

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08452

研究課題名(和文) 消化管上皮の領域特異的な発生と分化を制御する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of region-specific cellular differentiation in the gastrointestinal epithelium.

研究代表者

森 健太郎 (MORI, Kentaro)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：50397296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：消化管上皮の形成は、内胚葉が領域特異的な分化能を獲得し各領域特異的な細胞からなる組織へと成熟していくことで形成される。内胚葉から上皮への分化に関わる転写因子は成体組織においても重要な機能を持ち、その制御の破綻は異所性上皮形成やがん化とも深く関わっている。しかしそうした転写因子がどのように制御されているかは不明な点が多い。我々は小腸上皮の形成過程で分化抑制因子Id2が前腸内胚葉転写因子Irx3/5の発現抑制を介して細胞の運命決定を制御することを見出した。本研究は分化抑制という新たな視点から消化管上皮細胞の運命決定の分子基盤を解明し、異所性上皮の形成や腫瘍化メカニズムを理解することを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、正常組織構築に関わる分子機構の理解のみならず、細胞の脱制御による上皮異形成の発症機序を明らかにする上で有益な知見をもたらす、食道がんや胃がんに対する治療法の開発に貢献することが期待される。また、発生過程の分化調節メカニズムが明らかになることにより、多能性幹細胞から安全性の高い機能性消化管上皮細胞の作製といった再生医療の実現にも貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：The gastrointestinal epithelium is formed when tubular endoderm establishes region-specific cellular identity along its anterior-posterior axis. Many of the transcription factors which expressed in a region-specific manner and regulate endoderm differentiation also play important roles in maintaining adult epithelial homeostasis. Their dysregulation is closely related to the formation of ectopic epithelia and the development of cancer. However, it remains unclear how the region-specific expression of such transcription factors is regulated in the cell fate specification. We have previously found that Id2, a negative transcriptional factor, regulates the differentiation of the small intestinal epithelium through the suppression of foregut transcription factors Irx3/5.

In this study, we elucidate the mechanism of gastrointestinal epithelial cell fate determination based on inhibition of cell differentiation and to understand the mechanism of ectopic epithelial formation and tumorigenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞分化 消化管上皮 遺伝子発現 転写因子 がん

1. 研究開始当初の背景

食道、胃、小腸や大腸などの内腔を覆う上皮管腔組織は、領域特異的な機能と形態を持ち、体内外の隔絶や消化吸収といった生体維持に重要な役割を果たしている。上皮を構成する細胞の増殖と分化は、各細胞系列特異的転写因子や、間充織との液性因子や接着因子等を介した細胞間相互作用により精緻に制御されており、その破綻は消化管腫瘍の発生機序とも密接に関連している。

マウス消化管上皮の形成は原腸内胚葉が胎生9日までに食道、胃、膵/肝、腸といった各領域への分化能を獲得する事に始まる。Sox2(食道/胃)、Barx1(胃)、Cdx2(腸)等の転写因子は領域特異的に発現し、各領域の上皮形成に必須の機能を果たしている。Sox2欠損マウスでは前腸内胚葉が腸上皮細胞に分化し、Cdx2欠損マウスは胎生9日からの欠損では遠位中腸内胚葉が食道や前胃を構成する扁平上皮細胞へと分化し、胎生13日からの欠損では同領域が各種胃上皮細胞へ分化する。また、前腸間充織で発現するBarx1の欠損マウスでは前腸内胚葉から胃上皮細胞への分化が損なわれ、腸上皮細胞に分化する。Sox2やCdx2の発現変化はバレット食道や腸上皮化生といったヒト消化管がんの素地となる上皮の変化とも一致しており、領域特異的な上皮の発生分化機構の解明は、異所性上皮の発症と腫瘍化を理解する上でも重要な課題である。しかしそうした領域特異的に発現する転写因子が空間的・時間的にどのように制御されているのか明らかになっていない。

研究代表者は転写抑制因子Id(Inhibitor of DNA binding/differentiation)ファミリーの1つであるId2の遺伝子欠損マウスでは胎仔小腸に異所性扁平上皮や異所性胃上皮が形成され、生後そうした上皮が高頻度に腫瘍化することを見出した(Mori K. et al, *Mol Cell Biol.* 2018)。Id2は中腸内胚葉においてSox2や転写因子Irx3/5の発現を抑制し、かつ間充織に対してBarx1の発現を抑制する一方、小腸上皮細胞の分化誘導因子Cdx2の発現を維持することで、小腸上皮の発生分化を制御することが判明した。このことから、「胃(腸)にならないようにすることで腸(胃)に分化する」という、分化抑制機構が消化管上皮細胞の発生分化における重要な分子基盤を形成していることが想定された。

2. 研究の目的

転写因子Irx3/5は前腸内胚葉において胃上皮細胞への分化過程で発現し、その機能はId2をはじめ腸上皮細胞特異的遺伝子の発現を抑制することで胃上皮細胞の発生分化を促進すると考えられる。本研究では、胃上皮細胞の分化におけるIrx3/5の機能を明らかにするために、Irx3/5の標的遺伝子転写調節メカニズムとIrx3/5の機能制御に関わる結合因子の探索を中心に研究を行う。また、成体上皮の脱制御における分化抑制因子の関与を検討するため、ヒト腸上皮化生におけるId2およびIrx3/5の発現解析を行う。

3. 研究の方法

(1) IRX3/5による標的遺伝子転写調節メカニズムの解析

IRX3/5の抑制性転写調節の分子機構を明らかにするため、標的遺伝子のレポーター遺伝子を構築し、レポーターアッセイを行った。標的遺伝子である腸上皮特異的CDH17遺伝子及びHEPH遺伝子のプロモーター領域(CDH17;-1000/+43, HEPH;-485/+248)をPCRにより単離し、ルシフェラ

一ゼ遺伝子と融合させたレポーター遺伝子を構築した。トランス因子である *IRX3/5* について、野生型のほかに各機能ドメイン欠失体発現プラスミドを構築し、アッセイに使用した (図 1A)。 *IRX3/5* 発現プラスミドとレポーター遺伝子を導入する細胞としてヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 を用いた。 *SMYD* ファミリータンパク質と *IRX3/5* の相互作用については、ペプチドタグ (FLAG) を付加した各 *SMAD* 発現プラスミドを構築し、免疫沈降およびウエスタンブロッティングにより解析を行った。

(2) *IRX3/5* 結合因子の探索

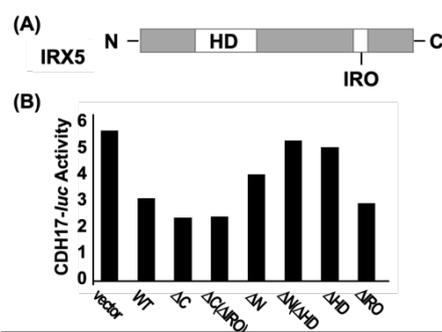
テトラサイクリン誘導型 FLAG-*IRX3/5* 発現プラスミド (Tet-*IRX3* および Tet-*IRX5*) を構築し、テトラサイクリン誘導体 (ドキシサイクリン; Dox) 添加により *IRX3/5* と相互作用する因子を共免疫沈降により探索した。 Tet-*IRX3* および Tet-*IRX5* 発現プラスミドを 293T 細胞に導入したのち 16 時間後に Dox を添加し、さらに 48 時間後に細胞を回収して細胞溶解液を調整した。細胞溶解液と抗 FLAG 抗体を固相化した担体を反応させ、*IRX3/5* 結合因子の共免疫沈降を行った。結合因子は、SDS-PAGE による分離後、ゲルを銀染色することにより検出した。検出したバンドをゲルから回収し、質量分析測定により *IRX3/5* 結合因子の定性を行った。確認された因子と *IRX3/5* の結合は、免疫沈降とウエスタンブロッティングにより確認した。

(3) ヒト腸上皮化生における ID2 および *IRX3/5* の発現解析

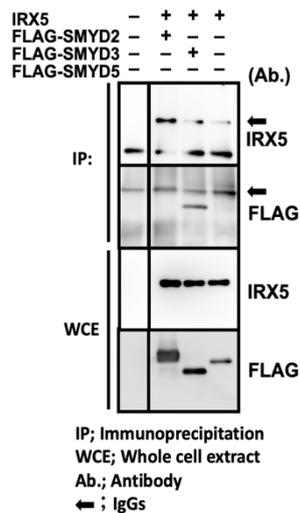
2016 年 7 月から 2019 年 6 月の間に大阪国際がんセンター病院において胃の内視鏡的粘膜下層剥離術あるいは手術で摘出した組織より作製された組織片について、各種抗体 (ID2、*IRX3*、*IRX5*、*CDX1*、*CDX2*) を用いて免疫染色を行った。上記施設でのオプトアウトと倫理審査および研究代表者の所属機関の倫理審査委員会の許可の元に実施した。

4. 研究成果

(1) *IRX3* および *IRX5* はレポーター遺伝子に対して dose-dependent にレポーター活性を抑制することを確認した。*IRX5* の転写調節活性に関わる機能ドメインを同定するため、*IRX5* 変異体プラスミドを構築し、同様にアッセイを行った。その結果、*IRX5* の転写抑制活性には、N 末側のホメオドメイン (HD) が重要であることが判明した (図 1)。HD が転写抑制に重要であることについては、*IRX3* についても同様であった。*IRX5* は心筋-心内膜形成において *Kv4.2 potassium channel* の発現を調節し、再分極電流の勾配を形成するために機能することが報告されている (Costantini DL. et al, *Cell*. 2005)。 *Kv4.2 potassium channel* の発現抑制において、*IRX3/5* は *SMYD1* (SET and MYND domain containing 1) と結合し、*SMYD1* はさらに HDAC と結合して転写抑制に働くと考えられている。上記レポーターアッセイにおいても HDAC 阻害剤添加により *IRX3/5* の転写抑制活性は dose-dependent に抑制された。*SMYD1* の発現は心筋に局限するため、*SMYD* ファミリー (*SMYD1-5*) のうち、消化管で発現する *SMYD* タンパク質と *IRX3/5* の

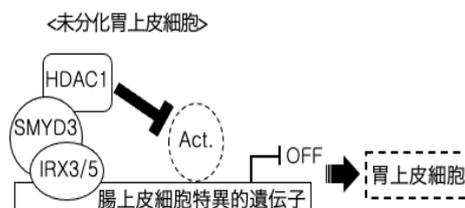


(図 1) (A) *IRX5* のドメイン構造 (B) *CDH17* 遺伝子レポーター遺伝子に対する *IRX5* 野生型 (WT) および各種変異体を用いたレポーターアッセイ。



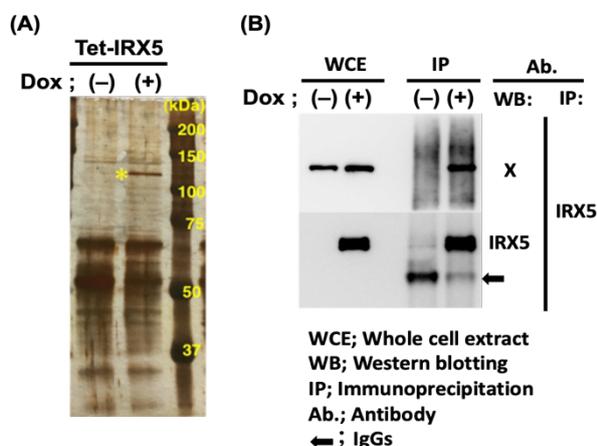
(図 2) IRX3/5 と SMYD2-5 の結合。各 SMYD はペプチドタグ (FLAG) により検出している。

相互作用を検討したところ、IRX3/5 は SMYD3 と結合することが確認された (図 2)。レポーターアッセイにおいて *SMYD3* siRNA を *IRX5* と同時に発現させたところ、*IRX5* によるレポーター遺伝子の抑制効果が減弱した。これらの結果から、*IRX3/5* は胃上皮細胞の分化過程で腸上皮特異的遺伝子の制御領域に結合し、HDAC を制御領域にリクルートすることでヒストンアセチル化を抑制し、それによって転写抑制に機能していると考えられた (図 3)。



(図 3) IRX3/5 による胃上皮細胞の分化制御機構。Irx3/5 は腸上皮特異的遺伝子のヒストンアセチル化 (Act.) を抑制し、胃上皮細胞の分化を進行させる。

(2) IRX5 の機能調節メカニズムを明らかにするため、IRX5 と相互作用する分子を共免疫沈降により探索した。共免疫沈降サンプルの SDS-PAGE による分離の結果、IRX5 と結合するタンパク質が複数確認された。これらのうち 120kDa のサイズのタンパク質をゲルより回収し、質量分析 (LC-MS/MS) による定性を行ったところ、翻訳後修飾活性をもつ 'X' (論文発表前のため、分子名は伏字) であることが確認された (図 4)。また、X は IRX3 とともに IRX5 と同様に結合することが判

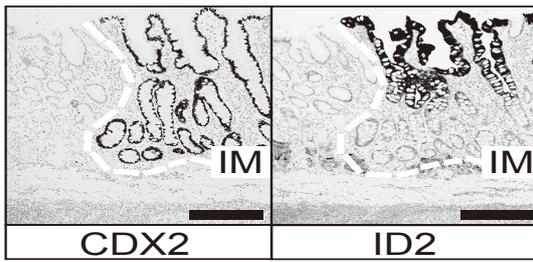


明した。X と IRX3/5 の相互作用の生理的意義を明らかにすることで IRX3/5 の機能制御が明らかになると考えられ、今後は胃上皮細胞の発生分化過程において X が IRX3/5 の機能にどのように関与しているかについて検討する。

(図 4) IRX5 結合分子の同定 (A) SDS-PAGE と銀染色により 120kDa 付近のバンド (*) を検出。(B) 免疫沈降法とウエスタンブロッティングによる結合の確認。IRX5 は内因性の X と結合する。

(3) マウスで確認された小腸上皮の発生分化過程における *Id2* の機能がヒト成体上皮の組織変化にも関与しているかを免疫染色により検討したところ、腸上皮細胞マーカーである CDX1 および CDX2 陽性の腸上皮化生では ID2 が高発現していることが判明した (図 5)。一方、IRX3/5 は病変部では明確な発現は検出されなかった。腸上皮化生の形成は炎症・ストレスが引き金となる胃上皮細胞の初期化とそれに続く腸上皮細胞特異的遺伝子の発現により進行することから、*Id2* は腸上皮化生の形成において、そうしたいずれかの段階に関与していることが考えられた。また、ヒト腸上皮化生における *ID2* の発現パターンは *CDX2* などの腸上皮細胞特異的遺伝子と異なり、病変内の細胞不均一性を反映していた。腸上皮化生は完全型と不完全型に分類されることから、今後は両組織型の検体について *ID2* 抗体を用いた免疫染色を行い、染色像と組織型の相関を解

析し、組織型分類に有効なマーカーとなりうるか検討を進める。



(図5) ヒト腸上皮化生における CDX2 と ID2 の発現。腸上皮化生の領域 (IM) の上皮は腸上皮特異的転写因子 CDX2 を発現する (左図, 黒) が、同上皮の一部は管腔面の細胞を中心に ID2 を発現する (右図, 黒)。左図と右図は連続切片。Bar : 100 μ m

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uchida Nobuaki, Mori Kentaro, Fujita-Nakata Michiyo, Nakanishi Megumi, Sanada Mitsuru, Nagayama Shigemi, Sugiyama Hiroshi, Matsui Makoto	4. 巻 353
2. 論文標題 Systemic cellular immunity and neuroinflammation during acute flare-up in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577500 ~ 577500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2021.577500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Kentaro, Tamada Kota, Kurooka Hisanori, Matsui Makoto, Takumi Toru, Yokota Yoshifumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Gene expression profile data of the developing small intestine of Id2-deficient mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 103717 ~ 103717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.103717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 妹尾貴紀, 藤田充世, 森健太郎, 中山丈夫, 内田信彰, 中西恵美, 野寺裕之, 長山成美, 松井 真
2. 発表標題 多彩な抗ガングリオン抗体が病態に関与した軸索型ギラン・バレー症候群 (GBS) の一例
3. 学会等名 第158回日本神経学会東海北陸地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西恵美, 真田 充, 野寺裕之, 内田信彰, 森健太郎, 中山丈夫, 藤田充世, 長山成美, 松井 真
2. 発表標題 頻回の再発と難治性を呈した両側視神経炎の一例
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西恵美, 内田信彰, 森 健太郎, 藤田充世, 真田 充, 長山成美, 三輪高喜, 松井 真
2. 発表標題 診断・治療に難渋した中枢神経侵襲性真菌感染症の一例
3. 学会等名 第24回日本神経感染症学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西恵美, 内田信彰, 森 健太郎, 藤田充世, 真田 充, 長山成美, 松井 真
2. 発表標題 痙攣で発症したステロイドパルス療養が著効した自己免疫性脳炎の疑い例
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	黒岡 尚徳 (KUROOKA Hisanori) (00293879)	相模女子大学・栄養科学部・教授 (32707)	
研究 分担者	中村 ハルミ (NAKAMURA Harumi) (80164325)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・ゲノム病理ユニット・ユニット長 (84409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------