

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08356

研究課題名(和文)炎症性腸疾患バイオマーカーシグナルの二相性と収斂から見た発症機序解明と治療戦略

研究課題名(英文) Pathological mechanism of inflammatory bowel disease by inflammatory biomarker OLFM4 induction

研究代表者

吉田 功 (Yoshida, Tsutomu)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：90316943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患特異的バイオマーカーOLF4は潰瘍性大腸炎とクローン病において異なる二相性の発現誘導を受ける。その機序を明らかにして関連腫瘍発生機構を解明すること目的とした。OLF4は潰瘍性大腸炎ではNF-kappaB、クローン病ではAP-1系による発現を受け、組織学的な炎症活動性と相関すること示した。特に生検材料に着目することにより、OLF4発現とリン酸化NF-kappaB発現はUCの病理組織診断上有用であることを示した。糖タンパク質OLF4はWNT受容体であるFrizzled7に結合してWNT系を阻害し、上皮間葉連関を抑制する。関連腫瘍の浸潤能の高さと関連することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患に特異的なバイオマーカーとして見出したOLF4が潰瘍性大腸炎とクローン病で異なる発現誘導を受けることを明らかにし、その機構を同定した。それに基づいて、潰瘍性大腸炎とクローン病の病理組織診断上の鑑別に有用であることが明らかになった。OLF4はWNT系を抑制する糖蛋白質であることを明らかにし、上皮間葉連関を抑制する機能を有する。これは、炎症性腸疾患関連癌発生に関わるとともに、炎症性腸疾患関連腫瘍の浸潤能の高さと関連することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：OLF4 is a specific biomarker of inflammatory bowel disease(IBD). Its expression is induced biphasically. Aim of this study is clarifying the tumorigenesis mechanism of IBD by analyzing the induction of OLFM4.

OLF4 was induced by NF-kappaB in ulcerative colitis(UC) and by AP-1(c-Jun/c-Fos) in Crohn disease (CD), independently. Its expression was correlated to the histological activity of UC and CD, respectively. Co-expression of OLFM4 and phospho-NF-kappaB/p65 was related to UC specifically, and suggested to be useful to differential diagnosis of UC and CD.

OLF4 is a glycoprotein and binds Frizzled-7, a receptor of WNT pathway. It inhibits WNT pathway and epithelial mesenchymal transition. High expression of inflammatory foci of UC and reduction in associated tumor suggest OLFM4 might be a key molecule for the character of UC-associated tumor with high invasiveness and poor prognosis.

研究分野：分子病理学

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 クローン病 OLFM4 olfactomedin4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 潰瘍性大腸炎発症機序に対するこれまでの知見と我々の関与

難治性疾患である炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)の発症機序として、Th17細胞とIL-17、IL-22を介した炎症・防御機構の関わりやToll様受容体(TLR) - NF-κB系の活性化によるIL-6、TNFα等による炎症誘導が明らかになってきた。NF-κB系はcell surviveにも寄与しており、炎症誘導と関連腫瘍発生の双方に関わっている。このことから、IBDの一つである潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)では腸内細菌叢の異常や細菌腸管粘膜内免疫系の異常が炎症発症及び慢性炎症 - 癌連関としての関連腫瘍発生に深く関わっていると考えられる。我々はUC患者粘膜から*F. varium*を有意に検出し[Ohkusa, *et al. Gut*, 2002]、その産生する酪酸がUC関連癌由来細胞株(UCCA)でp53依存性アポトーシス及びDNA修復を誘導すること[Yoshida, *et al. Int J Cancer*, 2006]、UCでは再生上皮においても多クローン性にp53の変異が生じていることを見出した[Yoshida, *et al. J. Pathol.* 2003]。また、酪酸刺激したUCCAで発現上昇するCITED2を網羅的遺伝子解析により見出し、UC炎症活動性と関連した発現と、p53依存性アポトーシス誘導能を示した[Yoshida, *et al. J Gastroenterol.* 2011]。

2) 前回課題(平成24~26年度基盤研究(C))で明らかにした知見

上記を背景に、我々はUC患者生検組織をもちいた網羅的遺伝子解析によって、活動性UCにおいて特異的に発現上昇するolfactomedin4(OLFM4)を同定し、その炎症活動性との相関と炎症バイオマーカーとしての役割を初めて明らかにした(図1)。UCにおけるToll様受容体(TLR) - NF-κBを介したOLFM4の発現誘導機序が明らかになり、腸内細菌異常に対する自然免疫系の活性化に関連することが示された。これらはOLFM4のUC発症・腫瘍化への関与を示すと共に、抗炎症・抗腫瘍化治療標的としての可能性を示唆している。

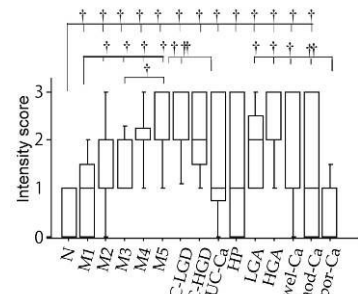


図1 OLFM4 蛋白質発現は UC で炎症活動性 (M1 - M5) と相関する

3) 本研究に至る知見

上記2)において、UCと並んで代表的なIBDであるクローン病(Crohn disease; CD)においてもOLFM4の有意な発現が認められたが、他疾患群と比べてOLFM4発現上昇はIBD共通の特異的な現象であることが示唆された。さらに、UCにおけるOLFM4発現がTLR - NF-κB系を介するのに対して、CDではNF-κB活性化は乏しく(図2)、UCとCDでは異なるOLFM4発現誘導機序の存在が示唆された。OLFM4プロモーター領域にはNF-κB結合部位とAP-1結合部位が併存し、CDではJNK - c-Junを介したAP-1優位の発現誘導の可能性がある(図3)。このことは、「OLFM4発現に対して異なるシグナルカスケードが活性化されていることによる、UC、CD両疾患の病態の差異」、「異なるシグナルカスケードがOLFM4発現に収斂することによるIBDという共通の病態形成」の二点の理解に寄与するもので、UCとCDの共通あるいは疾患特異的な新規抗炎症・抗腫瘍化治療標的の同定に繋がる可能性が十分にある。

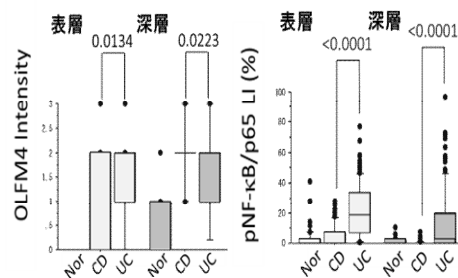


図2 OLFM4 発現(左)は UC ではリン酸化NF-κB(右)発現を伴うが、CD では伴わない

OLFM4は過去の報告ではアポトーシスの抑制に機能するとされていたものの、我々の解析では、OLFM4をノックダウンするとアポトーシスが抑えられ(図4)、OLFM4はこれまでの報告と反して腸上皮ではアポトーシス誘導機能があることが示唆された。OLFM4の機

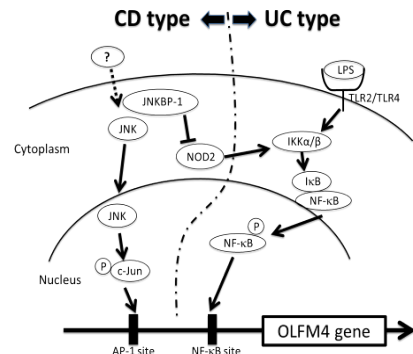


図3 UCとCDでは異なる炎症性シグナルが優位に活性化されるが、共通してOLFM4発現誘導を導く。

能解明は、IBDにおける炎症病態を明らかにすると共に、p53と並ぶ悪性腫瘍発生機序解明の一助となる。その上で、OLFM4の機能強化あるいは機能抑制がIBDの抗炎症治療あるいは腫瘍化リスク軽減に寄与する可能性がある。

2. 研究の目的

- 1) UCとCDにおけるOLFM4発現機序を明らかにし、2疾患の病因病態をOLFM4シグナルカスケードの差異から明らかにすると共に、新規治療標的候補を探索する。
 - (1) JNK - c-Jun及びNF-κBによるOLFM4発現誘導とその機序の分子生物学的証明
 - (2) OLFM4発現機序の差異からみたUC/CDの病態特異性の病理組織学的解析
- 2) 腸上皮細胞におけるOLFM4の機能を明らかにし、IBD共通病態、特に関連悪性腫瘍発生の機序とそのリスク軽減の可能性を病理形態学的、分子病理学的に探究する。
 - (1) OLFM4の細胞生物学的解析による機能同定
 - (2) UC及びCD関連癌におけるOLFM4及び関連分子の動態解析

3. 研究の方法

- 1) UCと同様に、CDでも炎症活動性と相関するOLFM4発現誘導を免疫組織学的に確認する。
- 2) UC、CDにおける二相性のOLFM4発現誘導を明らかにし、特にCDにおけるJNKの上流を担う因子をCpG-DNA刺激等を介して網羅的解析を併せて*in vitro*で同定を試みる。
- 3) OLFM4がIBD共通の抗炎症・抗腫瘍化治療標的となりうるか検証し、各疾患に優位なシグナルカスケード上に疾患特異的な治療標的を探索する。
- 4) 候補分子の阻害系を用いて、抗炎症効果・抗腫瘍発生効果を腸炎誘導マウスで検証する。

4. 研究成果

- 1) UCではリン酸化NF-κB, CDではリン酸化c-Junが組織学的炎症活動性と相関する

UCの組織学的炎症活動性をMattsの組織学的スコアで、CDの組織学的活動性を新たに粘膜内の炎症細胞浸潤でスコア化した。UCではリン酸化NF-κB、CDではリン酸化c-Junとの相関が認められ、UCでのリン酸化c-Jun、CDでのリン酸化NF-κBとの相関は認められなかった。UCにおけるリン酸化NF-κB及びリン酸化c-JunはいずれもOLFM4の発現と相関していたが、UCでのリン酸化c-Jun、CDでのリン酸化NF-κBはOLFM4発現との相関は認められなかった(図5)。

また、OLFM4プロモーター領域のレポーターアッセイ及びChIPアッセイにより、OLFM4はNF-κBに加えてAP-1(c-Jun/c-Fos)による発現誘導を受けることが明らかとなった(図6)。

- 2) OLFM4及びその二相性発現誘導はUC・CDの病理組織診断に有用である

UC・CDにおいてOLFM4が異なる発現誘導を受けつつ共通して発現することは、UC・CDの病理組織診断に有用である可能性が示唆される。UC・CDにおいて、リン

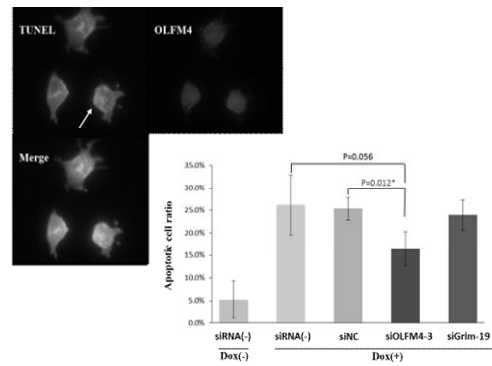


図4 アポトーシス細胞においてOLFM4発現が認められ、OLFM4阻害によりdoxycyclinによるアポトーシスが抑制され

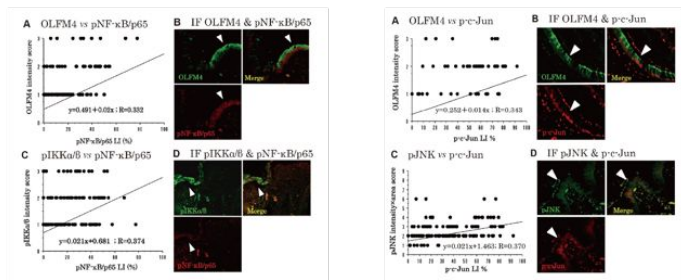


図5 UC、CDではそれぞれpNF-κB/p65、p-c-JunとOLFM4発現が相関する

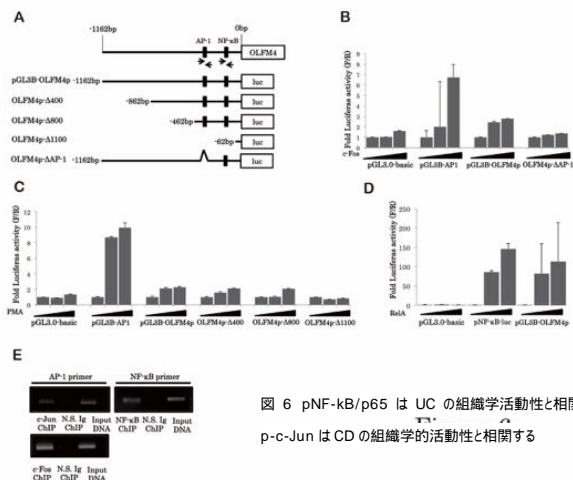


図6 pNF-κB/p65はUCの組織学活動性と相関し、p-c-JunはCDの組織学的活動性と相関する

酸化 NF- κ B 及びリン酸化 IKK α / β 、リン酸化 c-Jun 及びリン酸化 JNK の生検材料における発現を解析したところ、生検粘膜病変における組織学的炎症活動性と OLFM4 発現は有意に相関すると共に、UC ではリン酸化 NF- κ B 及びリン酸化 IKK α / β 、リン酸化 c-Jun 及びリン酸化 JNK の全てとの相関を、CD ではリン酸化 c-Jun 及びリン酸化 JNK との相関が認められた (図 7)。

生検材料におけるリン酸化 NF- κ B 及びリン酸化 IKK α / β 発現は UC 特異的であると考えられ、AUC 解析を行ったところ、特にリン酸化 NF- κ B において特異性が秀でており、「OLFM4 陽性かつリン酸化 NF- κ B/p65 ラベリングインデックス 15%以上」の場合、感度 90%以上、特異度 80%以上で UC を CD を鑑別することが可能であった。

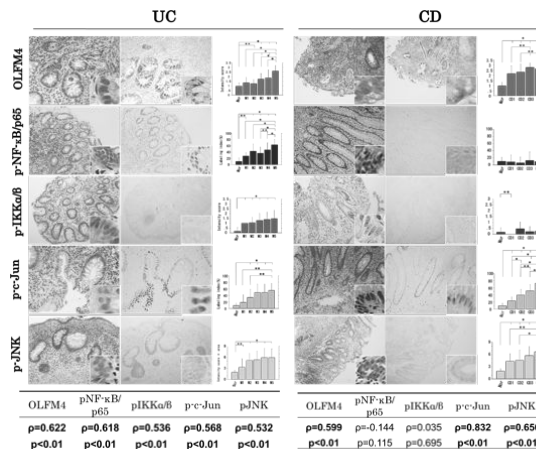


図 7 生検材料における炎症活動性と諸分子発現相関

3) 分泌分子としての OLFM4 と WNT 経路抑制分子としての役割

OLFM4 が分泌タンパクとして WNT 受容体である Frizzled7 への結合と WNT 型の抑制分子としての役割が報告された。OLFM4 発現と WNT 系分子 β -catenin 発現を孤発性大腸癌で検索したところ、OLFM4 発現領域では β -catenin 発現が認められず、OLFM4 非発現領域で β -catenin が発現する、相反した発現が確認された (図 8)。

OLFM4 を強制発現させた細胞株において、脱糖鎖処理を行うと有意に分子量の低下が認められることから、OLFM4 が糖蛋白質であることが示唆された。OLFM4 が Frizzled7 と結合することを免疫沈降法で確認するとともに、OLFM4 強制発現により、活性化型

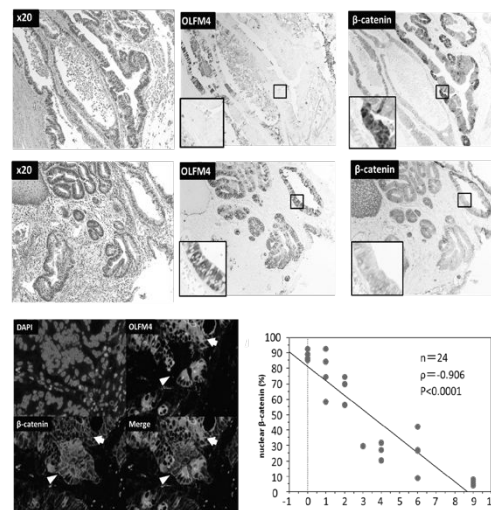


図 8 OLFM4 と β -catenin は相反する発現を示す

β -catenin の減少、上皮間葉連関 (EMT) 関連分子 slug の発現消失が認められた。OLFM4 を *in vitro* 刺激することでも EMT 関連分子発現減少が確認された (図 9)。

これらの結果から、炎症性腸疾患における OLFM4 は炎症活動性バイオマーカーとして病理組織診断学的価値があるとともに、炎症薬では WNT 系を阻害することにより腫瘍化を抑制している可能性が考えられる。UC 関連腫瘍では炎症薬に比して OLFM4 発現は低下しているが、これにより、WNT 系が活性化した、通常の孤発性大腸癌よりも EMT が亢進した浸潤能の高い腫瘍が発生する可能性が明らかとなった。

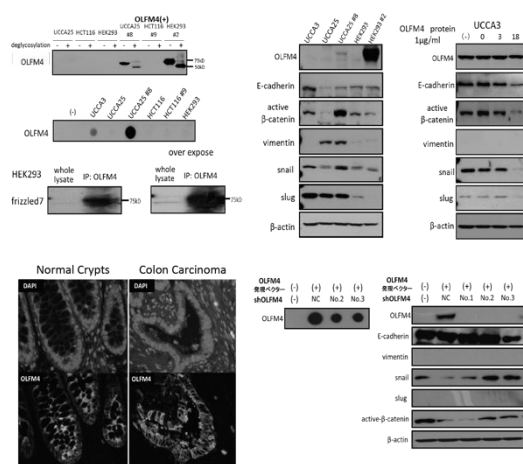


図 9 糖蛋白質 OLFM4 は frizzled7 と結合し、EMT 関連分子発現を抑制する

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件)

- 1) Masashi Mikubo, Raito Maruyama, Hirokuni Kakinuma, Tsutomu Yoshida, Yukitoshi Satoh. Case of a ciliated muconodular papillary tumors of the lung: cytologic features and diagnostic pitfalls in intraoperative examinations. *Diagnostic Pathology*, in press, DOI: 10.1002/dc.24169. 査読有り

- 2) Kosuke Okuwaki, Hironori Masutani, Hiroshi Imaizumi, Tsutomu Yoshida, Mitsuhiro Kida, Tomohisa Iwai, Hiroshi Yamauti, Masayoshi Tadehara, Kai Adachi, Masafumi Watanabe, Takahiro Kurosu, Wasaburo Koizumi. Analysis of BRCAness with multiplex ligation-dependent probe amplification using formalin-fixed and paraffin-embedded pancreatic ductal adenocarcinoma tissue obtained via endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy. *Pancreatol*, 19, 419-423, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2019.02.010>. 査読有り
- 3) Tomohiro Betto, Hideaki Amano, Yoshiya Ito, Koji Eshima, Tsutomu Yoshida, Yoshio Matsui, Sakiko Yamane, Tomoyuki, Onoue, Fumisato Otaka, Kiyonori Kobayashi, Wasaburo Koizumi, Masabumi Shibuya, Masataka Majima. Vascular endothelial growth factor receptor 1 tyrosine kinase signaling facilitates healing DSS-induced colitis by accumulation of Tregs in ulcer area. *Biomed Pharmacother* **111**, 131-141, 2019. 査読有り <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.021>
- 4) Yukiko Matsuo, Tsutomu Yoshida, Kazuya Yamashita, Yukitoshi Satoh. Reducing DNA damage by formaldehyde in liquid-based cytology preservation solutions to enable the molecular testing of lung cancer specimens. *Cancer Cytopathol* **126**(12), 1011-1021, 2018. DOI: 10.1002/cncy.22069. 査読有り
- 5) Matsuo, Y., Shiomi, K., Sonoda, D., Mikubo, M., Naito, M., Matsui, Y., Yoshida, T., Satoh, Y. Molecular alterations in a new cell line (KU-Lu-MPPt3) established from a human lung adenocarcinoma with a micropapillary pattern. *J Cancer Res Clin Oncol* **144**(1), 75-87, 2018. doi: 10.1007/s00432-017-2541-0. 査読有り
- 6) Kayo Horie, Tetuo Mikami, Tsutomu Yoshida, Yuichi Sato, Isao Okayasu. Peroxiredoxin 1 expression in active ulcerative colitis mucosa identified by proteome analysis and involvement of thioredoxin based on immunohistochemistry. *Oncology Letters* **15**(2), 2364-2372, 2018. doi:10.3892/ol.2017.7549. 査読有り
- 7) Okayasu, I., Hana, K., Nemoto, N., Yoshida, T., Saegusa, M., Yokota-Nakatsuma, A., Song, S-Y., Iwata, M. Vitamin A Inhibits Development of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis and Colon Cancer in a Mouse Model. *BioMed Res Int* (2016) 4897809. doi:10.1155/2016/4874809. 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 横山 慧、吉田 功、橋村美紀、三枝 信. Olfactomedin-4 の炎症性腸疾患関連腫瘍発生における役割. 第 107 回日本病理学会総会, 2018.6.23, ロイトン札幌(北海道・札幌市).
- 2) 吉田 功、橋口 収、橋村美紀、三枝 信. 炎症性腸疾患バイオマーカーolfactomedin-4 の関連腫瘍発生における役割. 第 106 回日本病理学会総会, 2017.4.27, 京王プラザホテル(東京都・新宿区).
- 3) 橋口 収、吉田 功、大熊拓也、横田 章、岡安 勲、三枝 信: 潰瘍性大腸炎におけるバイオマーカーolfactomedin 4 の発現機序の解明. 第 105 回日本病理学会総会, 2016.5.12, 仙台国際センター(宮城県・仙台市).
- 4) 吉田 功、永田 匠、橋口 収、鈴木瑞人、橋村美紀、三枝 信: Immunohistochemical

analysis of OLFM4 and its related molecules in the differential diagnosis of IBD.
第 105 回日本病理学会総会, 2016.5.12, 仙台国際センター(宮城県・仙台市).

- 5) 大熊拓也、吉田 功、橋口 収、横田 章、岡安 勲、三枝 信：潰瘍性大腸炎バイオマーカーolfactomedin 4 の機能同定とその意義. 第 104 回日本病理学会総会, 2015.5.1, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Isao Okayasu, Mutsunori Fujiwara, Tsutomu Yoshida. The Role of Vitamin A-Storing Cells (Stellate Cells) in Inflammation and Tumorigenesis. In *Vitamin A*. (Leila Queiroz Zepka eds.) Intech Open Access Book, Intech, London, 2019(ISBN 978-1-78923-946-1, DOI: 10.5772/intechopen.83523)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/endures/byouri-s.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三枝 信

ローマ字氏名：SAEGUSA, Makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。