

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07456

研究課題名(和文)大腸粘液産生制御と創薬を目指した分子基盤の構築

研究課題名(英文)Constructing a molecular basis for regulation of colonic mucus production and drug discovery

研究代表者

長久保 大輔 (NAGAKUBO, Daisuke)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：10368293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸には糖タンパク質ムチンを成分とする2層からなる粘液層が存在し、宿主への細菌の侵入を防いでいる。粘液の産生は大腸上皮の中の杯細胞が担っている。本研究課題では杯細胞の分化や粘液産生制御の解析を行った。その結果、大腸に発現するケモカインCCL28がその受容体CCR10を介した杯細胞への分化誘導作用、および杯細胞の粘液産生促進作用を持つ可能性を明らかにした。また、大腸上皮細胞に及ぼすケモカイン系の作用の解析から、CCL28の別の受容体CCR3の阻害が、がん悪性化に關与する上皮間葉転換や倍数体巨大化細胞の形成を誘導することを見出し、そのシグナル伝達経路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸には膨大な数の細菌が存在するにも関わらず、宿主との共生関係が成立している。そこには大腸上皮の中の杯細胞と呼ばれる細胞が分泌する粘液が重要な役割を果たしている。本研究は、液性因子であるケモカインCCL28が大腸における杯細胞の分化や粘液産生を制御するという新規の概念を提供した。また、CCL28の受容体でもあるCCR3の阻害は大腸がんの悪性化の誘導にも関わることを明らかにした。今回得られた分子機構は新規の知見であり、それらが杯細胞の機能異常による炎症性腸疾患、あるいは大腸がんなどに対する将来的な創薬の治療標的に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The large intestine contains two layers of mucus composed of glycoprotein mucin, which prevents bacteria from entering the host. Goblet cells in the colonic epithelium are responsible for the production of mucus. In this research project, we analyzed the differentiation and regulation of mucus production of goblet cells. As a result, we clarified the possibility that the chemokine CCL28, expressed in the large intestine, induces differentiation into goblet cells via its receptor CCR10 and promotes mucus production of goblet cells. Furthermore, from the analysis of the effects of chemokines on colorectal epithelial cells, we found that inhibition of another CCL28 receptor, CCR3, induces epithelial-mesenchymal transition and formation of polyploid giant cells, which are involved in cancer malignant transformation, and clarified its signal transduction pathway.

研究分野：実験病理学、生化学、免疫学

キーワード：大腸 杯細胞 粘液 ケモカイン 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

我々の健康や生命は、我々を宿主とする細菌の集団(細菌叢)との相互作用に大きく依存しており、共生関係が成立している。特に大腸には1000種類以上、合計して約1000兆個もの膨大な数の細菌が存在し、宿主の日常の食習慣や生活環境などとも関連した、個々の宿主ごとに異なる複雑な細菌叢が形成されている。しかし、大腸の中で細菌は直接、大腸の粘膜に接触しているわけではない。大腸には分厚い2層の粘液層が存在していて、共生する細菌はそのうちの比較的密度がゆるい外粘液層(大腸の内腔側の粘液層)に存在する。粘液を構成する糖タンパク質の「ムチン」が細菌に結合することで、それより内側のムチンの密度の高い内粘液層(上皮細胞側粘液層)の内部まで細菌が侵入できないように物理的なバリアの仕組みが出来上がっているためである。この様にして健康人の場合、大腸の上皮細胞は腸内細菌叢とは空間的に離れて位置し、大腸に無数に存在する細菌は、実際には宿主によって、大腸の外粘液層に置かれた状態で定住している。一方で、粘液層が正常に形成されない大腸では、その共生のバランスが乱れ、大腸粘膜が直接細菌と接触するリスクが高まることとなる。現実的に組織にまで細菌が浸潤する事態となれば、宿主では生体防御反応としての炎症反応が惹起される。

大腸内腔を覆う一層の上皮組織は、機能的に種類の異なる細胞によって構成されている。栄養成分の吸収にはたらき、上皮細胞の大部分を占める「吸収上皮細胞」、消化管ホルモンの分泌にはたらき「腸内分泌細胞」、寄生虫感染応答にはたらきごく僅かな「タフト細胞」、そして、大腸での粘液産生にはたらき「杯細胞」である。杯細胞は前述のムチンと呼ばれるO結合型糖鎖が付加した粘性をもつ糖タンパク質を大量に産生し、大腸の内腔に分泌していて、これが粘液の主成分になっている。従って、大腸で宿主と細菌との共生関係を常に良好な状態に維持するためには、大腸に分泌される大量の粘液産生を担っている杯細胞の適切な制御が必要不可欠となる。具体的には、大腸に粘液を絶えず供給する杯細胞の粘液産生や分泌の機能制御機構、大腸上皮幹細胞から杯細胞への分化機構、あるいは上皮組織内での杯細胞の細胞数を一定に調節する機構などである。しかし、これまでに大腸での杯細胞の粘液産生や分化制御に関係した分子機構の多くは明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

ケモカインは生体内の細胞動態制御の主要因子である。大腸などの粘膜免疫に関わる重要なケモカインの一つとしてはCCL28が知られている。研究代表者はこれまでにCCL28の重要性について、大腸での選択的役割(Hieshima et al., *J Immunol.*, 2004.)、受容体CCR10の発現制御(Shirakawa AK et al., *J Immunol.*, 2008.)、アレルギー性鼻炎への関与(Nagakubo et al., *Cell Immunol.*, 2016.)、および、CCL28欠損マウスを用いた大腸のIgA産生細胞の動態・機能制御機構(Matsuo et al., *J Immunol.*, 2018.)などを報告してきた。一方、生体防御システムの一つである「粘液」に着目したケモカイン系の解析はほとんど行なわれていなかった。

そこで、本研究では大腸杯細胞の粘液産生制御や分化制御に及ぼすケモカイン系の作用について、特に大腸で高発現して重要な機能を担っているCCL28に着目し、独自の視点から明らかにすることを目的とした。そして、潰瘍性大腸炎等の難治性疾患に対する将来の治療法や予防法の創出、あるいは創薬のための基盤となる分子機構を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

(1) 8-11週齢のC57BL/6マウスの野生型、およびCCL28欠損マウスから採取した大腸を1%パラホルムアルデヒドで固定し、包埋・薄切の後、大腸粘液の主成分である分泌型ムチンMUC2(杯細胞マーカー)の免疫組織染色や、アルシアンブルーによる酸性粘液の染色、過ヨウ素酸シッフ(PAS: Periodic acid-Schiff)染色による中性粘液の染色、およびグラム陽性細菌検出のためのグラム染色を行った。また、詳細な分子メカニズムを解明するため、大腸杯細胞への分化モデル細胞であるヒト結腸がん由来HT-29細胞にsiRNAを処理し、CCL28とその受容体であるCCR3またはCCR10、あるいは関連分子についてそれぞれノックダウンした。それらの影響はMUC2の他にHES1などNotch経路や、YAPなどHippo経路のシグナル伝達経路関連分子についてウェスタンブロット解析により評価した。また、反対にCCR10の過剰発現細胞株の樹立も行った。その影響についてもMUC2およびHES1やYAPなど、代表的シグナル伝達経路関連分子についてウェスタンブロット解析などにより評価するとともに、CCR10過剰発現細胞株にYAPのsiRNAを処理したことによる影響についても同様の関連分子について解析を行った。

(2) ヒト結腸がん由来Caco-2細胞にTGF- β や塩化コバルトを処理して上皮間葉転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)を誘導し、CCR3等の発現量をウェスタンブロットや免疫染色により解析を行った。また、CCR3アンタゴニスト(SB 328437)やCCR3リガンド(CCL7)、プロテアソーム阻害剤(MG132)を用いて、細胞の増殖や生存のシグナル伝達経路として重要なPI3K/Akt/GSK-3 β 経路の関連分子の発現や、EMT誘導に作用する β -cateninの安定性、および、細胞形態や細胞機能などの変化について解析を行った。

また、大腸以外の上皮細胞における CCR3 の作用を比較する目的で、ヒト肺がん由来 A549 細胞を代表的な例として用いて同様の解析を行った。

4. 研究成果

上記の研究目的に沿って本研究課題を推進し、以下の(1)の成果が得られた。また、以下の(2)は、本研究課題の実施過程において新たな重要課題として研究の必要性が見いだされたことから解析を行った成果である。

(1) CCL28 が杯細胞の分化および粘液産生に及ぼす影響の解析

CCL28 は粘膜免疫の細胞動態制御に関わるケモカインであるが、大腸では腸管上皮細胞や、腸管粘膜固有層の微小血管内皮細胞などに発現が認められている。まず、CCL28 欠損マウスを用いて大腸粘液層の形成について、大腸組織のアルシアンブルーによる染色を行った。その結果、CCL28 欠損マウスの大腸では、野生型マウスと比較して酸性粘液が減少していることが明らかとなった(図1)。同様の結果は中性粘液を染色する PAS 染色においても確認された。また、杯細胞のマーカー分子である MUC2 の免疫組織染色による杯細胞数の解析から CCL28 欠損マウスの大腸では杯細胞の数自体が減少していることが観察された。これまでに研究代表者らは、CCL28 欠損マウスの DSS 誘導性の大腸炎モデルの解析から、CCL28 欠損マウスの大腸粘膜には野生型マウスの大腸炎モデルと比較して、浸潤してきたグラム陽性細菌の数が有意に増加することを報告している (Matsuo et al., *J Immunol.*, 2018.)。しかし、今回の解析から DSS 誘導性の大腸炎においてだけでなく、生理的条件下においても、野生型マウスと比較して CCL28 欠損マウスの大腸粘膜には、浸潤するグラム陽性細菌の数が有意に増加することが確認された(図2)。これらに加え、CCL28 欠損マウスの大腸粘膜では、さらに杯細胞の分布にも異常が確認され、CCL28 が大腸杯細胞に影響を与え、機能的な粘液産生に深く関わっている可能性が明らかになった。

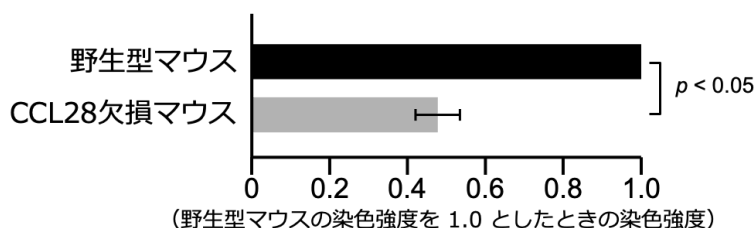


図1 アルシアンブルーの相対染色強度

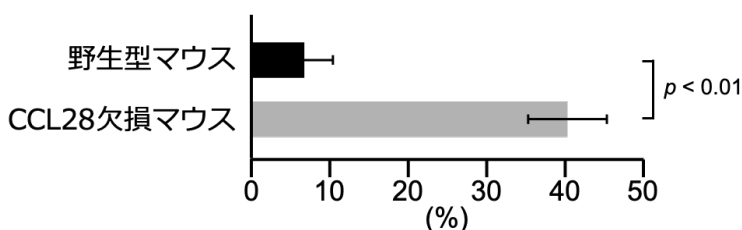


図2 グラム陽性細菌が陽性の陰窩の割合

そこで、その分子機構を詳細に明らかにするため、これまでも文献的に大腸上皮細胞の分化系モデルとして用いられているヒト結腸がん由来の HT-29 細胞を用いて、組換え CCL28 タンパク質の添加や受容体 CCR10 を過剰発現させ、杯細胞分化に関連した刺激下の細胞内シグナル分子の発現を *in vitro* で解析した。HT-29 細胞については、Notch 経路を阻害することによって杯細胞への分化が誘導されるとの結果が既に別の研究グループによって報告されている (Okamoto et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2009.)。

その結果、CCL28 は 2 つある受容体 CCR3 および CCR10 のうち、CCR10 に選択的に作用して Hippo 経路 (細胞増殖や細胞死を制御して器官の細胞数を制御する経路) の標的分子である YAP の活性化を中心としたシグナル伝達経路により杯細胞分化を促進することが明らかとなった。CCL28 が Notch 経路を介さず、独立したシグナル伝達経路を駆動させる機能性を有していることは、まったく新しい知見となった。これに加えて、予め HT-29 細胞を Notch 経路阻害により杯細胞に分化させた状態の細胞に対して CCL28 の作用を解析したところ、CCL28 は粘液産生促進にも働くことが明らかになった。これらの結果から、大腸において CCL28 は CCR10 を介した杯細胞への分化誘導作用、および杯細胞における粘液産生促進作用という 2 つの働きを持つ可能性が示唆された。

(2) CCR3 阻害が大腸上皮細胞に及ぼす影響の解析

CCL28 には CCR10 の他に、もう一つの受容体として CCR3 がある。そこで、大腸における CCR3 の関与についても別角度からの解析を行った。CCR3 は好酸球に高発現するケモカイン受容体であるが、大腸を含む上皮細胞においてはこれまでに“がん化”との関連についての報告がある。そこでまず、ヒト結腸がん由来の Caco-2 細胞を用いて大腸上皮細胞における CCR3 の“がん化・がん悪性化”への関与について上皮間葉転換 (EMT) を誘導したときの発現量変化を解析した。その結果、CCR3 の発現量は低下することが確認された。このことから、CCR3 の発現量低下が上皮細胞の EMT を誘導する可能性が示唆された。そこで、Caco-2 細胞に CCR3 のアンタゴニスト (SB 328437) を処理したところ、 β -catenin や間葉系マーカー分子の発現量が増加した (図 3)。 β -catenin の発現量増加はタンパク質としての安定化を示唆している。そして β -catenin の安定化は PI3K/Akt/GSK-3 β 経路を介して EMT を誘導することから、当該経路について解析したところ、Akt の活性化の亢進、および、それによって引き起こされる GSK-3 β の不活性化の亢進についても確認された。これらに加え、別途実施した β -catenin の分解に着目した解析からも、CCR3 の阻害が、Akt/GSK-3 β 経路を介して β -catenin の分解抑制 (安定化) に寄与することが確認された。さらに EMT 誘導時に、CCR3 のリガンドである CCL7 を添加して CCR3 を活性化したところ、 β -catenin や間葉系マーカー分子の発現量が部分的に低下したことから、CCR3 を介したシグナル制御が、がん細胞における EMT に関与することが明らかとなった。

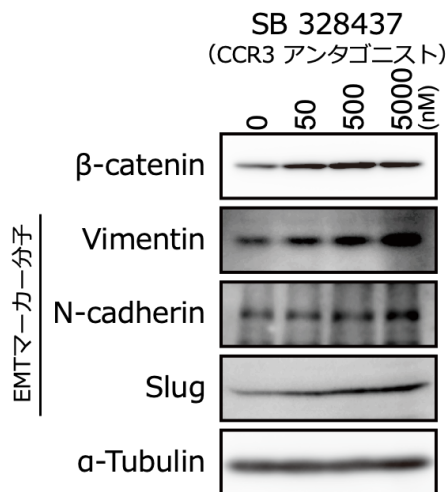


図3 CCR3 アンタゴニスト添加による β -catenin および EMTマーカー分子の発現量変化

また、CCR3 アンタゴニストの処理を行うと、運動中 (移動時) の細胞で認められる構造である葉状仮足の形成や細胞増殖の亢進、さらには倍数体巨大化細胞の形成が確認された (図 4)。そして、これらの作用は CCR3 のリガンドの添加によって、部分的に抑制された。

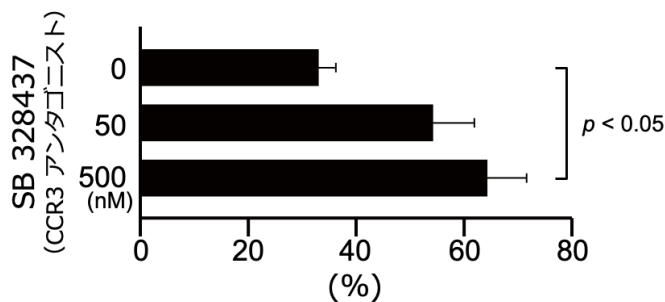


図4 巨大化した細胞の割合

上記の解析を通じて、大腸上皮細胞における CCR3 の阻害は PI3K/Akt/GSK-3 β 経路を介して β -catenin の分解を抑制し、EMT の誘導に伴う倍数体巨大化細胞の形成とともに細胞浸潤能の促進に寄与するという結果が得られた (Kaibori & Nagakubo, *Cancer Gene Ther.*, 2023)。

上皮細胞の示す EMT は、がん細胞が浸潤能や転移能を獲得し悪性化する過程で必須となるが、本解析から、CCR3 の阻害がその一因である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaibori Yuichiro, Nagakubo Daisuke	4. 巻 30
2. 論文標題 CCR3 blockage elicits polyploidization associated with the signatures of epithelial-mesenchymal transition in carcinoma cell lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 137 ~ 148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-022-00532-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaibori Yuichiro, Yamashita Kazuhiko, Nagakubo Daisuke	4. 巻 87
2. 論文標題 The altered production and property of saliva induced by ingesting fermented food ingredients affect the oral microbiome composition in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 228 ~ 235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuo Kazuhiko, Kitahata Kosuke, Kaibori Yuichiro, Arima Yuka, Iwama Arisa, Ito Mana, Hara Yuta, Nagakubo Daisuke, Quan Ying-Shu, Kamiyama Fumio, Oiso Naoki, Kawada Akira, Yoshie Osamu, Nakayama Takashi	4. 巻 141
2. 論文標題 CCR4 Involvement in the Expansion of T Helper Type 17 Cells in a Mouse Model of Psoriasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1985 ~ 1994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.12.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okano Junko, Nakae Yuki, Nakagawa Takahiko, Katagi Miwako, Terashima Tomoya, Nagakubo Daisuke, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Suzuki Yoshihisa, Kojima Hideto	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel role for bone marrow-derived cells to recover damaged keratinocytes from radiation-induced injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84818-1	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海堀 祐一郎、松尾 一彦、中山 隆志、長久保 大輔
2. 発表標題 ケモカインCCL28によるCCR10/YAP経路を介した大腸粘液産生機構の解明
3. 学会等名 第68回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海堀 祐一郎、松尾 一彦、中山 隆志、長久保 大輔
2. 発表標題 ケモカインCCL28はHippo経路を介して大腸杯細胞分化を誘導する
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海堀 祐一郎、長久保 大輔
2. 発表標題 ケモカイン受容体CCR3の阻害によるがん悪性化への影響
3. 学会等名 第67回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海堀 祐一郎、松尾 一彦、中山 隆志、長久保 大輔
2. 発表標題 大腸杯細胞への分化におけるケモカインの関与
3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海堀 祐一郎、長久保 大輔
2. 発表標題 ケモカイン受容体CCR3の阻害によるがん悪性化機構の解明
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北畑 孝祐、松尾 一彦、海堀 祐一郎、長久保 大輔、義江 修、中山 隆志
2. 発表標題 乾癬モデルマウスにおけるTh17細胞増幅に対するCCR4の寄与
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海堀 祐一郎、松尾 一彦、中山 隆志、長久保 大輔
2. 発表標題 ケモカインによる大腸粘液産生機構の解析
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海堀 祐一郎、松尾 一彦、中山 隆志、長久保 大輔
2. 発表標題 大腸粘液・唾液の産生メカニズムの解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	海堀 祐一郎 (KAIBORI Yuichiro)		

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
---------	---------