

平成22年 5月24日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008~2009  
 課題番号： 20790492  
 研究課題名 (和文) 自然免疫の活性化による消化管上皮のWntシグナル制御機構の解析

研究課題名 (英文) Regulation of Wnt signaling by activated innate immunity in intestinal epithelium.

研究代表者

米門 秀行 (KOMEKADO HIDEYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号： 90452359

研究成果の概要 (和文) : 消化管上皮細胞において微小環境による細胞増殖制御について解析を行った。上皮細胞が分泌する IL-6 は STAT3 の活性化を介して細胞増殖を制御しており、STAT3 がβカテニンの細胞内局在を制御することにより Wnt シグナルを制御していることが示唆された。腸管上皮の微小環境として自然免疫系が重要であり、自然免疫系と Wnt シグナルのクロストークにつき、STAT3 の役割を中心に今後さらに解析を行う予定である。

研究成果の概要 (英文) : We investigated how microenvironment regulates cell growth in gastrointestinal epithelium. IL-6 secreted by epithelial cells was shown to regulate cell growth through STAT3 activation, probably via the nuclear translocation of beta-catenin by STAT3 and resulting Wnt signaling activation. Innate immunity has been reported to regulate intestinal microenvironment, and the crosstalk between innate immunity and Wnt signaling should be further analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学 (小腸・大腸)、消化管Wntシグナル

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内蛋白質であるβカテニンは、核内へ移行すると核内で転写因子である T cell factor (Tcf) と結合し、c-Myc などの細胞増殖を司る遺伝子の発現を

誘導する。細胞内のβカテニンは、Axin-APC-GSK-3β複合体と結合しGSK-3βによってリン酸化され、引き続きユビキチン化されて分解されるため、その蓄積が抑制されている。細胞外の

リガンドである Wnt (ウイント) が細胞膜上のレセプターである Frizzled や LRP に結合すると、Axin 複合体が抑制されるため、 $\beta$ カテニンが分解を免れ、Tcf を介した遺伝子の発現が亢進する。このような Wnt による $\beta$ カテニン-Tcf の活性化は、消化管上皮の発生や増殖に必須である (Korinek V 他, Nat. Genet. 19, 1998)。また、多くの大腸癌では、APC 遺伝子もしくは $\beta$ カテニン遺伝子のいずれかに変異が生じており、そのため $\beta$ カテニンの分解機構が破綻し、過剰なシグナルにより増殖が誘起されることが発癌の引き金となると考えられている (Polakis P, Genes & Dev. 14, 2000)。

- (2) 一方、消化管上皮は常に管腔内の腸内細菌や食餌抗原に曝されているが、通常はこれらの抗原に対する免疫応答は抑制されており、炎症を来す事は無い。このような恒常性の維持に自然免疫系が関与している事が近年明らかになってきている。例えば、上皮細胞に発現している TLR (Toll-like receptor) によって常在細菌叢が認識される事が腸管上皮の防御に必要である事が報告されている (Rakoff-Nahoum S 他, Cell 118, 2004)。
- (3) このように、上皮の恒常性の維持には複数の機構が働いているが、この機構間でなんらかの相互作用が予想される。例えば、TLR シグナルに必須なアダプター分子である MyD88 のノックアウトマウスでは、細胞周期を促進する Cyclin D1 や c-Myc の発現が増加し、腸管上皮細胞の増殖が亢進する事が知られているが (Rakoff-Nahoum S 他, Cell 118, 2004)、Cyclin D1 や c-Myc は $\beta$ カテニン

-Tcf の既知の標的遺伝子である。こうした事実は管腔側からの細菌抗原による TLR を介するシグナルが $\beta$ カテニン-Tcf 活性を抑制する可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

消化管上皮は、通常の状態では極性が保たれており、バリアー機能を含む恒常性の維持に寄与している。一方、炎症や腫瘍などの病的な状態ではその極性が失われることが、その病態に大きく関与していると考えられる。Wnt を含む成長因子やサイトカインは、極性を保持した正常消化管上皮細胞では主として間質から基底側を介して上皮細胞を刺激する。一方で、生体内において上皮細胞は常に腸管側 (頂上側) にて食餌抗原や微生物抗原に接しており、この刺激が上皮細胞の Wnt- $\beta$ カテニン系を含めた増殖シグナルを制御している可能性が考えられる。上述の様に、Wnt- $\beta$ カテニンシグナル及び自然免疫系クロストークがある事が示唆されているが、本研究開始時点でまとまった研究報告は無く、その解析により、消化管の発生・分化における腸内抗原の意義などの新たな知見を得られる事が期待される。更に、分極化した上皮細胞で解析を行うことにより、消化管疾患における病態を分子レベルでの解明し、炎症性腸疾患などの消化管疾患の新たな治療法の進展に寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) CaC02 や HCA7 など、大腸癌由来の細胞株を Transwell chamber 中にて 2-3 週間培養する事により、分極化した上皮細胞の単層が得られる。単層の細胞層を介する電気抵抗 (Trans-epithelial resistance, TER) は分極化が成熟する

と増大する事が知られており、TER を計測する事により、消化管上皮に関連したシグナルによる密着結合の形成、即ちバリアー機構の強弱を客観的に評価することが可能になる。

- (2) 前述の通り、MyD88 のノックアウトマウスでは腸管上皮細胞の増殖が亢進し、Tcf の既知の標的遺伝子でもある Cyclin D1 や c-Myc の発現が亢進するが、このことは TLR を介するシグナルが、 $\beta$  カテニン-Tcf 経路を抑制する可能性を示唆する。TLR から MyD88 を介して NF- $\kappa$ B を活性化する経路における重要なキナーゼとして TAK1 (Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1) があるが、TAK1 は NLK (NEMO-like kinase) を介して Tcf をリン酸化し、その転写活性を抑制する事が知られている (Ishitani T 他、Nature 399, 1999)。この TAK1-NLK 経路に着目し、TAK1 を過剰発現もしくはノックダウンした場合の Wnt シグナルの活性化状態の変化を解析する。具体的には、c-Myc, Cyclin D1 などの発現量の変化、 $\beta$ カテニンの局在の変化、及び Tcf などの転写因子の活性 (Tcf レポーター遺伝子である TOP-Flash を用いる) などを解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) 上述のごとく、本研究では当初、自然免疫系と Wnt シグナル系の両シグナルのクロストークに重要であると予想される蛋白質として TAK-1 及び NLK に着目したが、有為な結果が得られなかった。
- (2) 一方、我々は以前に腸管における $\beta$ カテニンの局在及び Wnt シグナル制御において、転写因子である STAT3 (signal transducer

and activator of transcription 3) が重要であることを報告している (Kawada M 他, Cancer Res. 66, 2006)。また、腸管における自然免疫系の制御に、IL-12 などサイトカイン及び STAT3 シグナル経路が重要であることが以前から報告されており (Kobayashi M 他, J. Clin. Invest. 111, 2003)、自然免疫系と Wnt シグナルのクロストークに関わる分子として、STAT3 の役割について着目し解析を行った。

- (3) まず、消化管癌細胞株から自己分泌されるサイトカインによる STAT3 シグナルの制御機構について解析を行った。消化管癌細胞株を血清非存在下で 48 時間培養し、その培養上清中のサイトカインの発現パターンを抗体アレイを用いて網羅的に解析を行ったところ、種々のサイトカインの発現が蛋白質レベルで確認出来たが、特に IL-6 及び IL-8 が高発現していた。次に、同じ細胞株より RNA を回収し、その遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイによって解析したところ、IL-6 を含む炎症性サイトカインが高発現していた。従って、消化管癌細胞が自己分泌する IL-6 が、癌細胞の微小環境の構築に重要である可能性が示唆された。ELISA の手法によっても培養上清中の IL-6 発現を確認した。

- (4) 上述のごとく、消化管上皮細胞において、Wnt- $\beta$ カテニンシグナルが細胞増殖制御に重要な役割を果たしている。そこで、自己分泌される IL-6 の細胞増殖制御に関する役割につき解析を行った。消化管細胞株の増殖を MTS アッセイにて定量する方法を構築し、IL-6 中和抗体を培養上清中に添加したところ、コントロールと比較して細胞増殖が有為に抑制さ

れた。また、同細胞を IL-6 中和抗体にて処理したのち、細胞抽出物を Western blotting にて解析したところ、コントロールと比較して、STAT 3 のリン酸化が抑制されており、従って STAT3 の活性化に、自己分泌される IL-6 が重要であることが示された。また、複数の低分子量阻害剤を用いた実験にても、JAK/STAT3 経路が同細胞における細胞増殖に重要であることを確認した。

- (5) 以上の実験結果及び既知の報告より、消化管上皮細胞において、IL-6 が STAT3 を活性化し、細胞増殖を制御していることが解明された。上述のごとく、我々は以前に STAT3 がβカテニンの核内集積を促進することを報告しており、サイトカイン-STAT3-βカテニンによる細胞増殖経路の存在が強く示唆される。今後、Wnt シグナル経路の活性化についても、引き続き解析をおこなっていく予定である。また、TLR や NOD を介した自然免疫系のシグナルと Wnt シグナルのクロストークにつき、STAT3 を key mediator として、今後解析を進める予定としている。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ① 秋武玲子、神田啓太郎、米門秀行、河田真由美、妹尾浩、千葉勉  
マウス内視鏡モデルを用いた新規大腸粘膜傷害・再生モデルの検討  
第 51 回日本消化器病学会大会  
2010 年 10 月 15 日 国立京都国際会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米門 秀行 (KOMEKADO HIDEYUKI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：90452359