

表 題 PSD遺伝子の異常メチル化に伴うRac1の不活化と潰瘍性大炎関連大腸癌の癌化についての検討

論文の区分 課程博士

著 者 名 加藤高晴

担当指導教員氏名 力山敏樹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
総合医学 分野
外科系総合医学

2014年1月10日申請の学位論文

目次

はじめに	p.2-7
研究対象と方法	p.8-19
結果	p.20-32
考察	p.33-39
結論	p.40
謝辞	p.41
参考文献	p.42-46

はじめに

潰瘍性大腸炎は、主に大腸粘膜に潰瘍やびらんができる原因不明の非特異性炎症性疾患である。平成24年度の厚生労働省の統計によれば罹患者数は143,733人で、人口10万人に対して112.7人の割合で罹患している。厚生労働省の特定疾患(難病)に指定され、罹患者数は特定疾患の中で最も多い。慢性的な大腸炎の経過をたどり、罹病期間とともに大腸癌の発生率が上昇する。累積癌化率は10年で0～5%、20年で8～23%、30年で17.8～30%と推定され¹⁻³、通常型散発性大腸癌より高い。近年の潰瘍性大腸炎に対する治療の進歩により、原疾患による死亡は減少し、併発する大腸癌が患者の予後を規定するようになった。そのため潰瘍性大腸炎の経過中に併発する大腸癌の早期発見が重要な課題となる。

潰瘍性大腸炎の大腸癌発生率が高い原因として、慢性肝炎やヘリコバクターピロリ胃炎と同様に慢性炎症の関与が示唆されている^{4,7}。慢性炎症に伴う発癌過程においては、癌部のみならず、非癌部においてもp16やE-cadherin等の癌関連遺伝子のDNAメチル化異常が観察されており、癌化の背景に遺伝子修飾異常が強く関与していると考えられる^{8,9}。潰瘍性大腸炎の発癌経路は通常型散発性大腸癌とは異なるため^{10,11}、潰瘍性大腸炎特有のDNAメチル化異常の関与が予測される。

そこで、潰瘍性大腸炎の発がんに関与するメチル化プロファイルを明らかにするため、これまで我々はDNAメチル化異常の網羅的検索を行ってきた。その手段としてMethylation sensitive amplified fragment length polymorphism

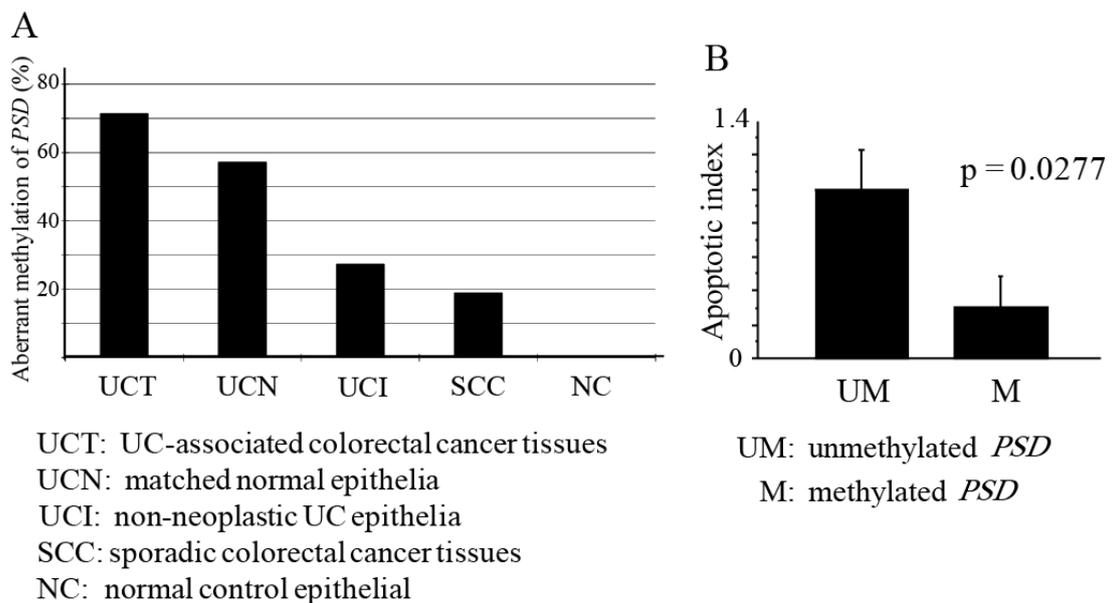
(MS-AFLP)法を用いた。MS-AFLP法は、AFLP法で用いられている制限酵素の代わりにメチル化感受性制限酵素 NotI (GCGGCCGC) を利用し、ゲノム中のCG領域のメチル化の異常を網羅的に検索する方法である¹²⁻¹⁴。このMS-AFLP法を用いて、潰瘍性大腸炎関連大腸癌の担癌症例の癌部において高度にメチル化している23遺伝子を同定した¹⁵。そのひとつである*PSD (Pleckstrin and Sec7*

*domain-containing)*遺伝子はグアニンヌクレオチド結合蛋白質 (G蛋白質) に結合しているGuanosine diphosphate (GDP)を外してGuanosine triphosphate (GTP)に変換させるGuanine nucleotide exchange factor (GEF) である。GTP を結合させG蛋白質を活性化させる事により細胞膜のエンドサイトーシス、細胞骨格の再編成を司り、細胞間接着、融合、浸潤、移動、貪食など多岐にわたる作用に関わっている^{16,17}。他の網羅的異常メチル化検索法(methylation-sensitive representational difference analysis; MS-RDA法)でも同様に、*PSD*遺伝子に異常メチル化が検出されたため、我々はこの遺伝子に注目した。

これまでの検討から、*PSD*遺伝子のメチル化の程度が潰瘍性大腸炎の発癌過程において段階的に上昇しており、それに伴いアポトーシスの誘導が阻害され

ている事が明らかになった(図1)¹⁵。

図1 潰瘍性大腸炎の発癌過程における*PSD*遺伝子の異常メチル化の頻度とアポトーシスの関係



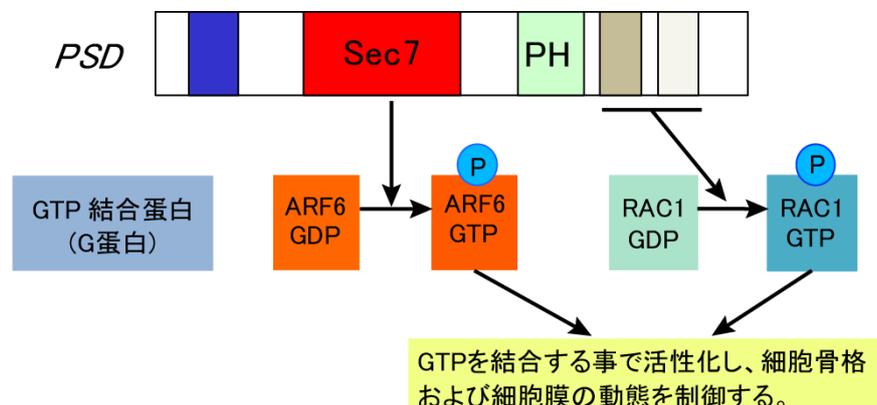
Int J Oncol. 40: 686-694, 2012より転載、改変(15)

*PSD*遺伝子は、潰瘍性大腸炎関連大腸癌で高度にメチル化されその発現が抑制されているが、散発性大腸癌や潰瘍性大腸炎の非担癌症例の大腸粘膜ではメチル化の頻度は低い。従って*PSD*遺伝子の異常メチル化は通常型大腸癌の発癌には関与せず、また潰瘍性大腸炎の慢性炎症の結果でもなく、潰瘍性大腸炎の発癌過程に特有な遺伝子の変化であると考えられる。潰瘍性大腸炎の慢性炎症の過程で修復不能に陥った細胞に対して、*PSD*遺伝子はアポトーシスを誘導す

る事で潜在的な癌化を防いでいる腫瘍抑制遺伝子である可能性が示唆されるが、
これまで*PSD*遺伝子の不活化と癌化を関連づける報告はない。

*PSD*遺伝子はG蛋白質に結合しこれを活性化させる。*PSD*遺伝子には各種ドメインがあり、Sec7ドメインはG蛋白質（グアニンヌクレオチド結合蛋白質：GTP結合蛋白質）のひとつであるARF6 (ADP-ribosylation factor 6)が結合しているGDPをGTPに変換する事でARF6を活性化させる。またC末側のドメインは、異なるG蛋白質、Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate1) を活性化させる(図2)^{16,17}。*PSD*遺伝子の不活化によりG蛋白質の細胞内輸送が妨げられることが報告されている¹⁶。

図2 *PSD*遺伝子の構成および下流に位置する蛋白質



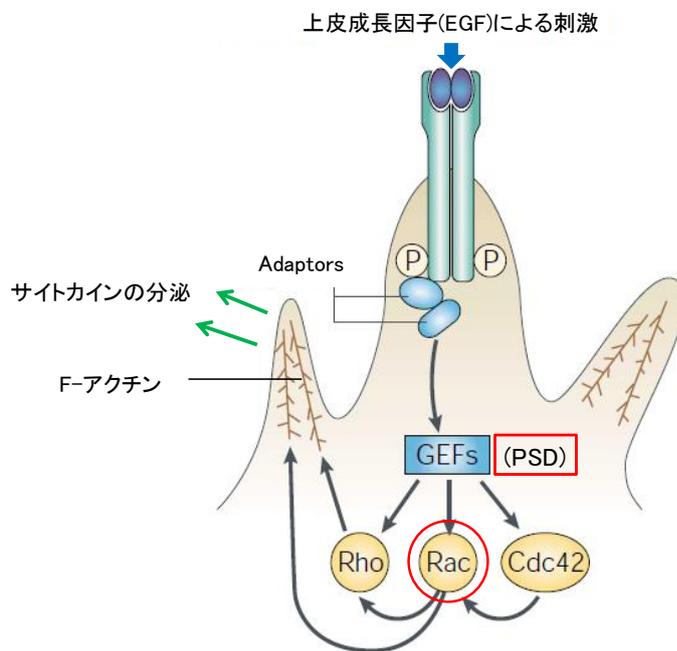
Embo J. 18: 1480-1491, 1999より転載、改変(16)

Rac1はPSDの下流に位置する蛋白質で、各種ストレス刺激で活性化され、種々の免疫応答に関与する事が報告されている。すなわちアポトーシスの誘導や、炎症刺激により好中球遊走能獲得や活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)の産生などの機能調節をする事が報告されている^{16,18-20}。Rac1は炎症刺激により好中球遊走能を促しアポトーシスを誘導すると考えられ、これらの機序からRac1の不活化が発癌に関与している事が示唆される^{21,22}。また、PSD自身も上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF)刺激によってRac1およびその下流に位置するF-アクチンを活性化する機能を有する。F-アクチンは細胞骨格を構成するアクチンフィラメントの一種であり、この活性化が免疫応答に関与する事が報告されている (図3)^{16,17}。

本研究ではこのRac1蛋白質に注目し、メチル化によるPSD遺伝子の不活化がRac1の働きに及ぼす影響を検討し、PSD遺伝子の異常メチル化を介する潰瘍性大腸炎の発癌のメカニズムを明らかにする。

図3 上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF)刺激に対する

PSD-Rac1-F-アクチン経路の活性化



Nat Rev Mol Cell Biol. 2: 578-588, 2001 より転載、改変(17)

研究対象と方法

細胞株

正常ヒト皮膚線維芽細胞株(normal human dermal fibroblasts ; NHDF)、好中球の培養細胞系モデルとして知られているヒト前骨髄性白血病由来細胞株 (human promyelocytic leukemia; HL-60)²³⁻²⁵ を用いた。NHDFはクラボ、HL-60は理研の細胞バンクより購入した。

Total RNA 抽出とcDNA合成

NHDF、HL-60 の細胞株から、Illustra RNA spin Mini Kit (GEヘルスケア社製) を用い、total RNAを抽出した。Bioanalyzer (Agilent technologies社製)を用いて RNA IntegrityNumber (RIN値)を算出し、RIN値が6以上の検体を検討に用いた。その後速やかにHigh Capacity RNA to cDNA kit (Applied biosystems社製)を用いて標準プロトコル通りにcDNAを合成した。反応条件は2X RT Buffer 10 μ l, 20X RT Enzyme Mix 1 μ l, total RNA (1 μ g)9 μ l 計20 μ lの系で行った。逆転写反応は、37 $^{\circ}$ C、60分間行い、その後95 $^{\circ}$ C、30秒の熱処理で酵素を失活させた。

リアルタイムRT-PCR法を用いた遺伝子発現の定量

遺伝子発現の定量は7900HT Real-Time PCR System Data Analysis Software (Applied biosystems社製)を用い、リアルタイムRT-PCR法で行った。反応条件は、1反応あたりcDNA Template (50ng)9 μ l, 20X TaqMan Gene Expression Assays (Applied biosystems社製)1 μ l, 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied biosystems社製) 10 μ lの合計20 μ lの系で行った。反応温度は最初の編成ステップとして95 $^{\circ}$ C 10分間行い、その後95 $^{\circ}$ C 15秒, 60 $^{\circ}$ C 1分間を40サイクル行った。内在性コントロールとしてGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。用いたプライマーセットは以下の通りである。

プライマーセット

Forward: 5' CCATAGACGAGGAGGAGCTG 3'

Reverse: 5' TCTTCCTGCAGTCAGGGTCT 3'

Small interfering RNA(siRNA)法によるPSD遺伝子発現抑制

NHDFにLipofection 法を用いてPSD-siRNA (siPSD)を遺伝子導入した。NHDF (1x10⁵個)を30-50% confluentまで培養し、Lipofectamine 2000 Reagent (invitrogen社製)1 μ l/50 μ lとdouble strand RNA(dsRNA)oligo50pmol/50 μ lを添加した。dsRNAはPSD遺伝子と相同なセンスRNAとアンチセンスRNAからなる二本鎖

RNA3種類を用いその配列は以下に示した。標的遺伝子陰性コントロール (siControl)にScrambled Negative Control Stealth RNA (invitrogen社製)を使用した。

PSD Line No.1

Forward: 5' AAGACAAAGAACUUGAGGUACUCCC 3'

Reverse: 5' GGGAGUACCUCAAGUUCUUUGUCUU 3'

PSD Line No.2

Forward: 5' UAGAGGAUCAUGCCCUUGAGGAUCC 3'

Reverse: 5' GGAUCCUCAAGGGCAUGAUCCUCUA 3'

PSD Line No.3

Forward: 5' AUUGAUGCGAGUGAUCCAGGACUGC 3'

Reverse: 5' GCAGUCCUGGAUCACUCGCAUCAAU 3'

活性型Rac1の測定

Rac1活性の測定にはG-LISA™ Rac Activation Assay Biochem kit™ (Cytoskelton社製)を用いた。siRNAあるいはsiControlで処理したNHDFをEGF (10 ng/ml for 1, 2 and 30 min)で刺激した (図4)。それを氷上で100µlのlysis bufferで溶解、遠心し細胞残屑を除去した。50µlのbindingバッファーで希釈した後、同キットに含まれるPrecision Red™ Advanced Protein Assay Reagentを用いて蛋白質を抽出した。

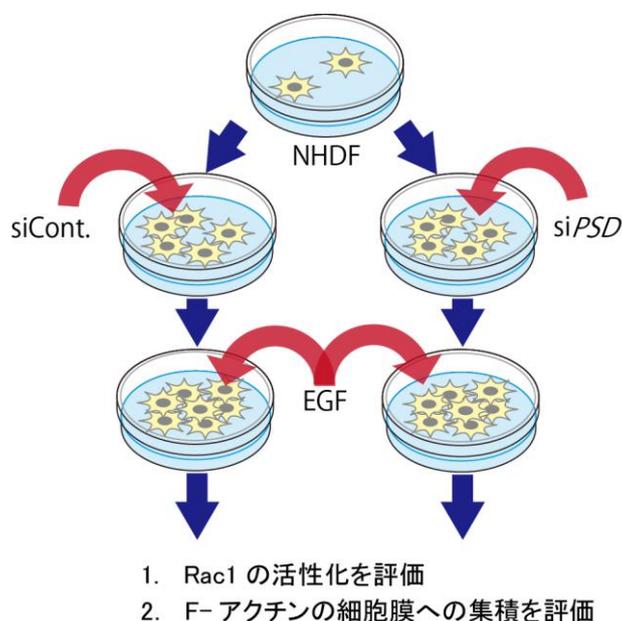
50 μ lの溶解物をRac1-binding plateのウェルにアプライしmicroplate shakerで4 $^{\circ}$ C 30分間振盪した。次いで、洗浄液でウェルを二度洗浄し、抗原含有バッファーを加え室温で2分インキュベートした。その後ウェルを3回洗浄し、50 μ lの抗Rac1一次抗体を加えmicroplate shakerで45分間振盪した。さらに、同キットに含まれる50 μ lの二次抗体を加えて45分間振盪後50 μ lのHRP detection試薬を加え20分間インキュベートした。50 μ lのHRP Stopバッファーを加え、すぐにmicroplate spectrophotometerで吸光度を測定した。

Actin filament (F-アクチン)解析

F-アクチンの検出には、Visualization BiochemKitTM (Cytoskelton社製)を用いた。siRNAあるいはsiControlで処理したNHDFをEGF (10 ng/ml for 1, 2 and 30 min)で刺激した(図4)。その後ローダミンでラベル化したファロイジンでF-アクチンを蛍光染色した。核はHoechst 33342で染色した。蛍光の観察は、励起/蛍光スペクトル(535nm/585nm)でローダミンを、(365nm/480nm)でHoechst 33342をそれぞれ観察した。EGFはWako社製、Hoechst 33342はTotal ROS/Superoxide Detection kitTM (Enzo社製)を利用した。F-アクチンの細胞膜への集積の判定は蛍光顕微鏡下の観察で行った。線維芽細胞の細胞膜側へローダミンの集積を認めたものをF-アクチンの集積有りとし、ローダミンが細胞内に留まったままの状態を集積

なしと判定した。3視野で判定を行いF-アクチンの集積を認める細胞の割合を計算し、*PSD*遺伝子発現の有無で比較した。

図4 siRNA導入工程 (*Rac1*の活性化とF-アクチンの細胞膜への集積を評価)



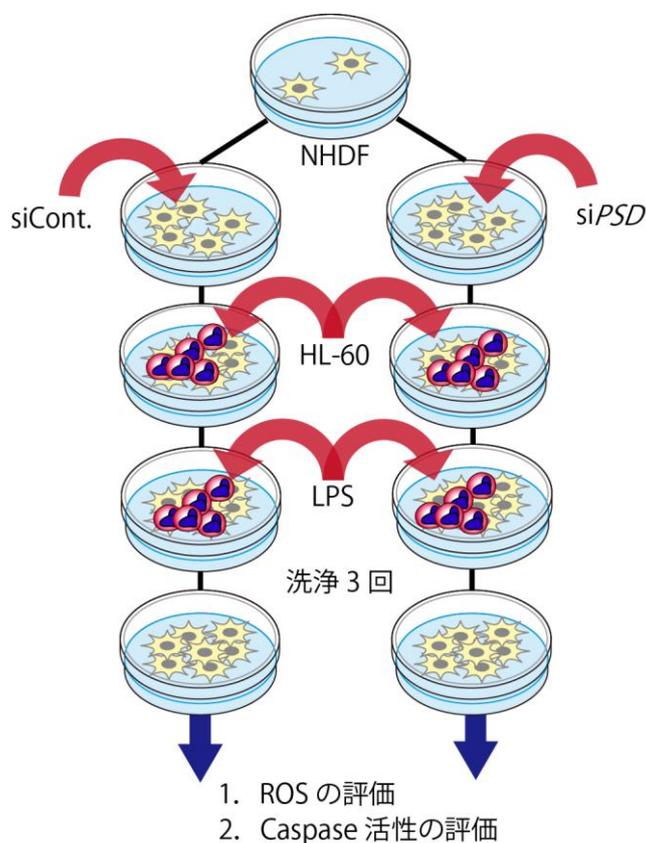
siCont: Scrambled Negative Control Stealth RNAを用いた陰性コントロール

Reactive oxygen species (ROS)およびカスパーゼ3/7活性の測定

Reactive oxygen species (ROS)およびカスパーゼ3/7活性の測定には、それぞれ Total ROS/Superoxide Detection kit (Enzo社製)、 CaspaTag™ カスパーゼ-3/7 Assay In Situ Assay Kit (Chemicon社製)を用いた。siRNAあるいはsiControlで処理した NHDFにリポ多糖(Lipopolysaccharide; LPS, Wako社製) 20 ng/mlを加えた後、HL-60とともに48時間共培養した。LPSはグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であ

り、脂質及び多糖から構成される糖脂質である。LPSは内毒素 (エンドトキシン)であり、広く生物系の基礎研究で炎症性刺激として多用されている。その後HL-60を除去し、残ったNHDFのROS産生細胞とカスパーゼ3/7陽性細胞の蛍光シグナルを蛍光顕微鏡 (Fluoview FV500; Olympus社製)を用いて検出し、3視野の細胞数の平均値を測定した (図5)。励起/蛍光スペクトルはROSで490nm/525nm、カスパーゼ3/7で550nm/580nmを用いた。PSD遺伝子発現の有無でROS産生細胞数とカスパーゼ3/7陽性細胞数を比較した。

図5 siRNA導入工程 (ROSおよびカスパーゼ活性を評価)

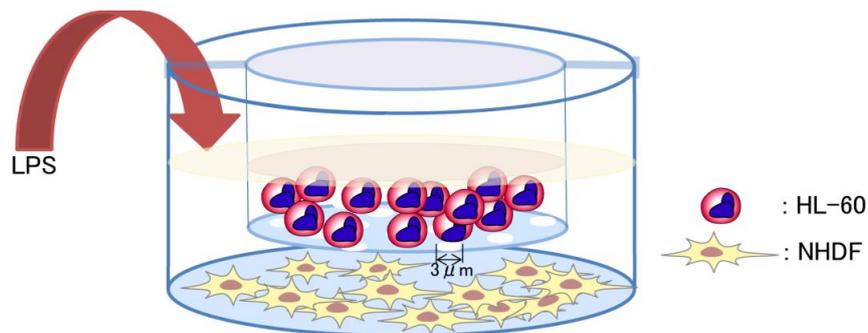


LPS: Lipopolysaccharide (リポ多糖)

Migration assay

好中球の遊走能を調べるため、好中球の働きを有するHL-60の遊走能を以下の手法で評価した。NHDFを径2cmのwellで培養し、そのwellに底面に3 μ mの孔を複数有するインサートwellをセットしインサートwell内にはHL-60を培養した(図6)。siRNAあるいはsiControlで処理したNHDFにLPSを加え48時間培養し、人工的に炎症を誘導する。インサート内から底面の3 μ mの孔を通過し遊走したHL-60の細胞数をヘキスト33342で染色し計測した。PSD遺伝子発現の有無でHL-60の遊走の程度を比較した。

図6 Migration assay



LPS: Lipopolysaccharide (リポ多糖)

下段のwellにNHDFを培養し上段のインサート(底面に3 μ mの孔を多数有す)にHL-60を培養する。下段のWellにLPSを加え、上段から3 μ mの孔を通過してきたHL-60の数を計測し遊走能を評価する。NHDFのPSD遺伝子発現の有無で、遊走してきたHL-60の細胞数を比較した。

臨床検体

2000年から2006年までの間に自治医科大学附属さいたま医療センターにおいて潰瘍性大腸炎関連大腸癌の診断で切除術を行った6症例の癌部および非癌部大腸粘膜組織、また非担癌潰瘍性大腸炎で大腸全摘除術を行った15症例の大腸粘膜組織を用いた。担癌症例の非癌部大腸粘膜組織は癌部近傍の大腸粘膜から一か所採取し、非担癌症例の組織は直腸粘膜から一か所採取した。新鮮検体を核酸保存液 (RNA later、Ambion社製) に浸し速やかに凍結保存した。非担癌症例の病型は全て全大腸炎型であり、担癌症例はp27表2のCase1が左側大腸炎型で他は全大腸炎型だった。

Methylation specific PCR (MSP) 法

PSD遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化の頻度を比較検討するため、担癌潰瘍性大腸炎手術症例6例の癌部組織と非癌部大腸粘膜組織、非担癌潰瘍性大腸炎15例の大腸粘膜組織から抽出したDNAを用いてMSPを施行した。用いたプライマーセットは以下の通りである。

For the methylated reaction

Forward: 5' CGTTAGGGGTTTTGAGTTTC 3'

Reverse: 5' ACCCCTAAACAAACGTAACG 3'

For the unmethylated reaction

Forward: 5' TTTGTTAGGGGTTTTGAGTTTT 3'

Reverse: 5' TTACCCCTAAACAAACATAACA 3'

この実験における*PSD*遺伝子メチル化の結果は前任者のデータを使用した¹⁵。

潰瘍性大腸炎の罹病期間と*PSD*遺伝子のメチル化の比較

潰瘍性大腸炎の罹病期間と*PSD*遺伝子のメチル化の関係を調べるため、担癌、非担癌の違いによらず、*PSD*遺伝子のメチル化の有無のみで罹病期間を比較検討した。具体的には潰瘍性大腸炎の担癌症例のうち、非癌部組織で*PSD*遺伝子にメチル化を認める4症例と非担癌の潰瘍性大腸炎のメチル化症例5例を合わせたメチル化群として計9検体、および担癌症例のうち非メチル化症例2例と非担癌潰瘍性大腸炎の非メチル化症例10例を合わせた非メチル化群として計12検体の二群に分けて罹病期間を比較検討した。

好中球浸潤の程度評価方法

好中球浸潤の程度を評価するために、担癌潰瘍性大腸炎症例6例の癌部、非癌部組織(癌部近傍の大腸組織)、および非担癌潰瘍性大腸炎15症例の直腸組織を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色において、組織中における好中球浸

潤のグレードを²⁶で報告されたシステムで以下の様に点数化した。炎症反応浸潤無し;0、弱程度の浸潤;1、中程度(陰窩膿瘍を伴う)の浸潤;2として点数化した。PSD遺伝子がメチル化している担癌症例の癌部4例、非癌部4例、非担癌組織5例の計13切片をメチル化群とし、メチル化が認められない担癌症例癌部の2例、非癌部2例、非担癌10例の計14切片を非メチル化群として好中球浸潤の程度を比較検討した。

組織免疫染色法

F-アクチンと PSDの蛋白質発現の有無を評価するため、担癌潰瘍性大腸炎症例6例の癌部、非癌部組織(癌部近傍の大腸組織)、および非担癌潰瘍性大腸炎15症例の直腸組織を用いて組織免疫染色を行った。パラフィン包埋されていた大腸切除病理検体を当センター病理部技師の協力のもと、スライドガラス上に5 μ m厚切片を作成した。まず初めにスライドガラスを57 $^{\circ}$ Cのオーブン内で15分間静置させた後、脱パラフィンを行い組織を露出させた。抗原性賦活化は、抗原回復液(10mM クエン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0またはTris-EDTA緩衝液 pH9.0)の入ったガラス製染瓶内にスライドガラスを置き、電気ポット法で98 $^{\circ}$ C 30分熱処理を行った。次に内因性ペルオキシダーゼ除去を、3%過酸化水素水/メタノール混合溶液の入ったガラス製染瓶にスライドガラスを置き、室温で15

分反応させた。バックグラウンド染色を低減させるため5%BSAで10分間サンプルを前処置した。一次抗体反応(抗PSD抗体(ab5962 Abcam 社製)室温1時間、抗F-actin抗体(NH3 Abcam 社製)室温12時間)を行った。二次抗体反応は、スライドガラス上の余分な水分を除去し、抗マウス、ウサギ標準二次抗体シンプルステインMAX-PO(ニチレイバイオサイエンス社製)を順次滴下した。染色はDAB基質キット(DAKO社製)を用いて10分間発色を行い、脱水透徹処理を行いマリノールで封入した。F-アクチン、PSD蛋白の陽性判定方法は、細胞質が染色される細胞が5%未満で0、5%以上20%未満で+1、20%以上で+2として点数化して行った。*PSD*遺伝子がメチル化している担癌症例の癌部4例、非癌部4例、非担癌組織5例の計13切片をメチル化群とし、メチル化が認められない担癌症例癌部の2例、非癌部2例、非担癌10例の計14切片を非メチル化群としてF-アクチン蛋白およびPSD蛋白の発現程度を比較検討した。

統計学的解析

全ての統計分析はStat View 5.0ソフトウェア・プログラム(SAS研究所製)で行った。パラメトリック検定にはStudent's T検定等を用い、平均値±標準偏差で示した。ノンパラメトリック解析には χ^2 検定、Fisherの正確検定、Mann-

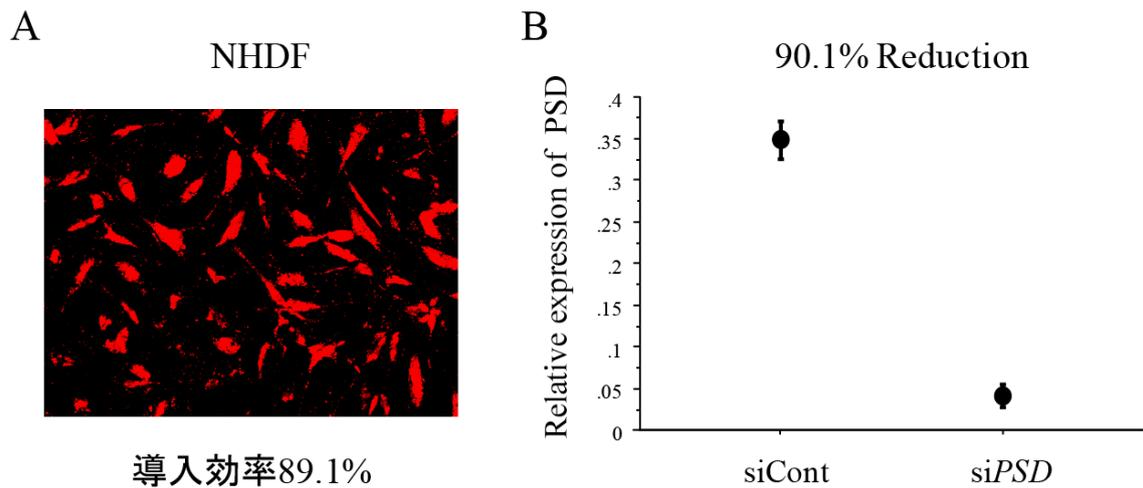
Whitney's U testを用いた。全てのP値に関しては両側検定を行いP値<0.05を統計的に有意であると判断した。

結果

1. NHDFの PSD遺伝子をノックダウンすると Rac1蛋白質が不活化され、細胞膜の波動化が抑制された

PSD遺伝子をノックダウンした際のRac1活性の抑制効果を明らかにするために、NHDFにsiRNAあるいはsiControlを遺伝子導入して2群を比較検討した。NHDFに対するsiRNAの導入効率は89.1%だった。mRNAは90.1%の減少を認め、siRNAの導入によるmRNAの効果的な抑制が確認された (図7)。

図7 NHDFに対するsiRNAの導入効率と PSD遺伝子のmRNA抑制効果



PSD蛋白質はRac1の活性化を介し細胞膜付近へF-アクチンを集積させる機能を有する²³。このF-アクチンの集積により細胞骨格の再編成が司られる。通常、

F-アクチンの細胞膜付近への集積はEGF刺激により得られるため、NHDFをEGFで刺激した後に、F-アクチン特異的に結合するファロイジンというアミノ酸ペプチドをローダミンでラベル化した蛍光染色を用い、F-アクチンを可視化して観察した。*PSD*遺伝子をノックダウンしていないsiControl群においてはRac1の活性化が認められたが、si*PSD*群では刺激によるRac1の活性化は認められなかった。またNHDFのRac1活性は、EGF刺激後30分の経過で刺激前のレベルまでに減少した (図8A)。

EGF刺激によるF-アクチンの変化を見ると、siControl群ではsi*PSD*群に比べて細胞膜付近へのF-アクチンの集積が有意に観察された($42.97 \pm 8.22\%$ (siCont) vs $14.83 \pm 3.93\%$ (si*PSD*), $P=0.0366$) (図8B,C)。以上の結果より、EGF刺激によるRac1の活性およびF-アクチンの細胞膜への集積は、*PSD*遺伝子のノックダウンで抑制される事が明らかとなった。

図8 EGF刺激に対するRac1の活性化とF-アクチンの集積

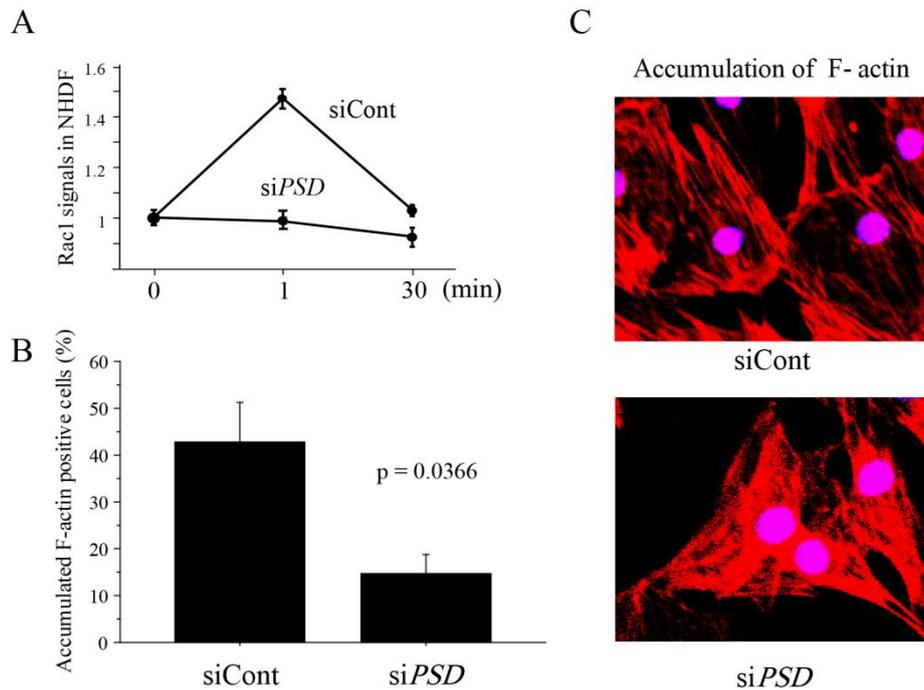


図8C.赤色はローダミンで蛍光染色されたF-アクチン。紫はヘキスト33342で蛍光染色された核を表す。

2. NHDFの PSD遺伝子をノックダウンすると活性酸素(ROS)の産生が抑制さ

れカスパーゼ3/7が不活化された

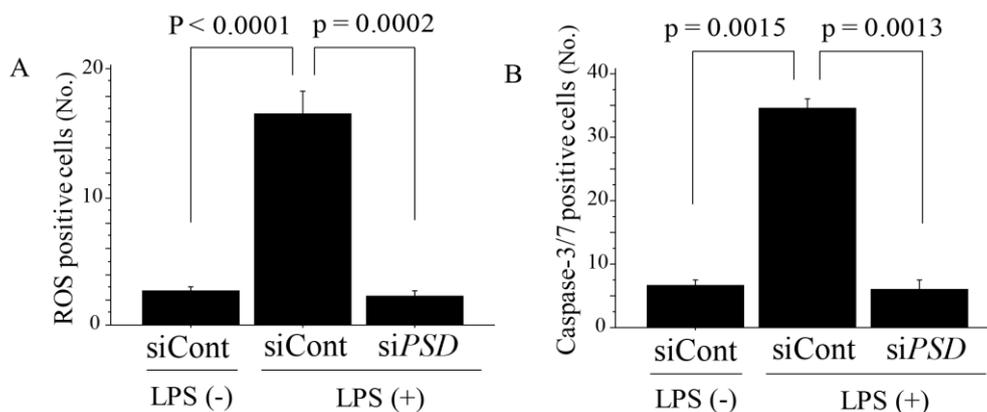
過去の検討では、HL-60はLPSで刺激するとNADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) を活性化させROSを産生する^{15,27}が、好中球の介在がないとNHDFは単独ではLPSの刺激でROSを産生しない事が報告されている²⁷。本研究では、NHDFとHL-60の共培養の環境を作成し、HL-60の存在下でNHDFが

LPS刺激によりROSを産生する事が可能か否か、そしてそのROSの産生はNHDFのPSD遺伝子をノックダウンする事により抑制されるか否か検討した。

siControl群では、LPSの刺激によりNHDFはROSを産生したが、PSD遺伝子をノックダウンしたsiPSD群ではROSを産生しなかった (16.67 ± 3.06 (siCont) vs 2.67 ± 10.58 (siPSD)、 $P=0.0013$ 、図9A)。代表的なROS産生細胞を図10Aに示す。

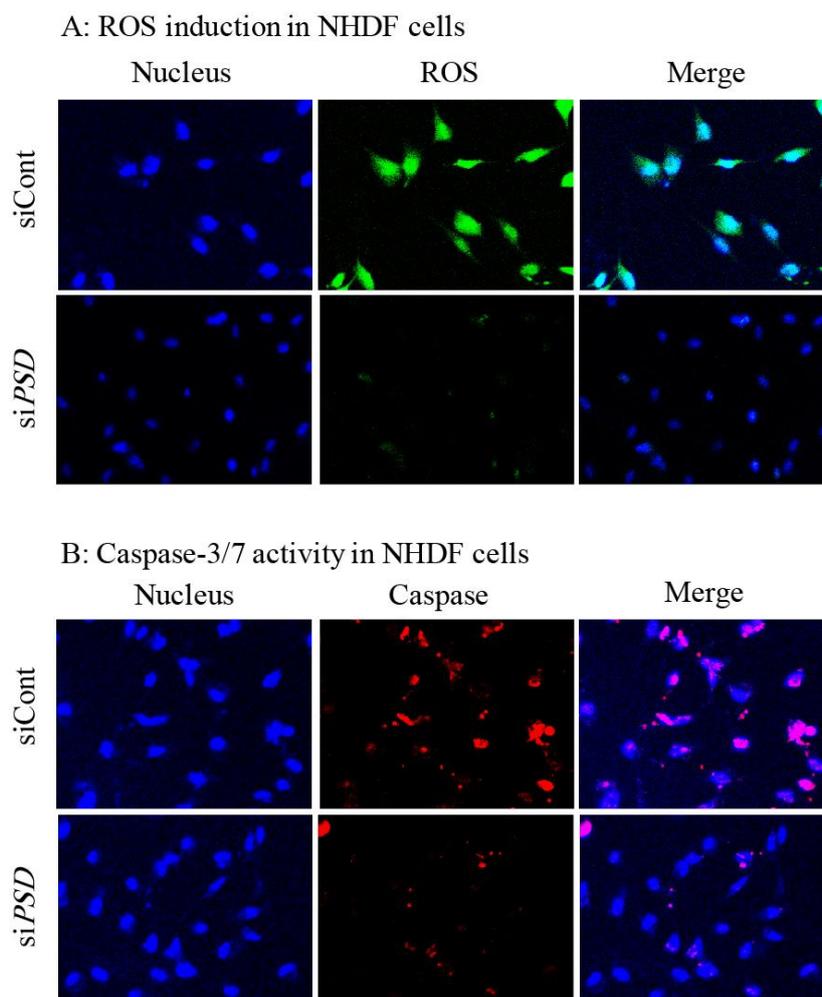
次にカスパーゼ3/7活性についても同様の検討を行った。siControl群では、LPSの刺激によりカスパーゼ3/7の活性化を認めたが、PSD遺伝子をノックダウンしたsiPSD群ではカスパーゼ3/7の活性化を認めなかった (34.67 ± 2.51 (siCont) vs 6.00 ± 2.65 (siPSD)、 $P=0.0002$ 、図9B)。PSD遺伝子の抑制は、ROS産生阻害と同様に、カスパーゼ3/7活性を抑制する事が明らかとなった。代表的なカスパーゼ3/7活性陽性細胞を図10Bに示す。

図9 LPS刺激に対するROS産生及びカスパーゼの活性化



LPS(-), LPS刺激を行わなかったもの. LPS(+),LPS刺激を行ったもの

図10 LPS刺激に対するROS産生 (A) 及びカスパーゼの活性化 (B)



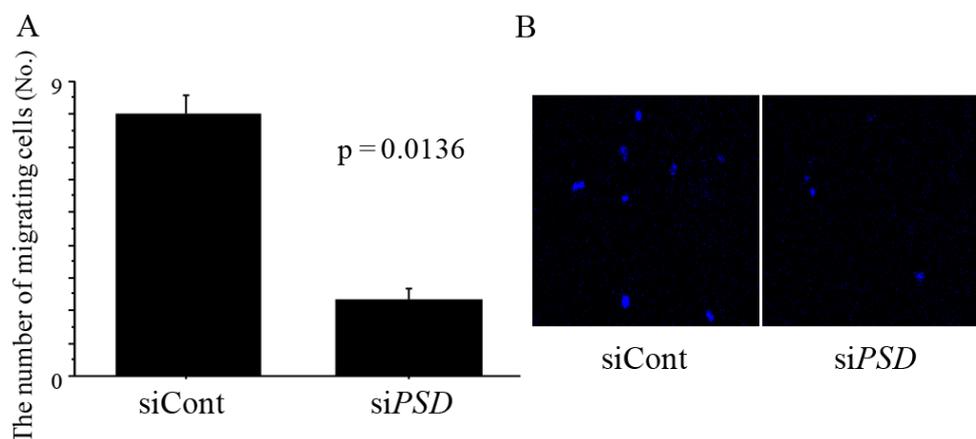
核はヘキスト33342で蛍光染色され青色に可視化されている。ROSは緑色、活性化したカスパーゼは赤色でそれぞれ可視化されている。

3. HL-60との共培養下でNHDFのPSD遺伝子をノックダウンするとHL-60の遊走能は低下した

NHDFの単独培養下においては、LPS刺激を加えてもROSを産生せずアポトーシスも誘導しなかった。しかしHL-60との共培養下においては、LPS刺激に対し

てROSを産生しカスパーゼ3/7を活性化させた。この結果は、NHDFとHL-60の共培養下では、LPS刺激時に対してNHDFとHL-60細胞の間に何らかの相互作用が生じる事が考えられる。PSDの下流に位置するRac1が好中球の遊走を誘導するという過去の報告から¹⁷⁻²⁰、LPSによる刺激は、NHDFのPSD遺伝子の活性化を介してHL-60の遊走能を高めている事が予測される。この仮説を検証するため、HL-60の遊走能をMigration assayにより評価した。LPS刺激により遊走したHL-60の細胞数は、siControl群では 2.333 ± 0.471 でありsiPSD群の 8.0 ± 0.816 と比較して4.6倍であり (P=0.0136、図11A)、NHDFのPSD遺伝子発現の抑制によりHL-60の遊走能が抑えられる事が明らかになった。インサート内から底面の $3\mu\text{m}$ の孔を通過し遊走したHL-60の代表的写真を図11Bに示す。

図11 Migration assay (LPS刺激に対するHL-60の遊走)



核をヘキスト33342で蛍光染色し青色に可視化して細胞数をカウントした。

4. 臨床病理学的検討

担癌潰瘍性大腸炎 (癌部: UCT、非癌部: UCN)6例、非担癌潰瘍性大腸炎15例の大腸粘膜組織(UCI)の臨床病理学因子を表1、2および3に示す。平均年齢に有意差を認めなかったが、潰瘍性大腸炎の罹病期間は非担癌症例では、潰瘍性大腸炎関連大腸癌症例群と比べ、その罹病期間は有意に短かった(7.8±4.5years vs 15.7±6.7 years, P<0.05)。過去の我々の検討ではPSD遺伝子の異常メチル化は担癌症例6例のうち癌部組織(UCT)で4例、非癌部組織(UCN)で4例(66.7%)、一方15例の非担癌症例の直腸組織(UCI)では5例(33.3%)にそれぞれ認められた。

表1 潰瘍性大腸炎症例のうち担癌症例6症例の癌部組織(UCT)、非癌部大腸組織(UCN)および非担癌症例15例の直腸組織(UCI)の臨床病理因子

	担癌症例		非担癌症例
症例数	N=6		N=15
平均年齢	54.8±16.0		40.8±13.6
性別：男	4		9
女	2		6
罹病期間(年)	15.7±6.7		7.8±4.5*
採取した組織	UCT	UCN	UCI
PSD methylation (%)	66.7%	66.7%	33.3%

*非担癌症例の潰瘍性大腸炎罹病期間は、担癌症例の潰瘍性大腸炎罹病期間に比べて有意に短かった。

UCT; UC-associated colorectal cancer tissues、UCN; matched normal epithelia、UCI; non-neoplastic UC epithelia.

表2 担癌潰瘍性大腸炎6症例の臨床病理学因子

Case	<i>PSD</i> (UCT)	<i>PSD</i> (UCN)	年齢	性別	罹病期 間(年)	発症 年齢	発癌 部位	組織型	Dukes	手術
1	M	M	77	男	13	64	R	well	A	total
2	M	M	40	男	8	32	A	muc	A	total
3	M	M	64	女	9	55	D	well	A	total
4	U	U	35	男	15	20	D	poor	D	partial
5	M	M	68	女	24	44	R	well	B	total
6	U	U	45	男	25	20	D	well	B	total

UCT; UC-associated colorectal cancer tissues、UCN; matched normal epithelia,
 U (*PSD*); メチル化陰性、M (*PSD*); メチル化陽性, A, D, R (部位); 上行結腸, 下行
 結腸, 直腸, well, poor, および muc (組織型)は well differentiated adenocarcinoma,
 poorly differentiated adenocarcinoma, および mucinous adenocarcinoma, Dukes; デュ
 ークス分類、 total, partial (手術)はそれぞれ大腸全摘術、結腸部分切除術を示す。

表3 非担癌潰瘍性大腸炎15症例の臨床病理学因子

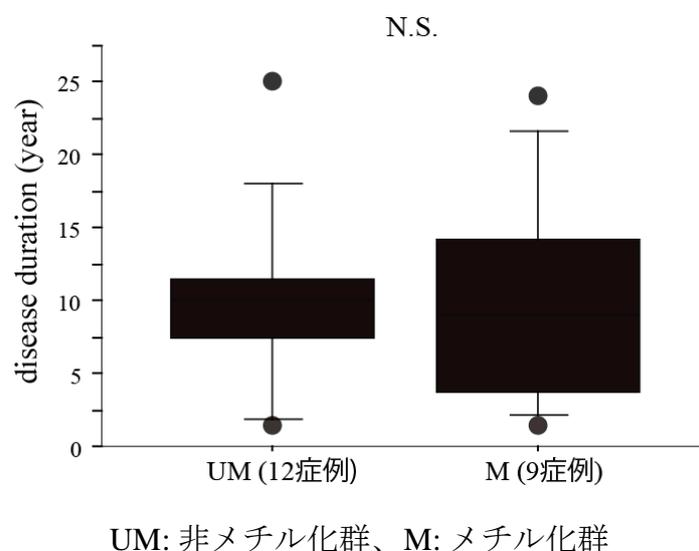
Case	PSD (UCI)	年齢	性別	罹病期間(年)	発症年齢	手術
1	U	28	男	10	18	Total
2	U	46	男	9	37	Total
3	M	36	女	4	32	Total
4	M	54	女	2	52	Total
5	U	42	男	10	32	Total
6	M	60	女	9	51	Total
7	M	43	女	3	40	Total
8	U	23	女	9	14	Total
9	M	35	男	18	17	Total
10	U	71	男	1.5	70	Total
11	U	35	男	10	25	Total
12	U	53	男	11	42	Total
13	U	26	男	6	20	Total
14	U	23	女	2	21	Total
15	U	37	男	12	15	Total

UCI; non-neoplastic UC epithelia、U (PSD); メチル化陰性、M (PSD); メチル化陽性、total (手術)は大腸全摘術を示す。

5. 潰瘍性大腸炎の罹病期間とPSD遺伝子のメチル化の関係

潰瘍性大腸炎の罹病期間によるメチル化の影響を調べるため、非メチル化群とメチル化群で罹病期間を比較してみた所、2群に有意な差はなかった (非メチル化群; 10.042 ± 1.761 年 vs メチル化群; 9.944 ± 2.45 年、 $p=0.9739$) 図12。

図12 潰瘍性大腸炎の罹病期間とPSD遺伝子のメチル化の関係



6. PSD遺伝子がメチル化している潰瘍性大腸炎症例の組織検体では好中球浸潤が低下していた

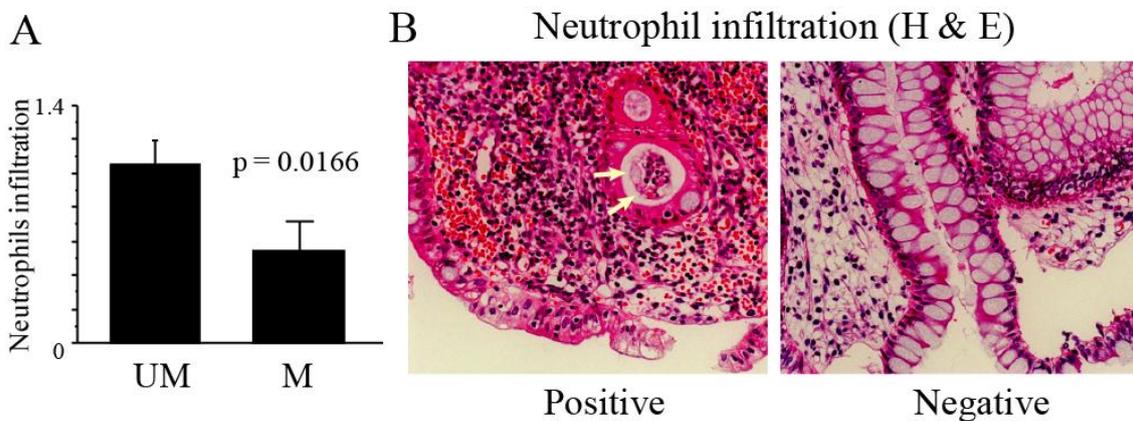
PSD遺伝子のメチル化が好中球の遊走に影響を与えているか否かを潰瘍性大腸炎症例の組織検体で検証するため、好中球浸潤を組織学的に評価し、非メチル化群とメチル化群の2群で比較した。担癌症例の癌部、非癌部組織、非担癌症例の直腸組織の計27切片を検討に用いた。

好中球浸潤のグレードは²⁶で報告されたシステムで以下の様に点数化した。炎症反応浸潤無し;0、弱程度の浸潤;1、中程度(陰窩膿瘍を伴う)の浸潤;2として点数化した。今回対象とした症例に関してはPSD遺伝子の非メチル化群

(1.01 ± 0.55) に比べて、メチル化群 (0.51 ± 0.55) では好中球浸潤は有意に減少

していた ($P=0.0166$ 、図13A)。代表的な組織切片を図13Bに示す。

図13 *PSD*遺伝子のメチル化の程度と好中球浸潤の程度の比較



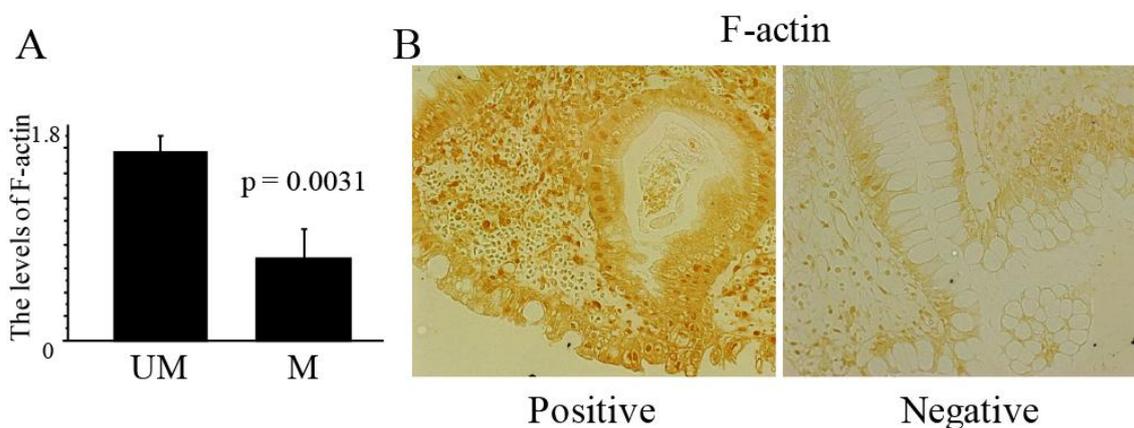
UM: 非メチル化群、M: メチル化群 矢印: 陰窩膿瘍

7. *PSD*遺伝子がメチル化している潰瘍性大腸炎症例の組織検体ではF-アクチンの集積が低下していた

*PSD*遺伝子により集積されるF-アクチンの発現分布を潰瘍性大腸炎症例の組織検体で評価するために、免疫組織染色を行った。

*PSD*遺伝子の非メチル化群 (1.57 ± 0.51) と比べて、メチル化群 (0.69 ± 0.86) ではF-アクチンの発現レベルは有意に減少していた ($P=0.0031$ 、図14A)。すなわち、F-アクチンの集積は*PSD*遺伝子のメチル化で抑制されている事を示唆している。代表的なF-アクチン免疫組織染色切片を図14Bに示す。

図14 *PSD*遺伝子のメチル化の程度とF-アクチン蛋白質発現の比較



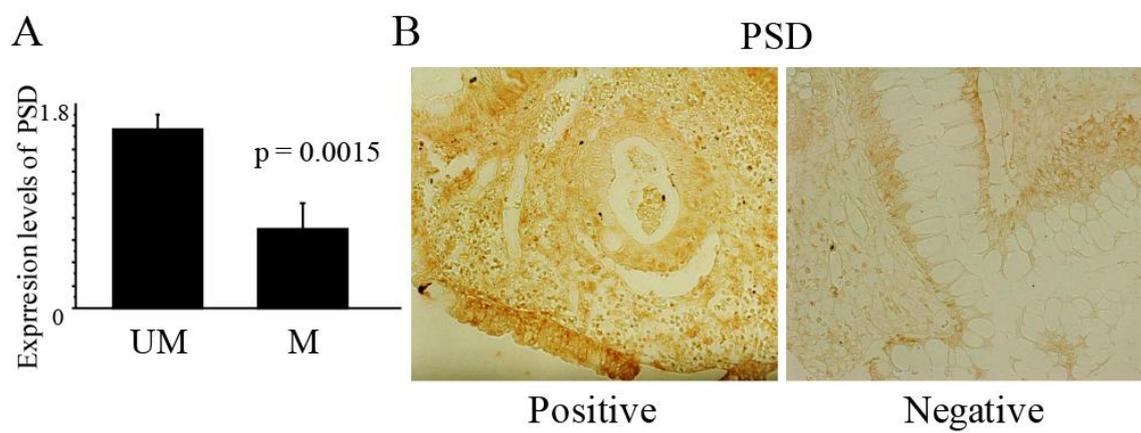
UM: 非メチル化群、M: メチル化群

8. *PSD*遺伝子がメチル化している潰瘍性大腸炎症例の組織検体では*PSD*蛋白質の発現が低下していた

*PSD*の蛋白質発現が*PSD*遺伝子のメチル化によって抑制されているかどうかを免疫組織学的に評価した。

*PSD*の蛋白質現レベルは、非メチル化群 (1.462 ± 0.144) に比べて*PSD*遺伝子のメチル化群 (0.727 ± 0.141) で有意に低下していた。(P=0.0015、図15A)。 代表的な*PSD*蛋白質免疫組織切片を図15Bに示す。

図15 PSD遺伝子のメチル化の程度とPSD蛋白質発現の比較



UM: 非メチル化群、M: メチル化群

考察

本研究では、潰瘍性大腸炎の発癌過程における*PSD*遺伝子の異常メチル化による*Rac1*の不活化の意義を明らかにした。*in vitro*の検討ではNHDFの*PSD*遺伝子発現を抑制すると*Rac1*が不活化され、F-アクチンの集積が阻害されその結果、細胞膜の波動化が抑制された。またNHDFの*PSD*遺伝子発現を抑制するとLPS刺激に対するHL-60の遊走能が低下しアポトーシスが阻害されるという結果を得た。これらの変化を潰瘍性大腸炎症例の組織検体で検証したところ、*PSD*遺伝子の異常メチル化により*PSD*蛋白質の発現が低下している組織検体においては、F-アクチンの発現が減少し、好中球浸潤やアポトーシスの低下が認められ、*in vitro*の結果を支持するものであった。以上より、潰瘍性大腸炎の大腸粘膜における*PSD*遺伝子の異常メチル化は、*Rac1*を介する免疫応答を破綻させ、好中球遊走やアポトーシス機構を阻害する事で潰瘍性大腸炎の癌化に関与している事が示唆された。

G蛋白質は細胞骨格の再構築、細胞の成長、形質転換、細胞死、細胞の遊走、転移、各種ストレス応答など多岐にわたる生物学的機能を有している。*Rac1*はこのG蛋白質に属し、紫外線刺激、FasやTNF α によるストレスに応答してアポトーシスを誘導する働きがある事が報告されている¹⁸⁻²⁰。*Rac1*が不活化される

と、これらの働きが抑制されると考えられPSD遺伝子の発現抑制によるRac1の不活化によりアポトーシスが阻害されるという本研究結果と一致している。

PSDは、Rac1の活性化を介してF-アクチンの再構築を行い細胞膜の波動化を調節する^{16,17}。本研究では、*in vitro* でPSD遺伝子を抑制する事により、F-アクチンの細胞膜付近への集積が有意に阻害される事を示した。また潰瘍性大腸炎症例の組織検体を用いた検討において、PSD遺伝子のメチル化症例は、F-アクチンの集積が有意に低下している事を示した。これらの結果から、PSD遺伝子のメチル化によるRac1の不活化が、F-アクチンの集積を阻害していると考えられる。Srinivasanらによれば、ドミナントネガティブなRac1の変異では、F-アクチンの集積が抑制されていると報告しており²⁸、我々の研究結果と一致している。

炎症性腸疾患における免疫応答には、好中球が重要な働きを演じている。好中球は感染性病原菌から生体を守るために血液中から各組織に供給される。この免疫応答機構において、大腸粘膜細胞が重要な役割を担っている。一般に、腸管上皮細胞は炎症刺激により多種多様なサイトカイン及びケモカインを腸粘膜に放出し消化管の免疫担当細胞の維持と制御に貢献している^{29,30}。その中でも特にIL-8は好中球に特異的に作用し好中球の遊走を促す機能を有する。

本実験の結果だけでは、NHDFをEGFで刺激した際に誘導されるRac1の活性

化とF-アクチンの集積が*PSD*遺伝子の抑制により減少した事と、LPS刺激により活性酸素の産生とアポトーシスの誘導が*PSD*遺伝子の抑制で減少した事が、一連の経路として起きたものであるか、それぞれ独立して起きているものであるのか明らかにできない。

しかしながら文献をひもとくと、腸管上皮細胞からのサイトカイン放出はエキソサイトーシスによって行われるが、このエキソサイトーシスにはF-アクチンの細胞膜への集積とその結果生じる細胞膜の波動化が重要な役割を果たしている事が最近の報告で明らかとなっている^{31,32}。これらの事実から潰瘍性大腸炎の発癌過程において、*PSD*遺伝子のメチル化による発現低下により細胞外部からの炎症刺激に対して生じるRac1蛋白の活性化とその結果生じるF-アクチンの細胞膜への集積がともに抑制され、大腸粘膜上皮細胞のサイトカイン放出機構であるエキソサイトーシスが行えなくなり大腸粘膜が誘導する好中球の遊走能が低下しているという一連の流れが起きている事が推測される。今回行ったMigration assayではNHDFの*PSD*遺伝子の抑制によりHL-60の遊走が有意に抑制されたが、上記のような一連の経路で起きた結果であると推測される。また潰瘍性大腸炎症例の組織標本を用いた検討では、*PSD*遺伝子がメチル化している症例において好中球浸潤が有意に低下しており、*in vitro*の実験結果を支持するものであった。

以上の事より、*PSD*遺伝子のメチル化による*Rac1*の不活化によって好中球の遊走が阻害される事が示唆された。

好中球は炎症環境下で*ROS*を産生し、蛋白質損傷や脂質過酸化反応、*DNA*損傷を与える事により酸化ストレスに関与している。これらの酸化ストレスによってジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子異常が生じ、異型性病変や癌の発生が助長されると考えられる^{33,34}。その一方、*ROS*は細胞内シグナル伝達において様々な機能を有しており、その一部はアポトーシスを誘導する事で抗がん作用に働く事が報告されている^{35,36}。生体内ではこの過程において、好中球の細胞貪食による*ROS*の受け渡しが介在している。今回、*in vitro*の実験に用いた*HL-60*には遊走能はあるが貪食能を有さない事が知られており^{37,38}、*in vitro*の実験でのアポトーシスの誘導は*HL-60*の貪食の過程を経ずに行われたものと考えられる。先に示したように好中球の遊走には*Rac1*の活性が必要であり、*Rac1*は直接的にアポトーシスを誘導するだけでなく好中球の遊走を介して間接的にもアポトーシスの誘導に関わっていると考えられる。一方、*Rac1*は複雑な役割を有し、アポトーシスのみならず細胞増殖の誘導にも関与している事が推測されている。³⁹⁻⁴¹ 細胞増殖とアポトーシスの誘導という相異なる働きは、*Rac1*と同様に*G*蛋白質に属す腫瘍遺伝子*Vav*や*R-ras*でも報告されている^{42,43}。*Rac1*をはじめとする*G*蛋白質が、細胞死に関する異なる機能を有する理由とし

て、G蛋白質が、多数の細胞システムの中に存在するJNK/SPAKカスケードを転写因子であるnuclear factor κ Bとともに活性化する事でアポトーシスを調節している為ではないかと考えられている^{19,44}。

潰瘍性大腸炎症例の組織標本において、*PSD*遺伝子のメチル化によるF-アクチンの集積阻害は、大腸粘膜だけでなく好中球にも認められた。一方、*PSD*遺伝子の発現低下は、大腸粘膜では顕著に認められたが好中球では観察されなかった。これは炎症組織に浸潤した好中球の寿命が1日に満たず⁴⁵、好中球に対するメチル化修飾の影響が少ないためと考えられる。したがって、潰瘍性大腸炎症例の慢性炎症の環境下においては、異常メチル化の標的となりうるのは浸潤細胞ではなく大腸粘膜であり、大腸粘膜の*PSD*遺伝子の異常メチル化によって好中球の機能不全が引き起こされていると考えられる。

*PSD*遺伝子のメチル化の頻度が潰瘍性大腸炎の担癌症例で有意に高い事から、我々は*PSD*遺伝子のメチル化が発がんの誘因となっていると考えてきた。しかしその一方で、担癌症例では非担癌症例と比較して罹病期間が有意に長いため、*PSD*遺伝子の異常メチル化は、長い期間炎症に暴露された結果であり発がんの誘因ではないとの考えも成り立つ。この可能性を完全に除外するためには、症例を蓄積させ、罹病期間をそろえた上での比較検討が必要であり今回の検討結果はこの疑問に対して明解な答えをもたない。参考としてではあるが、罹病期

間によるメチル化の影響を調べるため、*PSD*遺伝子の非メチル化症例とメチル化症例で罹病期間を比較してみたところ、2群に有意な差はなかった。すなわち今回の症例に限られた事ではあるが、単に長い期間炎症に暴露された結果としてメチル化が起きてきたとは考えにくい。

本研究で検討できなかつた事項も多い。今回は罹病期間の違いにおける検討を行ったが、潰瘍性大腸炎は罹病期間の違いのみならず、病型分類(全大腸炎・左側大腸炎・直腸炎・右側あるいは区域性大腸炎)、臨床経過による分類(再燃寛解型・慢性持続型・急性激症型・初回発作型)、また大腸炎が活動期にあるか寛解期にあるか、さらには臨床的重症度による分類など、症例や時期ごとに考慮すべき事項が多い。一例を挙げれば、今回*PSD*遺伝子のメチル化の有無で好中球浸潤の程度に差を認めたが、同一症例であっても潰瘍性大腸炎の寛解期と活動期で好中球浸潤の程度を比較した際に果たしてどのような結果を呈するかは不明である。今回の検討は症例数も決して多く無く、そのため上記に挙げた潰瘍性大腸炎の分類を考慮した検討を行うまでには至ることができず限定的な結果である。また標本採取の部位も限定的であり、これらの検体を用いた結果が果たして各症例の全体像を表現できているかという疑問も生じる。

今回言及できなかつたが、非担癌症例において、*PSD*遺伝子のメチル化の有無によってどのような臨床的な差があるのか、また*PSD*遺伝子のメチル化が、潰

瘍性大腸炎関連大腸癌の発癌予測因子として利用可能であるかといった課題にも取り組んでいきたい。このためには今後症例数を重ねた検討が必要である。

結論

潰瘍性大腸炎の発癌過程における*PSD*遺伝子の異常メチル化の意義を、*Rac1*の不活化を介するメカニズムから検討した。潰瘍性大腸炎の大腸粘膜に*PSD*遺伝子の異常メチル化が起きると*PSD*遺伝子の発現が低下し、その下流に存在する*Rac1*の活性が阻害される。*Rac1*を介する免疫応答を破綻させ、好中球遊走やアポトーシス機構を阻害する事により、*PSD*遺伝子の異常メチル化は潰瘍性大腸炎の発癌に深く関与している事が示唆された。

謝辞

本研究は、自治医科大学の大学院生補助金、日本学術振興会科研費、財団法人日本自転車振興会からの助成を受けたものであり、ご支援いただいた関係各位に深く感謝いたします。また本研究において全般にわたりご指導いただいた自治医科大学 小西文雄客員教授、自治医科大学附属さいたま医療センター総合医学2 力山敏樹教授、鈴木浩一講師、石坂依津子研究補助員に深謝いたします。

最後に、自治医科大学附属さいたま医療センター消化器一般外科の皆様、病理部の皆様、手術室スタッフの皆様、BSL研究施設の皆様、誠にありがとうございました。

参考文献

1. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 48: 526-535. 2001
2. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287: G7-17. 2004
3. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, Itzkowitz SH. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 138: 746-774, 774 e741-744; quiz e712-743. 2010
4. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*. 2: 1129-1133. 1981
5. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*. 345: 784-789. 2001
6. Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK. Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA*. 291: 187-194. 2004
7. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med*. 325: 1132-1136. 1991
8. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 9821-9826. 1996
9. Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*. 71: 355-359. 1997
10. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*.

140: 1807-1816. 2011

11. Itzkowitz SH. Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 35: 553-571. 2006
12. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, Perucho M. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell.* 9: 199-207. 2006
13. Yamamoto F, Yamamoto M. A DNA microarray-based methylation-sensitive (MS)-AFLP hybridization method for genetic and epigenetic analyses. *Mol Genet Genomics.* 271: 678-686. 2004
14. Yamamoto F, Yamamoto M, Soto JL, Kojima E, Wang EN, Perucho M, Sekiya T, Yamanaka H. NotI-MselI methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism for DNA methylation analysis of human cancers. *Electrophoresis.* 22: 1946-1956. 2001
15. Okada S, Suzuki K, Takaharu K, Noda H, Kamiyama H, Maeda T, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F. Aberrant methylation of the Pleckstrin and Sec7 domain-containing gene is implicated in ulcerative colitis-associated carcinogenesis through its inhibitory effect on apoptosis. *Int J Oncol.* 40: 686-694. 2012
16. Franco M, Peters PJ, Boretto J, van Donselaar E, Neri A, D'Souza-Schorey C, Chavrier P. EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *Embo J.* 18: 1480-1491. 1999
17. Knodler LA, Celli J, Finlay BB. Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 578-588. 2001
18. Gulbins E, Coggeshall KM, Brenner B, Schlottmann K, Linderkamp O, Lang F. Fas-induced apoptosis is mediated by activation of a Ras and Rac protein-regulated signaling pathway. *J Biol Chem.* 271: 26389-26394. 1996
19. Esteve P, Embade N, Perona R, Jimenez B, del Peso L, Leon J, Arends M, Miki T, Lacal JC. Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene.* 17: 1855-1869. 1998
20. Eom YW, Yoo MH, Woo CH, Hwang KC, Song WK, Yoo YJ, Chun JS, Kim JH. Implication of the small GTPase Rac1 in the apoptosis induced by UV in Rat-2 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 825-829. 2001

21. Regala RP, Weems C, Jamieson L, Copland JA, Thompson EA, Fields AP. Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity. *J Biol Chem.* 280: 31109-31115. 2005
22. Thomas EK, Cancelas JA, Zheng Y, Williams DA. Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. *Leukemia.* 22: 898-904. 2008
23. Wang F, Herzmark P, Weiner OD, Srinivasan S, Servant G, Bourne HR. Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol.* 4: 513-518. 2002
24. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science.* 287: 1037-1040. 2000
25. Servant G, Weiner OD, Neptune ER, Sedat JW, Bourne HR. Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol Biol Cell.* 10: 1163-1178. 1999
26. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I, Forbes A. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 126: 451-459. 2004
27. Alikhani M, Alikhani Z, He H, Liu R, Popek BI, Graves DT. Lipopolysaccharides indirectly stimulate apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts. *J Biol Chem.* 278: 52901-52908. 2003
28. Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne HR. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol.* 160: 375-385. 2003
29. Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology.* 113: 1214-1223. 1997
30. Jung HC1, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest.* 95: 55-65. 1995
31. Sokac, A. M., and Bement, W. M. Kiss-and-coat and compartment mixing: coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly. *Mol Biol Cell.* 17:

1495–1502. 2006

32. Smythe, E., and Ayscough, K. R. Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci.* 119: 4589–4598. 2006
33. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 3: 276-285. 2003
34. Moriyama T, Matsumoto T, Nakamura S, Jo Y, Mibu R, Yao T, Iida M. Hypermethylation of p14 (ARF) may be predictive of colitic cancer in patients with ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum.* 50: 1384-1392. 2007
35. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract.* 204: 511-524. 2008
36. Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub TR, Carr SA, Shamji AF, Stern AM, Mandinova A, Schreiber SL, Lee SW. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature.* 475: 231-234. 2011
37. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 70: 1233-1244. 1987
38. Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Ogino T, Sato EF, Akiyama J, Imada I, Inoue M, Utsumi K. Mechanism and characteristics of stimuli-dependent ROS generation in undifferentiated HL-60 cells. *Antioxid Redox Signal.* 7: 1367-1376. 2005
39. Boehm JE, Chaika OV, Lewis RE. Rac-dependent anti-apoptotic signaling by the insulin receptor cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 274: 28632-28636. 1999
40. Joneson T, Bar-Sagi D. Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol.* 19: 5892-5901. 1999
41. Nishida K, Kaziro Y, Satoh T. Anti-apoptotic function of Rac in hematopoietic cells. *Oncogene.* 18: 407-415. 1999
42. Saez R, Chan AM, Miki T, Aaronson SA. Oncogenic activation of human R-ras by point mutations analogous to those of prototype H-ras oncogenes. *Oncogene.* 9: 2977-2982. 1994
43. Wang HG, Millan JA, Cox AD, Der CJ, Rapp UR, Beck T, Zha H, Reed JC. R-Ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via a Bcl-2 suppressible mechanism. *J Cell Biol.* 129: 1103-1114. 1995

44. Chou CK, Liang KH, Tzeng CC, Huang GC, Chuang JI, Chang TY, Liu HS. Dominant-negative Rac1 suppresses Ras-induced apoptosis possibly through activation of NFkappaB in Ha-ras oncogene-transformed NIH/3T3 cells. *Life Sci.* 78: 1823-1829. 2006
45. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 116: 625-627. 2010