の発現を制御することが必要であると考えられる。TFF2 タンパク質がこれらの遺伝子発現を正に調節することが示唆されたことから、がん細胞における *TFF2* mRNA の発現上昇は、がん悪性の促進剤としての役割があることを

示唆している。本研究により、siRNAによる *TFF2* mRNA の発現阻害が *FNDC3B* や *FNDC5* の発現を抑制したことから、がん細胞における *TFF2* mRNA の発現抑制は腫瘍の悪性のブレーキとなり得るかもしれない。*TFF2* 発現制御機構に関して、さらなる探求が望まれる。

4. 小括

本章では、TFF2 がフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子の発現を正に調節しているかを調べる目的で、TFF2 を恒常的に発現する胃癌細胞 KATOIII を用い、TFF2 の siRNA による発現阻害がフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子の発現を阻害するかを検討し、以下の知見を得た。

- 1) 購入した TFF2 siRNA が、期待通りに、*TFF2* の mRNA とタンパク質発現を阻害することを KATOIII 細胞において確認できた。
- 2) siRNA_2/3 の組み合わせを利用して、*TFF2* の発現を阻害したところ、フィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子の *FNDC3B* と *FNDC5* 遺伝子の発現と *FNDC3B* タンパク質の発現が有意に抑制されることが明らかになった。この結果は、TFF2 がフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子の *FNDC3B* と *FNDC5* を正に制御していることを示唆している。

第4章

TFF2を含む条件培地が細胞内代謝経路へ与える影響

生物が生命活動を維持する際には様々な代謝物質を産出している。それら代謝産物を網羅的に解析することは、トランスクリプトーム解析よりも直接的に表現型に近い情報を得ることができると考えられている。さまざまオミックス解析の中でも比較的新しい分野であるメタボローム解析は、質量分析計にて代謝産物を網羅的に検出することにより、生体内の代謝がどのように変化しているのか把握・推測することができる一つのツールとして近年着目されている。がん細胞は正常細胞と比べるとさまざまな変化を遂げており、代謝に関する経路もリプログラミングすることによって生存、増殖及び転移などを可能にしている。特に、旺盛な細胞増殖に必要なエネルギーや材料を供給する際に受ける酸化ストレスなどの細胞内環境変化に対応するためには、酸化還元電位を正常に保つ仕組みが再構築される必要がある [77]。そのためには、アミノ酸が重要な役割を担っており、グリコーゲン代謝や脂質合成経路の基質として働き、その他、生理活性物質の前駆体としても重要な生理機能を果たしていると考えられている [78]。本章では、培養上清中に含まれる TFF2 タンパク質が DLD-1 細胞の細胞内代謝物にどのような影響を及ぼすのかメタボローム解析による包括的な代謝産物の検出を行い、次に、第二章のトランスクリプトーム解析で得られたマイクロアレイデータを用い、網羅的トランスクリプトーム及びメタボローム統合解析を行うことで、細胞外に存在している TFF2 タンパク質ががん細胞の生存にどのような影響を与えているのか明らかにすることを試みた。

1. 実験材料及び実験方法

1-1. 試料

DLD-1 細胞にマウスの *TFF2* 遺伝子を導入した安定発現株 [5] (*mTFF2* 細胞) と、通常培養の DLD-1 細胞 (コントロール) は RPMI GlutaMax Medium 1640 で培養した。 6×10^5 cells/well に調整し 60 mm シャーレ (Thermo Fisher Scientific) に播種し、細胞が底面に定着したことを確認した後、培地を Opti-MEM 培地に交換した。培養は、それぞれ 48 時間 (37°C、CO₂ 濃度 5%) 行った。回収した培養上清液を条件培地 (TFF2 を含む培地/コントロール (含まない培地)) とした (第 2 章 1-2 マイクロアレイに用いた試料参照)。この TFF2 を含む培地とコントロール条件培地を用いて、DLD-1 細胞を 48 時間それぞれ培養した後、DLD-1 細胞をそれぞれ回収した。回収した細胞と条件培地をそれぞれメタボローム解析に使用し、比較した (Fig.26)。

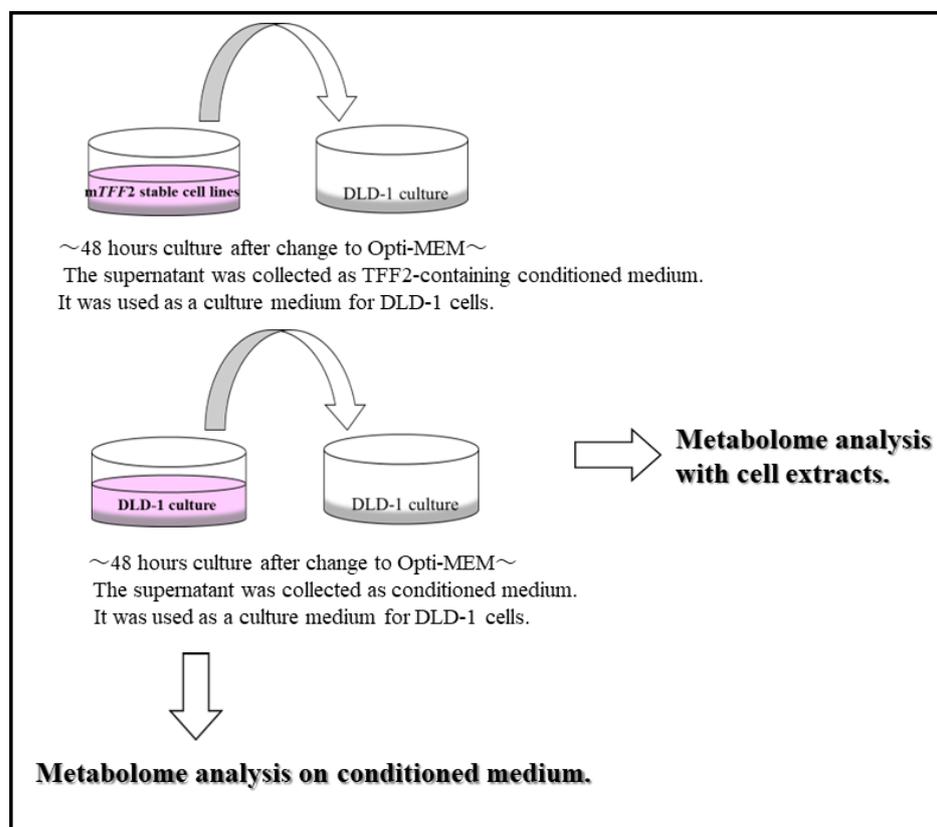


Figure 26. DLD-1 cells were cultured with Opti-MEM medium containing TFF2 protein.

DLD-1 cells stably expressing mTFF2-GFP protein were cultured with Opti-MEM medium (pH7.4) for 48 h, and culture supernatant containing secreted TFF2 protein was collected and used as conditioned medium. Conditioned medium using DLD-1 cells which was not expressing mTFF2 was used as control conditioned medium. Each of the conditioned mediums was used for culturing of DLD-1 cells to examine the effect of secreted TFF2 protein contained in the conditioned medium on metabolites. Metabolites were tested by Metabolomic analysis. Metabolites in conditioned medium were also tested by metabolomic analysis.

1-2. 細胞及び継代

本研究に使用した細胞株は以下の通りである。ヒト結腸腺がん由来細胞 DLD-1 (American Type Culture Collection [ATCC] CCL 221, ATCC, Manassas, VA, USA)の培養は、10% FBS (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)、ペニシリン (10,000 U/mL)/ストレプトマイシン (10,000 µg/mL) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) (終濃度が1%となるように添加、以下1%PC/SM) を添加した RPMI GlutaMax Medium 1640 培地を用いた。37°Cの加湿型、5% CO₂条件下で培養した。継代は、70%コンフルエント直前に PBS で洗浄後、トリプシン-EDTA 溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で細胞を剥離し、適当な細胞密度になるように培地に懸濁した。

1-3. メタボローム解析のためのサンプル調製【細胞】

島津製作所のプロトコルを参考に行った。細胞は DLD-1 細胞を使用した。細胞を 6×10^5 cells/well に調製し 60 mm シャーレ (Thermo Fisher Scientific) に撒いた。培地は

TFF2 を含む条件培地 (48 時間培養した *mTFF2* 細胞の培養上清を用いた)、あるいは TFF2 を含まないコントロール条件培地 (48 時間培養した DLD-1 細胞の培養上清を用いた) に交換し、48 時間培養後に培地を吸引し、DLD-1 細胞を回収した。PBS (4°C) 2 回洗浄し、吸引を 2 回繰り返した。PBS を除去した後、メタノール (-20°C) を 1 mL 添加した。セルリフターで細胞を剥離し、2 mL マイクロチューブに回収した。well にメタノール (-20°C) を 0.5 mL 追加し、先ほどの 2 mL マイクロチューブに追加回収した。すぐに -80°C に入れて、次のサンプルの回収作業を行った。すべてのサンプルが揃った後、細胞懸濁液をボルテックス (最大回転速度で 5 分) かけた。液体窒素にて凍結 1 分間、その後室温で溶解約 5 分間、超音波で 5 分間かけた。この作業を 2 回実施して計 3 回行なった。4°C において 14,000 rpm の 15 分間遠心し上清を 2 mL チューブに回収した。細胞ペレットに MilliQ 水 0.5 mL 添加しボルテックス後氷上で 10 分間静置させた。4°C において 14,000 rpm の 15 分間遠心後、再度 2 mL チューブに上清を回収した。1 mg/mL の 2-イソプロピルリンゴ酸を 5 μ L 加え、30 秒間ボルテックスをした。2 本の 1.5 mL チューブに等量分注し、スピードバックで完全に乾燥させた。実験の再現性を確認するため、独立した 3 回の実験を行った。

1-4. メタボローム解析のためのサンプル調製【培養上清】

島津製作所のプロトコルを参考に行った。TFF2 を含む条件培地 (*mTFF2* 細胞の培養上清液)、あるいは TFF2 を含まないコントロール条件培地 (DLD-1 細胞の培養上清液) について、3mL を冷却したアセトン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 12mL と混和後、-30°C で 2 時間以上一晩まで十分に反応させた。その培養上清を 50 μ L とりマイクロチューブに入れた。その後、2-イソプロピルリンゴ酸 (Sigma-Aldrich Co., LLC, Missouri St. Louis, USA) (1 mg/mL) を 5 μ L 加え、ボルテックスを 30 sec 行った。次

に、メタノール:水:クロロホルム (2.5:1:1) を調製し、250 μL 加えてからボルテックスを 30 sec 行った。それらを、37°C、200 rpm で 30 分間振盪した後、4°C、15000 rpm で 5 分間遠心を行い、上清を新しいマイクロチューブに移した。さらに、Milli Q 水を 200 μL 加え、30 sec ボルテックスし、4°C、5 分間 15000 rpm で遠心した。上清 250 μL を新しいチューブに移し、スピードバックで完全に乾燥させた。実験の再現性を確認するため、独立した 3 回の実験を行った。

1-5. 代謝産物の抽出と誘導体化

代謝産物の抽出と誘導体化は共同研究先である大分大学医学部全学研究推進機構に委託し、次の操作によりサンプルを調製した [79]。Bligh-Dyer 法を使用して、代謝物を抽出した。サンプルを凍結乾燥させた各チューブに 400 μL の冷リン酸緩衝生理食塩水を加え、ビードビーター型のホモジナイザー ($\mu\text{T-12}$, Taitec Co., Saitama, Japan) にて、サンプルを 2,200 rpm で 30 秒間ホモジナイズした。すぐに、500 μL の冷メタノールと 250 μL の冷クロロホルムを各均質化サンプルに加え、続いて 2 分間ボルテックスした。内部標準溶液 (2-イソプロピルリンゴ酸、1 mg/mL) 5 μL を混合物に加え、混合物を室温で 5 分間静置した。次に、250 μL の Milli Q 水と 250 μL のクロロホルムを各サンプルに加え、2 分間ボルテックスした。次いで、混合物を室温で 6 分間、14,000 rpm で遠心分離した。500 μL の上清を新しいチューブに移し、室温でエッペンドルフ濃縮器により 3 時間乾燥した。完全に乾燥したサンプルをピリジン中の塩酸メトキシアミン (20 mg/mL) 80 μL と合わせ、30 秒間ボルテックスし、固体が完全に分散するまで 30 秒間超音波処理した。サンプルを 30°C で 90 分間、200 rpm (BioShaker™、株式会社タイテック、埼玉県) 遠心した。80 μL の N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドをサンプルに加え振とう後、BioShaker を使用

して 37°C、200 rpm で 30 分間さらに振とうした。最後に、誘導体化されたサンプルを 14,000 rpm で 5 分間、室温で遠心分離し、マイクロチューブを使用して 100 µL の上清を GC-MS バイアルに移した。

1-6. メタボローム分析

共同研究先である大分大学医学部全学研究推進機構に委託し、以下の操作を行った [79]。代謝物の分析は、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS/MS) により実行した。GC-MS/MS 分析は、多重反応モニタリングモードで分析した。GC-MS/MS 分析は、以下の装置で行った。GC-MS/MS 分析は、DB-5 キャピラリーカラム (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 1.00 µm; Agilent Technologies 製) を備えた GCMS-TQ8040 システム (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) で実行した。誘導体化した試料溶液の各 1.0 µL ずつの分注は、オートインジェクター (AOC-20i, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を使用して、スプリットレスモードで気液クロマトグラフィー (GC) カラムに自動的に注入した。GCMS-TQ8040 分析には、インジェクター温度は 280°C に維持された。キャリアガスはヘリウムを用い、流速は 39.0 cm/s の一定流量で行った。GC カラムの温度は、100°C で 4 分間保持した後、100°C から 320°C までを 4 分で上昇するようにプログラムした。その後、320°C でさらに 11 分間維持し、GC の合計実行時間は 37 分だった。質量分析のトランスファーラインとイオン源の温度は、イオン源温度 200°C、インターフェース温度 280°C、イオン化電圧は 70 eV とした。衝突誘起解離にはアルゴンを使用した。代謝物の検出は Smart Metabolites Database Ver. 2 を用いて、先行研究方法に若干の修正を加えて行った [20]。抽出液に含まれる 2-イソプロピルリンゴ酸は、GC-MS/MS 分析装置の安定性を評価するために使用した。ピーク同定は自動的に行われ、特定のプリカーサーイオンとプロダクトイオン、および保

保持時間に基づいて手動で確認した。各化合物のピーク面積と内部標準物質 (2-イソプロピルリンゴ酸) のピーク面積との比を内標比として算出し、標準化した。

1-7. 多変量解析

共同研究先である大分大学医学部全学研究推進機構に委託し、以下の操作を行った [79]。質量分析より得られた結果 (データベースに対して同定された代謝物名、保持時間、面積値、質量数など) を精査し、SIMCA version 13.0 (Umetrics 社) で多変量解析を行った。多変量解析で、はじめに PCA 法で大まかに群が分けられることを確認した後、OPLS-DA 法でより詳細に群別の情報を解析した。さらに、S-plot を用いて、2 つ以上のクラスを有する OPLS-DA 法などの多変量分類を視覚化した。S-plot は、代謝物とモデル化されたクラス指定の間の共分散と相関の両方を可視化することができる。統計的有意性 ($0.8 < p(\text{corr}) < 1.0$ または $-1.0 < p(\text{corr}) < -0.8$) によって信頼性を可視化した。

選択されたデータは平均値 \pm 標準誤差として表され、IBM SPSS Statistics 22 (Armonk, NY, USA) による Student's t-test を使用して比較した。

1-8. Pathway 解析

メタボローム解析で得られた代謝物は、代謝物解析用ソフトウェア Metaboanalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) を用いて解析した。有意な発現を示したそれぞれの代謝物は、ヒトにおける低分子代謝物に関するデータベース Human Metabolome Database (HMDB) の化合物 ID を参照し、その ID を基に Pathway Analysis (MetPA) を

行った。次に、HMDB の ID とともに、第 2 章で得られたマイクロアレイデータのうち、有意な発現上昇を示した各遺伝子の Entrez Gene ID (National Center for Biotechnology Information が提供するさまざまなデータベースに使用される Gene ID) を用いて Joint Pathway Analysis を行った。この Joint Pathway Analysis は、Pathway レベルにおけるトランスクリプトミクスおよびメタボロミクスデータの統合分析用に設計されたシステムである。

2. 結果

2-1. TFF2 を含む条件培地が DLD-1 細胞の代謝経路に与える影響

用いた培養条件の違いから、コントロール条件培地 (Opti-MEM 培地を使用して 48 時間 DLD-1 細胞を培養した上清) と TFF2 を含む条件培地 (Opti-MEM 培地を使用して 48 時間 *mTFF2* 細胞を培養した上清) の 2 つの名称に分けた。コントロール条件培地と TFF2 を含む条件培地により培養された DLD-1 細胞は各 4wells ずつそれぞれ別に回収し、メタボローム解析を行った。計 8 サンプルについて SIMCA (ver13.0) を用い PCA 法で多変量解析したところ、大きく 2 群に分けられることが確認でき、コントロール条件培地と TFF2 を含む条件培地で培養されたそれぞれの DLD-1 細胞に存在する代謝産物は異なっていることがわかった (Fig.27)。次に、どのような代謝物がこれらの群を分ける要因となったかを、OPLS-DA 法で解析し、S-plot を用いて視覚化した (Fig.28)。この図の 1 点は代謝物 1 個のデータと対応しており、中心をゼロ点とし、上下が有意差、左右が量の変化を示している。左側の赤色はコントロール条件培地を用いたときに有意に変動した細胞内代謝物、右側の青色は TFF2 を含む条件培地を用いたときに有意に変動した細胞内代謝物を示している。TFF2 を含む条件培地により培養された DLD-1 細胞は、コントロール条件培地を使用したものと比べると、12 個の代謝

物が増加しており (Table 1)、GABA (4-Aminobutyric acid)、クレアチニン (Creatinine)、システイン (Cysteine) や乳酸 (Lactic acid) からタウリン (Taurine)、ノルバリン (Norvaline) までが有意に増加していることが明らかとなった。

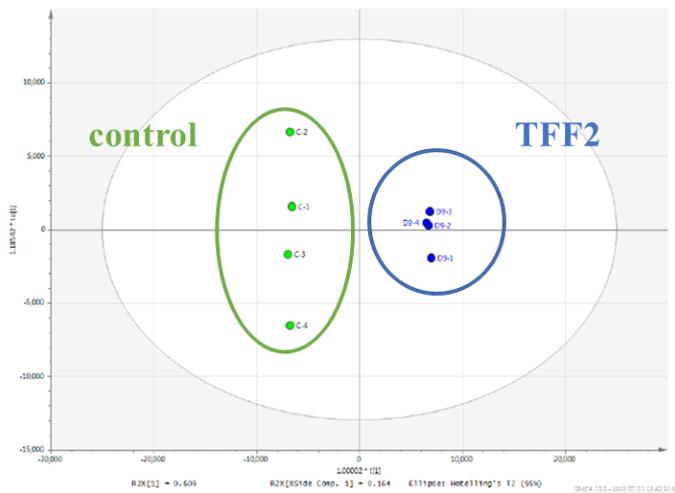


Figure 27. Multivariate analyses on metabolites extracted from DLD-1 cells reveal alteration in their compositions by the TFF2 protein-containing conditioned medium.

Metabolome analyses were carried out on DLD-1 cells cultured with control or TFF2-containing conditioned medium. Results of multivariate analyses using PCA method on cellular metabolites are shown in the score plot. Eight samples are clustered into two groups, which corresponded to the control supernatant group and the TFF2 protein-containing supernatant group.

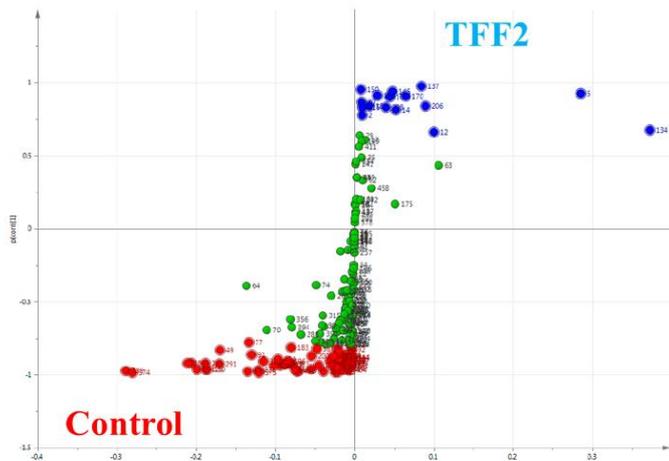


Figure 28. S-plot analyses reveal big alterations in metabolites by the TFF2 protein-containing conditioned medium. Metabolome analyses were carried out on cellular metabolites extracted from DLD-1 cells which were cultured with control or TFF2-containing conditioned medium as described in Figure 27. Following multivariate analyses using OPLS-DA method, results were visualized by S-plot. In this S-plot, single dot corresponds to one metabolite, and horizontal and vertical direction represents changes in quantity and significant differences between the two conditions, respectively, with zero at the center. Red dots indicate metabolites with high in the control conditions, while blue dots were high in TFF2-containing conditioned medium. Green dots mean commonly observed metabolites between the two.

Table 1. Metabolites upregulated in DLD-1 cells cultured with TFF2-containing conditioned medium.

Metabolite*	p(corr)[1]
4-Aminobutyric acid	0.974128
Creatinine	0.951879
Cysteine	0.939678
Lactic acid	0.926438
Cadaverine	0.910375
Hypotaurine	0.908792
3-Aminopropanoic acid	0.904564
3-Hydroxyisobutyric acid	0.869284
Taurine	0.841741
5-Aminovaleric acid	0.841037
Oleamide	0.831505
Norvaline	0.812231

*Metabolites significantly increased in DLD-1 cells grown in TFF2 protein-containing conditioned medium compared with control conditioned medium were shown.

2-2. TFF2 を含む条件培地による DLD-1 細胞内の代謝経路の変化

Table 1 で示した 12 個の代謝物について、下記の方法を用いて詳細なパスウェイ解析を行った。マギル大学の Jianguo Xia 氏が開発したフリーの代謝物解析用ソフトウェア MetaboAnalyst 6.0 を用いて、Metabolic Pathway Analysis (MetPA) を行い、これらの代謝物が産生されるパスウェイを調べた (Fig.29)。次に、Table1 で抽出された代謝物の中に、特定の代謝経路に関わっている中間産物がいくつ Hit するかその割合により有意に活性化されたと判断する Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA) を用いて、活性化された経路を調べた (Table 2)。MetPA および MSEA の両方で有意であると判定

された代謝経路には、タウリン・ヒポタウリン代謝経路やグルタチオン代謝経路があることが明らかとなった。

次に、トランスクリプトーム/メタボローム解析の統合解析を行った。本論文、第2章で得られたマイクロアレイデータ（TFF2を含む条件培地で培養した DLD-1 細胞の遺伝子発現変化）で有意な変動が見られた遺伝子群の各 Entrez ID と、メタボローム解析で検出された化合物の Human Metabolome Database (HMDB) ID を用いて、MetaboAnalyst 6.0 の Pathway Analysis、Joint Pathway Analysis を行った (Fig.30)。その結果、Fig.29 では得られなかった、Retinol metabolism や Linoleic acid metabolism などの代謝経路が検出された。さらに、関与する化合物の Hit 数で解析を行う MSEA を行い、MetPA と共通して有意に変動が見られた経路に、タウリン・ヒポタウリン代謝経路が関わっていることが明らかとなった (Table 3)。

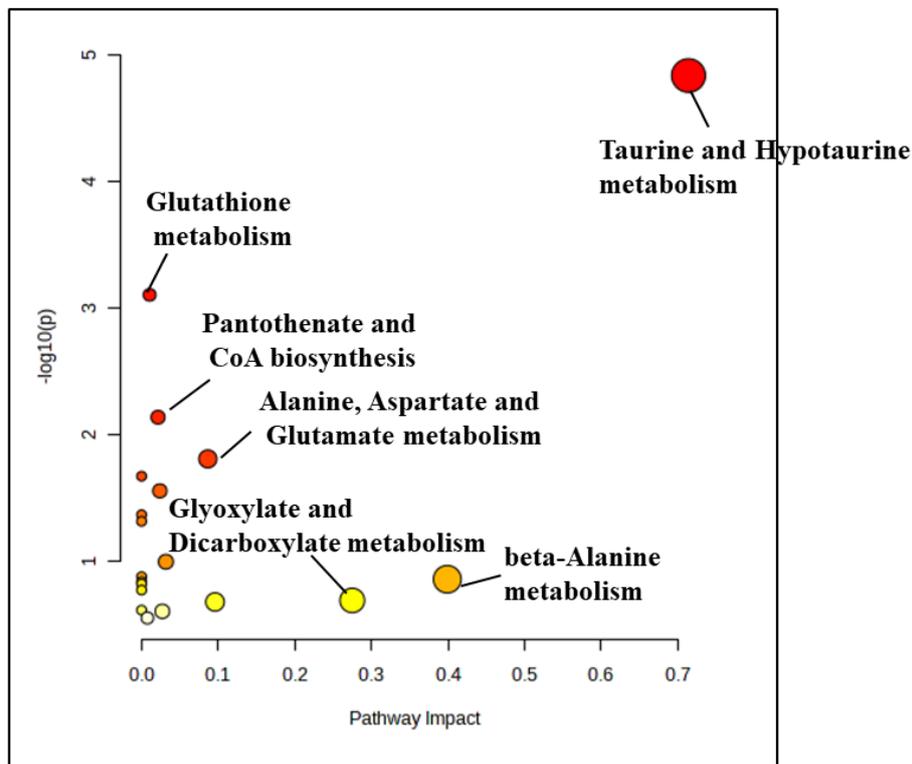


Figure 29. Metabolic pathway analysis (MetPA) on cellular metabolites of DLD-1 cells altered by TFF2 conditional medium. Metabolic pathway analyses were carried out for 12 metabolites shown in Table 1. Horizontal direction represents pathway impact that means indicating a greater impact on other metabolic pathways, while vertical direction represents significance in differences between the two conditions. Red circles indicate metabolic pathway with high in the TFF2-containing conditioned medium, while yellow circles were high in control medium. Orange circles mean commonly observed metabolites between the two. Circle sizes represent the number of metabolites.

Table 2. Upregulated metabolic pathways in DLD-1 cells by TFF2 conditioned medium were revealed by Metabolite set enrichment analysis (MSEA).

	Total	Hits	Expect	<i>P</i> value	Holm P	FDR
Taurine and Hypotaurine Metabolism	12	3	0.117	1.41E-04	0.0138	0.0138
Glutathione Metabolism	21	3	0.205	8.15E-04	0.079	0.0399
Glutamate Metabolism	49	3	0.479	0.00975	0.936	0.265
Alanine Metabolism	17	2	0.166	0.0108	1	0.265
Glycine and Serine Metabolism	59	3	0.576	0.0163	1	0.32
Homocysteine Degradation	9	1	0.0879	0.0849	1	1
Glucose-Alanine Cycle	13	1	0.127	0.12	1	1
Pantothenate and CoA Biosynthesis	21	1	0.205	0.188	1	1
Cysteine and Methionine Metabolism	26	1	0.254	0.228	1	1
Selenoamino Acid Metabolism	28	1	0.273	0.243	1	1

The top 10 significantly upregulated metabolic pathways in TFF2 conditioned medium were detected by metabolite set enrichment analysis (MSEA) on 12 metabolites shown in Table 1.

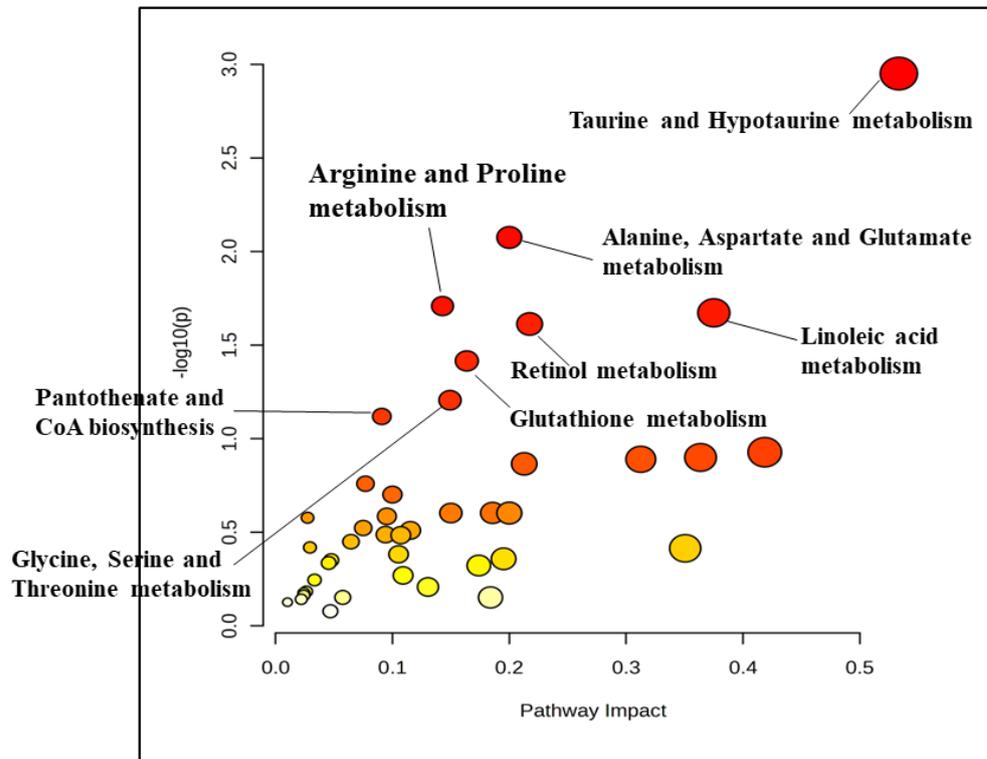


Figure 30. Metabolic pathway analysis (MetPA) using both the transcriptome data and the metabolome data. A joint pathway analysis was carried out for 12 metabolites shown in Table 1 and the data obtained from the microarray analysis. Horizontal direction represents pathway impact, indicating a greater impact on other metabolic pathways, while vertical direction represents significance in differences between the two conditions. Red circles indicate metabolic pathway with high in the TFF2-containing conditioned medium, while yellow circles were high in control medium. Orange circles mean commonly observed metabolites between the two. Circle sizes represent the number of metabolites.

Table 3. Joint pathway analysis of both the transcriptome and the metabolite data revealed upregulated pathways in DLD-1 cells grown in TFF2 conditioned medium.

	Total	Hits	Expect	<i>P</i> value	Holm P	FDR	Impact
Taurine and Hypotaurine metabolism	16	3	0.21639	1.12E-03	0.094099	0.094099	0.53333
Alanine, Aspartate and Glutamate metabolism	61	4	0.825	8.41E-03	0.69816	0.35329	0.2
Arginine and Proline metabolism	78	4	1.0549	0.019562	1	0.40984	0.14286
Linoleic acid metabolism	17	2	0.22992	0.021254	1	0.40984	0.375
Retinol metabolism	47	3	0.63566	0.024395	1	0.40984	0.21739
Glutathione metabolism	56	3	0.75738	0.038417	1	0.53784	0.16364
Glycine, Serine and Threonine metabolism	68	3	0.91967	0.062285	1	0.74741	0.14925
Pantothenate and CoA biosynthesis	34	2	0.45984	0.076064	1	0.79867	0.090909
beta-Alanine metabolism	44	2	0.59508	0.1181	1	0.95391	0.4186
Steroid hormone biosynthesis	199	5	2.6914	0.12595	1	0.95391	0.36364

The top 10 significantly upregulated metabolic pathways in TFF2 conditioned medium were detected by metabolite set enrichment analysis (MSEA) on 12 metabolites shown in Table 1 and the data obtained from microarray analysis.

2-3. TFF2 を含む条件培地中の代謝産物の変化

次に、2-2 で細胞内代謝経路に影響を及ぼすことが明らかとなった TFF2 を含む条件培地についてメタボローム解析を行った。2-1.と同じく、コントロール条件培地と併せて4サンプルずつ計8サンプルの多変量解析を行った結果、コントロール条件培地とTFF2を含む条件培地では、大きく2群に分けられることがわかった (Fig.31)。そこで次に、どのような代謝物がこれらの群を分ける要因となったかを、S-plot を用いて解析したところ (Fig.32)、コントロール条件培地と TFF2 を含む条件培地では、19 個の代謝物が有意に変動していることがわかった (Table 4)。その代謝物には、グルコースなど Opti-MEM 培地由来の化合物と思われるものがいくつか含まれており、培地由来の物質と考えられる化合物は解析対象から外すこととした。スペルミジン、プトレジンやフェニル酢酸、ヒドロキシイソ吉草酸、ヒドロキシイソ酪酸などのポリアミン系や酸性化合物が増加していることが明らかとなった。

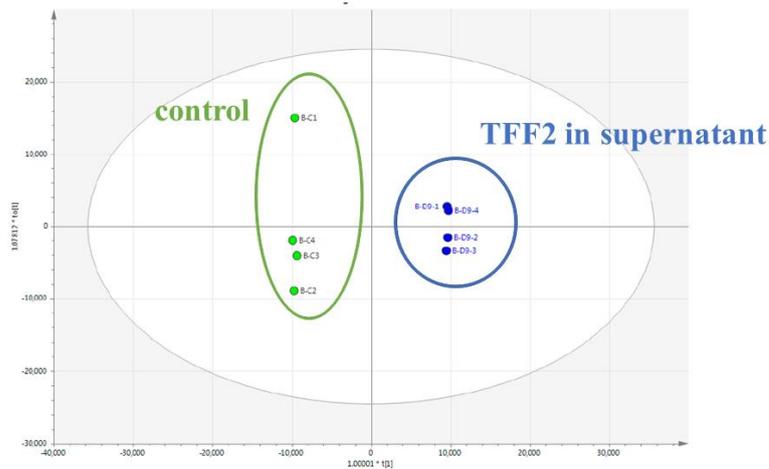


Figure 31. Multivariate analyses on secreted metabolites from DLD-1 cells reveal alteration in their compositions by the TFF2 protein-containing conditioned medium.

Metabolome analyses were carried out on extracellular secreted metabolites from mTFF2 cells and DLD-1 cells grown with Opti-MEM for 48 h. Results of multivariate analyses using PCA method on the extracellular metabolites in culture supernatants are shown in the score plot.

Eight samples are clustered into two groups, which corresponded to the control group and the TFF2 protein-containing conditioned medium group.

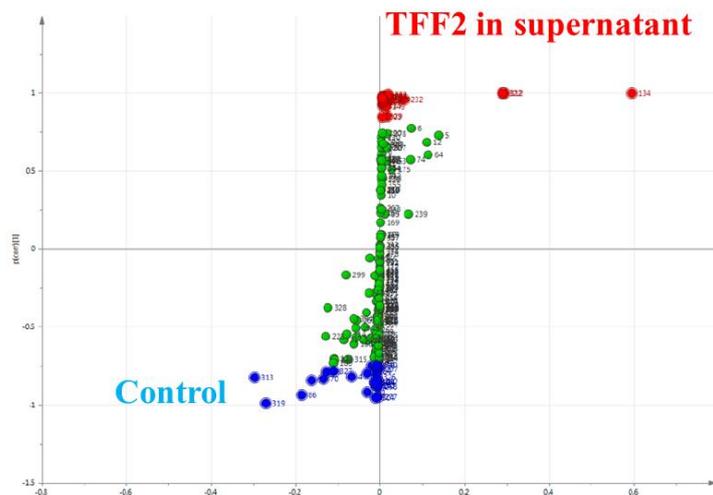


Figure 32. S-plot analyses reveal big alterations in secreted metabolites of DLD-1 cells by the TFF2 protein-containing conditioned medium. Metabolome analyses on secreted metabolites were carried out on culture supernatants of mTFF2 cells and DLD-1 cells grown with Opti-MEM. In this S-plot, single dot corresponds to one metabolite, and horizontal and vertical direction represents changes in quantity and significant differences between the two conditions, respectively, with zero at the center. Red dots indicate metabolites with high in the control conditions, while blue dots were high in TFF2-containing supernatants. Green dots mean commonly observed metabolites between the two.

Table 4. Extracellular metabolites increased in mTFF2-containing conditioned medium.

Metabolite*	p(corr)[1]
5-Oxoproline	0.999174
Glucose	0.995613
Citric acid	0.98745
2-Aminopimelic acid	0.980516
3-Phenyllactic acid	0.977011
2-Hydroxyisovaleric acid	0.976826
3-Hydroxyisovaleric acid	0.97485
Fumaric acid	0.974769
Fucose	0.973522
Homocystine	0.967102
Putrescine	0.95685
3-Hydroxyisobutyric acid	0.956519
4-Aminobutyric acid	0.952997
Spermidine	0.949463
Xylulose	0.939335
Malic acid	0.922357
2-Hydroxyglutaric acid	0.914085
3-Hydroxybutyric acid	0.847651
Ribose	0.84517

*Extracellular metabolites significantly increased in mTFF2-expressing DLD-1 cells compared with those from control DLD-1 cells were shown.

3. 考察

本章では、培地に存在する TFF2 がパラクライン的な作用として、DLD-1 細胞にどのような影響を及ぼすのか、代謝物から変動した代謝経路を探ることを目的とした。コントロール条件培地と比較して、TFF2 を含む条件培地で培養した DLD-1 細胞内に増加した代謝産物は、システイン、アラニン及びバリンなどのアミノ酸や GABA などの神経伝達物質、ワールブルク効果でも産生される乳酸であった (Table 1)。これらの代謝産物からパスウェイ解析により導き出された代謝経路としてタウリン・ヒポタウリン代謝経路、グルタチオン経路が影響を受けたことが明らかとなった (Fig.29)。さらに、第 2 章で得られたマイクロアレイデータと Table1 で得られた代謝物のデータを利用して、トランスクリプトーム/メタボローム統合解析をした結果においても、同様にタウリン・ヒポタウリン代謝経路が有意に影響を受けたことが明らかとなった (Table3)。統合解析においては、Linoleic acid metabolism (KEGG pathway: map00591) の有意な変動が見られ、ヒトの体内では合成できない必須脂肪酸であるリノール酸の代謝経路にはレシチン (ホスファチジルコリン) 経路も含まれており、細胞膜の主成分であるレシチンは、細胞膜の維持や恒常性を保つために重要な役割を担っている。第 2 章の TFF2 を含む条件培地で培養された DLD-1 細胞の遺伝子発現の網羅的解析の結果 (Fig.19B) において、細胞膜に関する遺伝子群の発現上昇がみられたことから、代謝経路においても同様の結果が得られ、分泌された TFF2 は受容する細胞の細胞膜の構成に影響を及ぼす可能性がメタボローム解析によって補完された。

タウリン生合成経路では、システインを出発代謝物として、ヒポタウリンを経由し、タウリンが合成される。タウリンの重要な働きの 1 つに抗酸化作用があると言われており [80]、その抗酸化作用のメカニズムの詳細は不明である。タウリンが、抗酸化防御の調節に関与していることや酸化剤の作用をブロックする作用を有するなど報告はいくつかあり [81]、近年では、タウリンの抗酸化作用は NADPH オキシダー

ぜによる ROS の生成を抑制することに起因することが報告された [82]。細胞において ROS は、アポトーシスの調節に関わっており、特に、がん細胞においては細胞増殖活性や悪性化に深く関与している [83]。ROS は高濃度においても低濃度においても細胞に対して毒性があり、酸化ストレスを多く受けるがん細胞は ROS の濃度を積極的に下げ、抗酸化システムを亢進させ、正常細胞のバランスに近づけていることが明らかとなっている [84,85]。つまりバランスのとれた抗酸化作用を示すがん細胞のみが生き残っているという可能性がある。分泌タンパク質である TFF2 タンパク質は、周囲の細胞内でタウリン・ヒポタウリン経路を亢進させ、酸化ストレスを受ける細胞の生存を促すように機能している可能性が考えられた。

トランスクリプトーム/メタボロームの統合解析により、グルタチオン代謝経路が有意な変動を示すことが明らかとなった。グルタチオンは、システイン、グリシン及びグルタミン酸の3つのアミノ酸から合成されるトリペプチドである。グルタチオンは過酸化水素の還元（無毒化）により細胞の恒常性を保つ上で重要な因子であり、タウリンと同じく酸化ストレス耐性や薬剤耐性などに深く関連している [86-89]。グルタチオンペルオキシダーゼは、還元型グルタチオンを基質として、脂質ペルオキシドや過酸化水素をアルコールや水に還元することで、抗酸化作用を発揮している。これらのことから、細胞外に存在する TFF2 タンパク質は、細胞が受けるストレス環境に備えて、細胞内の抗酸化状態を維持するよう促している可能性が考えられた。

次に、DLD-1 細胞内の代謝経路に影響を及ぼした TFF2 を含む条件培地中の代謝産物を解析した。培養上清中には、腫瘍の浸潤、転移の促進などの作用もあるポリアミン系のプトレジンやスペルミジンが増加していることが分かった。これらは、がん患者において多く検出される傾向があり、バイオマーカーとしての利用が期待されている化合物である [90-93]。その他、酸性化合物が多く検出されていることがわかった

(Table 4)。TFF2 を含む条件培地では微小環境中に酸性物質の分泌を促し、低 pH を維持するように働きかけていることが示唆された。

他の代謝産物では乳酸が検出しており、これはがん細胞におけるグルコースから乳酸が生成されるワールブルク効果によるものだろうと推察される。この反応により、低 pH などの腫瘍微小環境が作り出されると想像される。また、がん細胞における乳酸の蓄積は、マクロファージの浸潤を促し細胞外基質の接着性を高めることで血管新生の足場を構成することが近年明らかになった [94]。がん細胞に関わらず、細胞が低 pH の環境に晒されることは、血管新生を促すなど新たな組織形成においても重要な過程なのかもしれない。

これらの結果から、TFF2 を含む条件培地は周辺細胞にタウリン・ヒポタウリン経路やグルタチオン経路を活性化させ、抗酸化剤としての役割をもつ代謝物を増加させることで、酸化ストレス耐性を促す作用がある可能性が示唆された。しかし、その一方で、周辺環境を低 pH に保ち続けるよう、酸性化合物の産生も促していると推測された。がん細胞に限らず、組織の分化発生時にも低 pH になることが知られている。近年、細胞外基質であるフィブロネクチンは低 pH の環境において、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を促進させ、血管新生を誘導することが明らかとなった [96,97]。このことから、正常細胞においては組織の分化発生時、がん細胞においては悪性化を示す時、それぞれにおいて細胞外の環境をある一定期間低 pH に保つ必要があるのではないかと考えた。分泌された TFF2 タンパク質は、周辺細胞の生存を確保するように機能している可能性が示唆された。

今回、このようなメタボローム解析とトランスクリプトーム解析を統合することにより、生体により近い情報を得ることができた。データベースの内容は日々更新されており、今後もさらに充実してくると思われる。代謝産物によるパスウェイ解析によ

り、これまで見えてこなかった経路から新たな機能の発見に繋がる可能性があり、今後さらに注目される分野であると思われる。

4. 小括

本章では、TFF2 を含む条件培地が DLD-1 細胞の代謝系に与える影響を細胞内、培養上清それぞれの代謝産物をもとに解析を行い、以下の知見を得た。

- 1) 分泌された TFF2 が DLD-1 細胞に作用し、細胞内において、タウリン・ヒポタウリン代謝経路やグルタチオン代謝経路を有意に活性化し、抗酸化剤として、酸性ストレス耐性を促すように働きかけている可能性が示唆された。さらに、トランスクリプトーム/メタボロームの統合解析により、タウリン・ヒポタウリン代謝経路の他、細胞膜の構成に関する経路が有意に変動することが示唆された。
- 2) 培養上清中には酸性化合物が多く検出されたことから、TFF2 は微小環境を低 pH に維持継続する働きがあることが明らかとなった。

TFF2 を含む条件培地は、分泌された TFF2 タンパク質、及び二次的に変動した代謝物として協働して、酸性環境を維持しつつ、酸性ストレス下でも細胞の生存が可能になるように代謝経路の変化を促していることが示唆された。

総括

本研究では、*TFF2* 遺伝子の発現機構とタンパク質が周囲の細胞に及ぼす影響について解析を行った。第1章から第4章にかけて、酸性 pH により mRNA とタンパク質の発現が上昇したこと、*TFF2* を含む条件培地によりフィブロネクチン系遺伝子の発現が上昇したこと、*TFF2* はフィブロネクチンIII型ドメイン遺伝子群の *FNDC3B* や *FNDC5* を正に制御すること、*TFF2* を含む条件培地によりタウリン・ヒポタウリン代謝経路など酸化ストレス耐性のパスウェイを亢進させ、さらに酸性化合物などの代謝産物を細胞外に誘導したことなどを見出した [Fig.33]。

TFF2 遺伝子の機能は、これまでがん抑制・促進と相反する報告が多数上がっており、その真相については長年明らかにされていなかった [9,24-27]。分子量 12kDa の小さな分泌ペプチドが細胞内外でどのような機能を発揮しているのか、詳細は未だ謎に包まれている。発現している場所は、Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA; <http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) のデータベースによると、正常組織では胃に多く、がん組織では、大腸がん、直腸がん、すい臓がんなどにおいて有意に上昇しているものとされている。正常組織やがん組織の両方において発現が上昇している *TFF2* は、本研究により、酸性 pH の影響が深く関与していることが明らかとなった。腫瘍内部の、ワールブルグ効果や低酸素など劣悪な環境に応答して *TFF2* mRNA とタンパク質の発現が有意に上昇していることを明らかにした(第1章、Fig.6,8,10,12)。

TFF2 を含む条件培地の場合、周辺細胞は酸化ストレスに対応できるパスウェイが亢進された (第4章、Fig.29)。グルタチオンやタウリンなどが抗酸化剤として細胞内に発生した ROS を減少させ、細胞は生存し続けることができるのではないかと考えられる。一方で、*TFF2* を含む条件培地中には、クエン酸、フェニル乳酸、ヒドロキシイソ吉草酸、ヒドロキシイソ酪酸などの酸性化合物が多く存在し、周辺環境が pH に維持

継続できるよう促されていた (第 4 章、Table 4)。酸性 pH に周囲を保つことは、細胞外基質であるフィブロネクチンを安定に保ち、VEGF や VEGFR との結合を強めることで血管新生を誘導することに有利である [95,96]。これは、正常細胞においては、組織の分化発生時に必要な過程ではないかと思われる。実際に、組織の分化発生時には、一過的に酸性になることが知られており、また膵臓の発生には TFF2 タンパク質が必要であることが報告されている [27,97]。しかし、この過程は、がん細胞においては悪性化の度合いを高めることにつながる。これらのことが、TFF2 の機能としてがん促進・抑制論争を引き起こしていた原因ではないかと推測している。

腫瘍内において *TFF2* mRNA やタンパク質の高発現は、内部環境の悪化、pH の低下を占める指標になることが示唆された。TFF2 は、内部環境の変化において、がんの悪性化に寄与する細胞外基質成分であるフィブロネクチン系の発現を増加させた。特に発現上昇した *FNDC3B* や *FNDC5* 遺伝子は、PI3K/mTOR シグナルによるがんの悪性化に関与していることが明らかとなっている。また、大腸がんの線維化にも関与することが報告されており、TFF2 はフィブロネクチン系の遺伝子発現を上昇させ、浸潤や転移を促す可能性が示唆された。また、TFF2 タンパク質は酸性ストレスに応答して、細胞の生存を維持するように促す可能性を明らかにした。酸性環境下では、*TFF2* 遺伝子の発現以外に、細胞膜 (cell membrane) に関する遺伝子群の発現が誘導されていることが明らかとなった。細胞膜には酸性ストレスから保護するメカニズムがあることが報告されており、膜流動性、膜脂質組成、代謝機能の変化は、酸性環境での生存戦略として機能しているのかもしれない [62,63]。

TFF2 の研究はがん治療においてだけでなく、組織の発生分化にも貢献できる可能性があり、メカニズムの解明が今後重要になってくる。正常細胞における組織の分化発生時には、TFF2 タンパク質は分泌され細胞外基質の充実を促しているものと考えられる。*TFF2* 遺伝子の発現条件が明らかになることは、内分泌系と外分泌系の両方を有す

る膵臓の器官形成を induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞で再現できる可能性につながり、糖尿病治療にも大きく貢献できる。一方、腫瘍細胞においては、タンパク質への発現を抑制することで、悪性化の予防につながる可能性があり、加えて TFF2 の発現量を調べることは、悪性化の指標として有用となるかもしれない。本研究において TFF2 は、悪性腫瘍を抑制するための分子標的になり得ること、また、その発現には酸性 pH が関与していることを明らかにした。今後、正常組織の形態形成や腫瘍組織における TFF2 の機能解析を続けることでさらなる展望が期待できる。

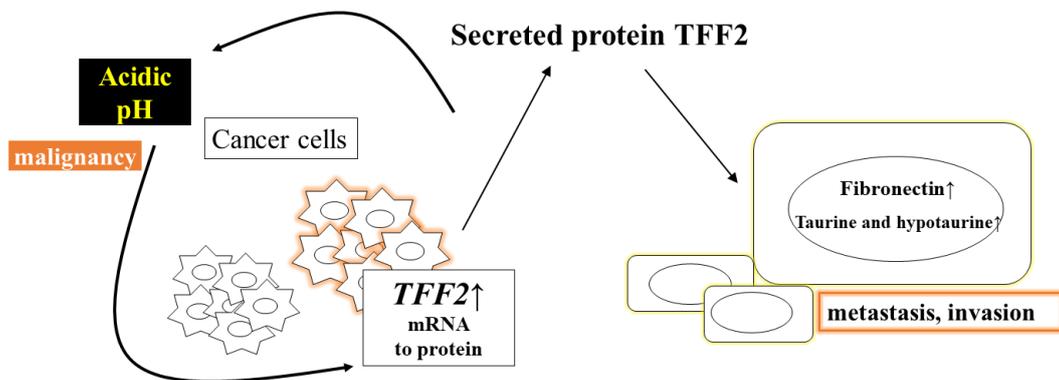


Figure 33. The mechanism of action of TFF2 in this study.

本論文は、学術誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

[1] Y. Masumoto, S. Matsuo, N. Kinjou, Y. Narieda, M. Wada, and K. Fujimoto,

The expression of trefoil factor family member 2 is increased at an acidic pH, *Oncol Lett.*, 25
(2024) 139.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、主研究指導担当教員としては4年間ご指導下さいました長崎国際大学薬学部薬学科 生化学研究室 藤本京子 准教授並びに生化学研究室 榑原隆三 特任教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、多岐に渡る助言をいただき温かく見守って下さいました副研究指導担当教員である長崎国際大学大学院薬学研究科 藤田英明 教授、並びに同研究科 和田守正 特任教授に心より御礼申し上げます。

本論文作成に際し、貴重なご教示とご高閲を賜りました長崎国際大学大学院薬学研究科 黒川健児 教授並びに同研究科 深澤昌史 教授、同研究科 田中宏光 准教授により心より感謝いたします。

大学院博士課程を修めるに当たり、終始、多大なるご助力をいただきました長崎国際大学大学院薬学研究科長 佐々木茂貴 教授、並びに同研究科専攻長 市川和洋 教授に深謝いたします。

そして、日々の研究活動に協力していただいた長崎国際大学薬学部薬学科 薬品資源学 宇都拓洋 教授、並びに同研究室の卒業生・在学生の皆様我心から御礼申し上げます。さらに本研究期間中に終始、温かい言葉をかけてくださり、励ましてくださった本学教員の方々に深謝致します。

本研究において、データ解析をしていただきました大分大学・医学部・全学研究推進機構 酒井久美子先生、株式会社セルイノベーター様には深く御礼を申し上げます。

最後にいつも陰ながら応援し、支援してくれた両親に心から感謝致します。

参考文献

- [1] Y. Masumoto, S. Matsuo, N. Kinjou, Y. Narieda, M. Wada, and K. Fujimoto, The expression of trefoil factor family member 2 is increased at an acidic pH, *Oncol Lett.*, 25 (2024) 139.
- [2] 厚生労働省 人口動態調査
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei20/index.html>
- [3] 国立がん研究センター 最新がん統計
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html 最終閲覧日 2024年8月1日
- [4] K. Katanoda, M. Hori, E. Saito, A. Shibata, Y. Ito, T. Minami, S. Ikeda, T. Suzuki, and T. Matsuda, Updated trends in cancer in Japan: incidence in 1985-2015 and mortality in 1958-2018-A sign of decrease in cancer incidence, *J Epidemiol.*, 31 (2021) 426-450,
<https://doi.org/10.2188/jea.JE20200416>
- [5] K. Fujimoto, G. Fujii, K. Taguchi, K. Yasuda, Y. Matsuo, A. Hashiyama, M. Mutoh, H. Tanaka, and M. Wada, Involvement of trefoil factor family 2 in the enlargement of intestinal tumors in *Apc^{Min/+}* mice, *Biochem Biophys Res Commun.*, 463 (2015) 859-863.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.025>
- [6] 松尾雄太, 転移関連遺伝子 Tff2 はマウス xenograft モデルにて腫瘍を増大させる, 平成 25 年度長崎国際大学薬学部薬学科卒業研究要旨集, 77-78.
- [7] E. Aihara, K.A. Engevik, and M.H. Montrose, Trefoil factor peptides and gastrointestinal function, *Annu. Rev. Physiol.* 79 (2017) 357-380. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105447>
- [8] Y. Ishibashi, H. Ohtsu, and M. Ikemura, Serum TFF1 and TFF3 but not TFF2 are higher in women with breast cancer than in women without breast cancer, *Sci. Rep.* 7 (2017) 4846.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05129-y>

[9] W. Hoffmann, Trefoil factor family (TFF) peptides and their diverse molecular functions in mucus barrier protection and more: changing the paradigm, *Int J Mol.* 21(2020) 4535.

<https://doi.org/10.3390/ijms21124535>

[10] Katoh M, Trefoil factors and human gastric cancer (review), *Int Mol Med.* 12 (2003) 3-9.

[11] W. Hoffmann, Salivary Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Roles in Oral and Esophageal Protection: Therapeutic Potential, *Int J Mol Sci.* 22 (2021) 12221.

<https://doi.org/10.3390/ijms22221222>

[12] K. Kosriwong, T. R. Menheniott, A. S. Giraud, P. Jearanaikoon, B. Sripana, T. Limpai boon. Trefoil factors: Tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2011;17:1631–1641.

doi: 10.3748/wjg.v17.i12.1631.

[13] R. Jahan, K. Ganguly, L. M. Smith, P. Atri, J. Carmicheal, Y. Sheinin, S. Rachagani, G. Natarajan, R. E. Brand, M. A. Macha, Trefoil factor(s) and CA19.9: A promising panel for early detection of pancreatic cancer. *EBioMedicine.* 2019;42:375–385.

doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.056.

[14] J. J. Farrell, D. Taupin, T. J. Koh, D. Chen, C. Zhao, D. K. Podolsky, and T. C. Wang, TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury, *J Clin Invest.* 109 (2002) 193-204.

<https://doi.org/10.1172/JCI12529>

[15] F. E. May, J. I. Semple, J. L. Newton and B. R. Westley, The human two domain trefoil protein, TFF2, is glycosylated in vivo in the stomach, *Gut.* 46 (2000) 454-459. doi:

10.1136/gut.46.4.454.

[16] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science,* 123 (1956) 309-314,

<https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

- [17] M. G. V. Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, 324 (2009) 1029-1033, <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- [18] N. Hay, Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?, *Nat Rev Cancer*. 16 (2016) 635-649, <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.770epub>
- [19] K. Satoh, S. Yachida, M. Sugimoto, M. Oshima, T. Nakagawa, S. Akamoto, S. Tabata, K. Saitoh, K. Kato, S. Sato, K. Igarashi, Y. Aizawa, R. Kajino-Sakamoto, Y. Kojima, T. Fujishita, A. Enomoto, A. Hirayama, T. Ishikawa, M. M. Taketo, Y. Kushida, R. Haba, K. Okano, M. Tomita, Y. Suzuki, S. Fukuda, M. Aoki, and T. Soga, Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114 (2017) E7697-E7706, <https://doi.org/10.1073/pnas.1710366114>
- [20] R. A. Cairns, I. S. Harris, and T. W. Mak, Regulation of cancer cell metabolism, *Nat Rev Cancer*. 11 (2011) 85-95, <https://doi.org/10.1038/nrc2981>.
- [21] G. L. Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, 3 (2003) 721-732, <https://doi.org/10.1038/nrc1187>
- [22] C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe, Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system, *Nat Med*, 9 (2003) 677-684, <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>
- [23] C. Hernández, E. Santamatilde, K. J. McCreath, A. M. Cervera, I. Cervera, D. Ortiz-Masiá, N. Martínez, S. Calatayud, J.V. Esplugues and M.D. Barrachina, Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing, *British journal of pharmacology*. 156 (2009) 262-272.
doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00044.x.
- [24] K. Kosrimong, T. R. Menhenniott, A. S. Giraud, P. Jearanaikoon, B. Sripa, and T. Limpai boon, Trefoil factor: Tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK

activation in cholangiocarcinoma, *World J Gastroenterol.* 17 (2011) 1631-1641.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1631>

[25] S. Im, C. Yoo, J. H. Jung, H. J. Choi, J. Yoo and C. S. Kang, Reduced expression of TFF1 and increased expression of TFF3 in gastric cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis, *International journal of medical sciences.*10 (2013) 133-140.

doi: 10.7150/ijms.5500.

[26] E. H. Jin, S. I. Lee, J. Kim, E.Y. Seo, S. Y. Lee, G. M. Hur, S. Shin and J. H. Hong, Association between Promoter Polymorphisms of TFF1, TFF2, and TFF3 and the Risk of Gastric and Diffuse Gastric Cancers in a Korean Population, *Journal of Korean medical science.* 30 (2015) 1035-1041. doi: 10.3346/jkms.2015.30.8.1035.

[27] K. Hirata, S. Kodama, Y. Nakano, Y. Minaki-Nakagawa, Y. Aoyama, M. Sakikubo, T. Goto, M. Yoshida, T. Masui, T. Yamamoto, S. Uemoto, and Y. Kawaguchi, Exocrine tissue-driven TFF2 prevents apoptotic cell death of endocrine lineage during pancreas organogenesis, *Nature.* 1636 (2019). <http://doi.org/10.1038/s41598-018-38062-9>

[28] G. Sung, H. Chang, J. Lee, S. Y. Song, and H. Kim, Pancreatic-cancer-cell-derived trefoil factor 2 impairs maturation and migration of human monocyte-derived dendritic cells in vitro, *Anim. Cells Syst. (Seoul).* 22 (2018) 368–381. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1527721>

[29] G. Yu, P. Jiang, Y. Xiang, Y. Zhang, Z. Zhu, C. Zhang, S. Lee, W. Lee, and Y. Zhang, Increased expression of protease-activated receptor 4 and trefoil factor 2 in human colorectal cancer, *PLoS One.* 10 (2015) e0122678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122678>

[30] S. Kamlua, S. Patrakitkomjorn, P. Jearanaikoon, T. R. Menheniott, A. S. Giraud, and T. Limpai boon, A novel TFF2 splice variant (Δ EX2TFF2) correlates with long overall survival time in cholangiocarcinoma, *Oncol Rep.* 27 (2012) 1207-1212.

<https://doi.org/10.3892/or.2011.1583>

- [31] Reference expression dataset, <https://refex.dbcls.jp/>
- [32] Y. Funato, A. Yoshida, Y. Hirata, O. Hashizume, D. Yamazaki, and H. Miki, The Oncogenic PRL protein causes acid addiction of cells by stimulating lysosomal exocytosis, *Developmental Cell*, 55 (2020) 387-397. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.08009>
- [33] So JY, Ohm J, Lipkowitz S, Yang L. Triple negative breast cancer (TNBC): Non-genetic tumor heterogeneity and immune microenvironment: Emerging treatment options. *Pharmacol Ther.* 2022;237:108253. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108253.
- [34] Qu Y, Yang Y, Ma D, Xiao W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol Rep.* 2012;27:1277–1283. doi: 10.3892/or.2012.1627.
- [35] Minegishi K, Dobashi Y, Koyama T, Ishibashi Y, Furuya M, Tsubochi H, Ohmoto Y, Yasuda T, Nomura S. Diagnostic utility of trefoil factor families for the early detection of lung cancer and their correlation with tissue expression. *Oncol Lett.* 2023;25:139. doi: 10.3892/ol.2023.13725.
- [36] Pentheroudakis G, Kotoula V, Fountzilas E, Kouvatseas G, Basdanis G, Xanthakis I, Makatsoris T, Charalambous E, Papamichael D, Samantas E, et al. A study of gene expression markers for predictive significance for bevacizumab benefit in patients with metastatic colon cancer: A translational research study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) *BMC Cancer.* 2014;14:111. doi: 10.1186/1471-2407-14-111.
- [37] K. Otsuka, Y. Yamamoto, and T. Ochiya, Uncovering temperature-dependent extracellular vesicle secretion in breast cancer, *J. Extracell. Vesicles.* 10 (2020) e12049. <https://doi.org/10.1002/jev2.12049>
- [38] Pitt MA. Increased temperature and entropy production in cancer: The role of anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacology.* 2015;23:17–20. doi: 10.1007/s10787-014-0224-x.

[39] I.K.N. Pettersen, D. Tusubira, and H. Ashrafi, Upregulated PDK4 expression is a sensitive marker of increased fatty acid oxidation, *Mitochondrion*. 49 (2019) 97–110.

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.009>

[40] J. Landry, D. Bernier, P. Chrétien, L. Nicole, R. M. Tanguay, and N. Marceau, Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance, *Cancer Res*. 42 (1982) 2457–2461.

[41] Nogueira-Librelotto DR, Scheeren LE, Macedo LB, Vinardell MP, Rolim CMB. pH-sensitive chitosan-tripolyphosphate nanoparticles increase doxorubicin-induced growth inhibition of cervical HeLa tumor cells by apoptosis and cell cycle modulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;190:110897. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110897.

[42] W. Hoffmann, Trefoil factor family (TFF) peptides and their diverse molecular functions in mucus barrier protection and more: Changing the paradigm, *Int. J. Mol. Sci*. 25 (2020) 4535. <https://doi.org/10.3390/ijms21124535>

[43] M.A. Pitt, Increased temperature and entropy production in cancer: the role of anti-inflammatory drugs, *Inflammopharmacology*. 23 (2015) 17-20. <https://10.1007/s10787-014-0224-x>

[44] Szlase W, Zendran I, Zalesińska A, Tarek M, Kulbacka J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 2020;52:321–342. doi: 10.1007/s10863-020-09846-4.

[45] G. Yu, P. Jiang, Y. Xiang, Y. Zhang, Z. Zhu, C. Zhang, S. Lee, W. Lee, and Y. Zhang, Increased expression of protease-activated receptor 4 and trefoil factor 2 in human colorectal cancer, *PLoS One*. 10 (2015) e0122678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122678>

[46] M.K. Gala, T. Austin, S. Ogino, and A. T. Chan, TFF2-CXCR4 axis is associated with BRAF V600E Colon Cancer, *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 8 (2015) 614–619.

<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0444>

- [47] D. R. Donohoe, L. B. Collins, A. Wali, R. Bigler, W. Sun and S. J. Bultman, The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation, *Molecular cell*. 48 (2012) 612-626. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.033.
- [48] A. Hague, D. J. Elder, D. J. Hicks and C. Paraskeva, Apoptosis in colorectal tumor cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate, *International journal of cancer*. 60 (1995) 400-406. doi: 10.1002/ijc.2910600322.
- [49] H. Arshad, Z. Patel, M. Mehrabian, M. E. C. Bourkas, Z. A. M. Al-Azzawi, G. Schmitt-Ulms, and J. C. Watts, The aminoglycoside G418 hinders de novo prion infection in cultured cells, *J Biol Chem*, 297 (2021) 101073. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101073>
- [50] T. Date, T. Kato, J. Kato, H. Takahashi, K. Morikawa, D. Akazawa, A. Murayama, K. Tanaka-Kaneko, T. Sata, Y. Tanaka, M. Mizokami, and T. Wakita, Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis c virus infectious clone, *J Virol*, 86 (2012) 10805-10820. <https://doi.org/10.1128/JVI.07235-11>
- [51] E. Miyahara, T. Nishikawa, T. Takeuchi, K. Yasuda, Y. Okamoto, Y. Kawano, and M. Horiuchi, Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1,2,4-benzenetriol, *Toxicology*. 317 (2014) 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.01.007>.
- [52] J. Fishman, J. Schneider, R. J. Hershcope, and H. L. Bradlow, Increased estradiol-16 alpha-hydroxylase activity in woman with breast and endometrial cancer, *J Steroid Biochem*, 20 (1984) 1077-1081. <https://doi.org/10.1016/0022-4731>
- [53] M. P. Osborne, H. L. Bradlow, G. Y. Wong, and N. T. Telang, Upregulation of estradiol C16 alpha-hydroxylation in human breast tissue: a potential biomarker of breast cancer risk, *J Natl Cancer Inst*, 85 (1993) 1917-1920. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.23.1917>

- [54] G. E Swaneck, and J. Fishman, Covalent binding of the endogenous estrogen 16 alpha-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 (1988) 7831-7835.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7831>
- [55] H. L. Bradlow, R. J. Herschopf, C. P. Martucci, and J. Fishman, Estradiol 16 alpha-hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: a possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans, *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 (1985) 6295-6299. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.18.6295>
- [56] H. L. Bradlow, R. E. Herschopf, and J. F. Fishman, Oestradiol 16 alpha-hydroxylase: a risk marker for breast cancer, *Cancer Surv*, 5 (1986) 573-583.
- [57] L. Siu, H. Romanska, P. D. Abel, M. Baus-Loncar, T. Kayademir, G. W. H. Stamp, and E. Lalani, TFF (trefoil family factor 2) inhibits apoptosis in breast and colorectal cancer cell lines, *Peptides*, 25 (2004) 855-863. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.11.023>
- [58] F. E. B. May, J. I. Semple, S. J. Prest, and B. R. Westley, Expression and motogenic activity of TFF2 in human breast cancer cells, *Peptides*, 25 (2004) 865-872.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.12.024>
- [59] Y. Park, J. Jeong. S. Seong, and W. Kim, In silico evaluation of natural compounds for an acidic extracellular environment in human breast cancer, *Cells*, 10 (2021) 2673.
<https://doi.org/10.3390/cells10102673>
- [60] Y. Lv, X. Wang, X. Li, G. Xu, Y. Bai, J. Wu, Y. Piao, Y. Shi, R. Xiang, and L. Wang, Nucleotide de novo synthesis increases breast cancer stemness and metastasis via cGMP-PMG-MARK signaling pathway, *PLoS Biol*, 18 (2020) e3000872.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000872>

- [61] L. B. Bergantin, A Hypothesis for the relationship between depression and cancer: role of Ca²⁺/cAMP signaling, *Anticancer Agents Med Chem*, 20 (2020) 777-782.
<https://doi.org/10.2174/1871520620666200220113817>
- [62] C. Wu, J. Zhang, M. Wang, G. Du, and J. Chen, Lactobacillus casei combats acid stress by maintaining cell membrane functionality, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012) 1031–1039.
<https://doi.org/10.1007/s10295-012-1104-2>
- [63] N. Guan, and L. Liu, Microbial response to acid stress: mechanisms and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 51–65. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>.
- [64] J.W. Rick, A. Chandra, and C.D. Ore, Fibronectin in malignancy: cancer-specific alterations, protumoral effects, and therapeutic implications, *Semin. Oncol.* 46 (2019) 284–290.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.08.002>
- [65] A.K. Mitra, K. Sawada, and P. Tiwari, Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and α (5) β (1) -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis, *Oncogene*. 30 (2011) 1566–1576. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.532>
- [66] K.M. Burton, H. Cao, J. Chen, L. Qiang, E. W. Krueger, K. M. Johnson, W. R. Bamlet, L. Zhang, M. A. McNiven, and G. L. Razidlo, Dynamin 2 interacts with α -actinin 4 to drive tumor cell invasion, *Mol Biol Cell*. 31 (2020) 439-451. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-07-0395>
- [67] K. Honda, The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer, *Cell Biosci.* 5 (2015) 41. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0031-0>
- [68] J. Wang, R. Li, M. Li, and C. Wang, Fibronectin and colorectal cancer: signaling pathways and clinical implications, *J Recept Signal Transduct Res*, 41 (2021) 313-320.
<https://doi.org/10.1080/10799893.2020.18170074>
- [69] H. Kirikoshi, and M. Katoh, Expression of TFF1, TFF2 and TFF3 in gastric cancer, *Int. J. of Oncology*, 21 (2002) 655-659

[70] I. Leduc, C. D. White, I. Nepluev, R. E. Throm, S. M. Spinola, and C. Elkins, Outer membrane protein DsrA is the major fibronectin-binding determinant of *Haemophilus ducreyi*, *Infect Immun*, 76 (2008) <https://doi.org/10.1128/IAI.00994-07>

[71] Y. Li, J. Yang, H. Wang, W. Qiao, Y. Guo, S. Zhang, and Y. Guo, FNDC3B, targeted by miR-125a-5p and miR-217, promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells via PI3K/mTOR signaling, *Onco Targets Ther*, 13 (2020) 3501-3510. <https://doi.org/10.2147/OTT.S226520>

[72] L. Zhang, H. Yu, T. Deng, L. Ling, J. Wen, M. Lv, R. Ou, Q. Wang, and Y. Xu, FNDC3B and BPGM are involved in human papillomavirus-mediated carcinogenesis of cervical cancer, *Front Oncol*, 11 (2021) 783868. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.783868>

[73] Y. Li, Y. Tang, Z. Li, G. Hou, and X. Du, CrecSOS2 promotes cervical squamous cell carcinoma by regulation of proliferation, cell cycle, apoptosis, migration, invasion, and glycolysis by targeting miR-543/FNDC3B axis, *Arch Biochem Biophys*, 708 (2021) 108925. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108925>

[74] K. Cebulski, K. Nowińska, K. Jabłońska, H. Romanowicz, B. Smolarz, P. Dziegiel, and M. Podhorska-Okolow, Expression of IRISIN / FNDC5 in breast cancer, *Int Mol Sci*, 23 (2022) 3530. <https://doi.org/10.3390/ijms23073530>

[75] M. E. Ejeda, P. Canto, A. Tenorio-Torres, L. Orozco-Arguelles, R. M. Coral-Vázquez, A. Zentella-Dehesa, M. Leal-García, C. C. Vega-García, V. Bautista-Piña, and J. P. Méndez., Increased FNDC5 / IRISIN protein expression in breast cancer tissue is associated with obesity in postmenopausal women, *J Clin Pathol*, 3 (2021) 207249. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-207249>

- [76] K. Komolka, E. Albrecht, L. Schering, J. Brenmoehl, A. Hoeflich, and S. Maak, Locus characterization and gene expression of bovine FNDC5: is the myokine irisin relevant in cattle?, *PLoS One*, 3 (2014) e88060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088060>.
- [77] D. Bullinger, H. Neubauer, T. Fehm, S. Laufer, C. H. Gleiter, and B. Kammerer, Metabolic signature of breast cancer cell line MCF-7: profiling of modified nucleosides via LC-IT MS coupling, *BMC Biochem*, 8 (2007) <https://doi.org/10.1186/1471-2091-8-25>
- [78] G. L. Semenza, HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations, *The Journal of clinical investigation*, 9 (2013) 3664-3671. <https://doi.org/10.1172/JCI67230>
- [79] M. Nishiuchi, K. Sakai, H. Tajima, K. Katayama, F. Kimura, S. Hoshi, T. Goto, H. Shirakawa and M. Komai, Orexigenic action of oral zinc: metabolomic analysis in the rat hypothalamus, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82 (2018) 2168-2175.
- [80] C. J. Jong, J. Azuma, and S. Schaffer, Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production, *Amino Acids*, 42 (2012) 2223-2232. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0962-7>
- [81] S. W. Schaffer, J. Azuma, and M. Mozaffarri, Role of antioxidant activity of taurine in diabetes, *Canadian of physiology and pharmacology*, 87 (2009) 91-99. doi: 10.1139/Y08-110.
- [82] K. Shimada, C. J. Jong, K. Takahashi, and S. W. Schaffer, Role of ROS production and turnover in the antioxidant activity of taurine, *Can J Physiol Pharmacol*, 87 (2009) 91-99. <https://doi.org/10.1139/Y08-110>
- [83] Q. Cui, J. Wang, Y. G. Assaraf, L. Ren, P. Gupta, L. Wei, C. R. Ashby Jr, D. Yang, and Z. Chen, Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer, *Dryg Resist Updat*, 41 (2018) 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.11.001>

- [84] P. L. de Sá Junior, D. A. D. Câmara, A. S. Porcacchia, P. M. M. Fonseca, S. D. Jorge, R. P. Araldi, and A. K. Ferreira, The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy, *Oxid Med Cell Longev*, (2017) 2467940. <https://doi.org/10.1155/2017/2467940>
- [85] J. N. Moloney, and T. G. Cotter, ROS signaling in the biology of cancer, *Semin Cell Dev Biol*, 80 (2018) 50-64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- [86] S. C. Lu, Glutathione synthesis, *Biochim Biophys Acta*, 1830 (2013) 3143-3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- [87] J. D. Hayes, and L. I. McLellan, Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated dependence against oxidative stress, *Free Radic Res*, 31 (1999) 273-300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>
- [88] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 39 (2007) 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- [89] N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A. L. Furfaro, M. A. Pronzato, U. M. Marinari, and C. Domenicotti, Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance, *Oxid Med Cell Longev*, (2013) 972913. <https://doi.org/10.1155/2013/972913>
- [90] L. Willmann, T. Erbes, S. Halbach, T. Brummer, M. Jäger, M. Hirschfeld, T. Fehm, H. Neubauer, E. Stickeler, and B. Kammerer, Exometabolom analysis of breast cancer cell lines: metabolic signature, *Sci Rep*, 5 (2015) 13374. <https://doi.org/10.1038/srep13374>
- [91] D.C. Tormey, T.P. Waalkes, K. C. Kuo, and C. W. Gehrke, Biologic markers in breast carcinoma: clinical correlations with urinary polyamines, *Cancer*, 46 (1980) 741-747. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19800815\)46:4<741::aid-cnrcr2820460418>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19800815)46:4<741::aid-cnrcr2820460418>3.0.co;2-7)
- [92] F. Dreyfuss, R. Chayen, G. Dreyfuss, R. Chayen, G. Dreyfuss, R. Dvir, and J. Ratan, Polyamine excretion in the urine of cancer patients, *Isr J Med Sci*, 11 (1975) 785-795

- [93] J. Savory, and J. R. Shipe, Serum and urine polyamines in cancer, *Ann Clin Lab Sci*, 5 (1975) 110-114.
- [94] J. Song, K. Lee, S. W. Park, H. Chung, D. Jung, Y. R. Na, H. Quan, C. S. Cho, J. Che, J. H. Kim, J. Park, and S. H. Seok, Lactic acid upregulates VEGF expression in macrophages and facilitates choroidal neovascularization, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 59 (2018) 3747-3754.
<https://doi.org/10.1167/iovs.18-23892>
- [95] M. Uselli, T. Meyer, R. Mezzenga, and M. Mitsi, VEGF and VEGFR2 bind to similar pH-sensitive sites on fibronectin, exposed by heparin-mediated conformational changes, *J Biol Chem*, 296 (2021) 100584. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100584>
- [96] D. Tsiros, C. E. Sheehy, S. Pecchia, and M. A. Nugent, Heparin potentiates Avastin-mediated inhibition of VEGF binding to fibronectin and rescues Avastin activity at acidic pH, *J Biol Chem*, 294 (2019) 17603-17611
- [97] M. Oginuma, Y. Harima, O. A. Tarazona, M. Diaz-Cuadros, A. Michaut, T. Ishitani, F. Xiong, and O. Pourquié, Intracellular pH controls WNT downstream of glycolysis in amniote embryos, *Nature*. 584 (2020) 98-101. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2428-0>