

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790653

研究課題名（和文）シグナルクロストークによる Hath1 制御とパネート細胞形質発現機構

研究課題名（英文）The regulation of Paneth cells gene expression by Hath1

研究代表者

土屋 輝一郎（TSUCHIYA KIICHIROU）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40376786

研究成果の概要（和文）：小腸絨毛の陰窩に存在する腸管上皮細胞のパネート細胞は抗菌物質を産生することで、腸管内の細菌の侵入を抑制するなどバリアー機能に重要な役割を果たしている。抗菌物質の産生不良がクローン病などの難治性腸炎の原因であることが近年注目され始めているが、その産生機構は未だ明らかでない。本研究の遂行により、抗菌物質の一つである Human Defensin 6 (HD6) が上皮細胞の分化に必須である Hath1 遺伝子と細胞増殖必須である beta-catenin 遺伝子の協調により直接制御されることを明らかとした。また小腸内視鏡の生検検体を用いた解析により、クローン病患者の空腸生検と他疾患患者の空腸検体を比較すると病理組織検査で特に異常がない部分においても Hath1 と HD6 の遺伝子発現がクローン病において低下していた。以上より Hath1 の発現低下が抗菌物質の産生低下を惹起することで、バリアー機能の低下が起こり、クローン病などの慢性持続性炎症を発症することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have indicated that Hath1 contributes to the differentiation program of Paneth cells, however it remains unknown how Hath1 regulates the Paneth cell gene expression. This study shows the mechanism of phenotypic expression for Paneth cells by Hath1 in human intestine. The present study suggests that Hath1 and beta-catenin are essential for HD6 gene expression by binding to E-box sequence in 5' promoter region of HD6 resulting in the contribution to Paneth cell phenotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学、消化器学（食道、胃、小腸、大腸）

キーワード：Atoh1, Hath1, 小腸, パネート細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮組織は、幹細胞を由来とする細胞群の秩序正しい「増殖」と「分化」の調和のもと、生涯を通じ絶えず短い細胞回転で再生を繰り返す特殊な組織機構を有する。また一方、この制御システムの破綻が、重篤な増殖・分化障害による組織再生不全、あるいは

異常増殖能獲得による癌化機構と密接に関わることは明らかである。特に炎症性腸疾患などの慢性、難治性炎症疾患においては腸管の免疫調節機構破綻による持続炎症だけでなく杯細胞減少、パネート細胞過形成など腸管上皮分化異常も病態の一因とされているが、その分子基盤は全く確立されておらず、

特に罹患患者の増大と共に難治化、重症化する患者の増大により、新規治療法の開発が急務とされている。そこで、申請者は腸管上皮細胞分化遺伝子である bHLH 型転写因子 Atoh1(マウスホモログ; Math1/ヒトホモログ; Hath1)の機能に着目し、これまで平成 17,18 年に基盤研究(C)「Math1 分子による腸管上皮杯細胞分化と免疫制御機能の解析」(研究代表者)、平成 19,20 年基盤研究(C)「Hath1 標的遺伝子の網羅的検索における腸管上皮分化調節機構解析」(研究代表者)において、転写因子 Hath1 における腸管上皮細胞分化制御機構を明らかとしてきた。

2. 研究の目的

本研究ではこれらをさらに発展させ Hath1 制御による形質発現制御をパネート細胞形質に特化し、形質発現制御による消化管バリアー機能を主眼とし、その制御破綻による難治性慢性腸炎の発症、慢性化、難治化の成因を解明することで新規治療法開発への基盤とするものである。

本来、腸管は外界と交通し、表面積がテニスコート 2 面分と非常に広大な器官であり腸管内は食餌抗原、腸内細菌などとの接触が多く、体内への侵入を防ぐための上皮細胞バリアー機能は腸管恒常性維持のために非常に重要な役割を担う。実際、炎症性腸疾患のクローン病の感受性遺伝子として NOD2 の変異が報告され、NOD2 変異によりパネート細胞からの抗菌物質産生低下を認めることから上皮細胞のバリアー機能不全が腸管内への異物侵入を許可し炎症を惹起することがクローン病の発症原因であると示唆された。つまり炎症性腸疾患発症に関する免疫制御機構の破綻は、腸管バリアー機能低下における外来抗原の腸管内侵入が発端である可能性が示唆された。しかし、パネート細胞への分化機構、形質発現機構は未だ不明であり、これらの機構解明が炎症性腸疾患におけるバリアー機能回復に有用であるだけでなく、新規治療法の標的となる可能性を持つと考えられる。

本研究ではこれらの知見をさらに発展させ、1) Hath1 制御におけるパネート細胞形質発現解析、2) パネート細胞分化シグナル伝達機構解析、3) 抗菌物質産生による消化管バリアー機能解析を中心課題に据え研究期間 2 年で遂行する予定である。

申請者の解析においてパネート細胞は Notch シグナル下流の HES1 遺伝子陽性、Wnt シグナル下流の カテニンが核内の発現しているという両シグナルが亢進し Hath1 発現抑制状態であるにもかかわらず、Hath1 タンパクが陽性となる特殊な状況であることが判明した。以上より、パネート細胞では Notch, Wnt シグナル以外のシグナルクロストークの存在が示唆され、Hath1 発現抑制から回避す

る機構による特殊な環境下での Hath1 発現が杯細胞形質ではなくパネート細胞形質発現に必要であると考えられる。特に FGF レセプターの欠損マウスではパネート細胞が欠損するという報告からも FGF シグナルがパネート細胞形質発現にも深く関わると考えられる。既に申請者はパネート形質発現機構の解析に着手し、抗菌物質である Human defensin(HD)5, 6 のレポーターコンストラクトを作成し、Hath1 発現によるプロモーター活性を確認している。またその一方で sPLA2 のレポーター解析では Notch シグナルによる活性上昇、遺伝子発現増加を認めていることから、同じパネート細胞から発現する種々の抗菌物質においてそれぞれ異なるシグナル、転写因子により制御されるという興味深い結果を得ている。さらに実際のパネート発現解析を行うにあたり、パネート細胞形質をもつヒト正常小腸上皮細胞由来細胞株(HIEC)を用いることでシグナル動揺、転写因子発現による詳細なパネート発現制御解析が可能である。つまり、本研究計画はこれまで申請者が独自に解析してきたシグナル伝達による Hath1 制御をさらに発展させることにより遂行され、HIEC 細胞を日本で保有するのは申請者のみであることから申請者にのみ可能な状況である。加えて、申請者の施設は炎症性腸疾患の基幹病院であり小腸内視鏡、大腸内視鏡による生検検体が入手可能であることから、本研究計画で得られた結果を実際の臨床情報、生検検体解析へとフィードバックすることで、新規治療の標的探索に有利な状況であると考えられる。以上、本研究は以前より腸管慢性炎症状態による腸管上皮再生障害に着目し、上皮細胞機能における局所粘膜免疫調節解析、腸管分化分子機構解析を主にヒトの検体、細胞、遺伝子を用いヒトを主眼において進めてきた申請者らにのみ遂行可能でかつ独創性の高い研究である点に加え、得られる成果により最終的には炎症性腸疾患の腸管個々の細胞種分化障害に対し腸管上皮の「細胞種ごとの機能的修復」を可能にする「細胞オーダーメイド治療」の開発だけでなく、上皮細胞の内在性の恒常性維持機能からの粘膜局所免疫統御を目指すという新たな理論基盤を創出する可能性が期待される点においても、世界的評価に耐えうる研究であると考えられる。

3. 研究の方法

平成 21 年度

(1) Hath1 制御におけるパネート細胞形質発現解析

Hath1 発現における抗菌物質プロモーター解析

パネート細胞形質である HD5, HD6, Lysozyme, sPLA2 に関してプロモーター領域を抽出し、

Luciferase ベクターに組み込み構築する。293T 細胞に Hath1 を発現させ、それぞれプロモーター活性を Luciferase にて計測する。プロモーター活性を認めた遺伝子について、プロモーター領域の長さを短縮し、活性部位を同定する。また活性部位の塩基配列のドメイン検索を行い、Hath1 結合配列である E-box 配列の有無、その他の転写因子の結合配列の有無を確認する。活性配列部位に Mutagenesis により変異をおこし、Hath1 によるプロモーター活性が減弱するか確認する。E-box 以外の配列の場合、他の予想される転写因子を発現ベクターに組み込み作成し、共発現にて活性が上昇するか確認する。

Hath1 発現抑制におけるパネート細胞発現解析

パネート細胞形質をもつヒト正常小腸上皮由来細胞株 (HIEC) において、Hath1 siRNA 処理を行い、Hath1 遺伝子抑制による HD5, HD6, Lysozyme, sPLA2 の形質抑制効果を確認する。

(2) パネート細胞分化シグナル伝達機構解析 Notch シグナルにおける形質発現解析

HIEC 細胞に Notch 細胞内ドメイン部のみをテトラサイクリン依存性に発現させ、誘導 Notch シグナル亢進系を作成する。Notch シグナル亢進状態にて Hath1 遺伝子発現および抗菌物質産生量を PCR および Western blot において解析する。さらに下流遺伝子である HES1 遺伝子についても誘導発現系を構築し、同様の形質を認めるか確認する。逆に -secretase 阻害剤を用い、Notch シグナルを抑制させ、亢進状態と比較し、相反する形質であることを確認する。また増減した形質発現に関して(1) において構築したプロモーターベクターをもちい、Hath1 と Hes1 を共発現した際のプロモーター活性を確認する。

Wnt シグナルにおけるパネート形質発現解析

種々のリコンビナント Wnt タンパクを HIEC 細胞に添加し、Wnt シグナル亢進状態を作成する。Notch シグナルと同様に形質発現解析を行う。また同様に カテニンと Hath1 を共発現し、パネート形質プロモーター活性を行う。

FGF シグナルにおけるパネート形質発現解析

種々のリコンビナント FGF タンパクを HIEC 細胞に添加し、FGF シグナルによる形質発現を同様に行う。また カテニンや HES1 などの遺伝子発現を解析し、他シグナル伝達経路とのクロストークの有無を確認する。

(3) 抗菌物質産生による消化管バリアー機能解析

慢性腸炎における抗菌物質発現解析

腸炎モデルマウス (CD45Rb high リンパ球移入モデル) を用い、パネート細胞からの抗菌物質 (sPLA2, Lysozyme, Cryptisin) の発現解析を行うとともに、大腸など異所性発現の有無を確認する。また炎症性腸疾患患者の小腸および大腸粘膜生検検体を用い、免疫染色にて抗菌物質 (HD5, HD6, Lysozyme, sPLA2) の発現解析を行い、疾患名、病変部位、重症度、治療抵抗性などの臨床情報と照合し、抗菌物質との関連性を解析する。

平成 22 年度

(1) Hath1 制御におけるパネート細胞形質発現解析

プロモーター活性の認められた抗菌物質に関して、活性ドメインをゲルシフトアッセイによるスーパーシフトの有無、ChIP アッセイを行い、直接の Hath1 結合を確認する。またその他の転写因子による活性を認めた場合も同様に ChIP アッセイを行い、さらに Hath1 との共発現によるドメイン結合強度を解析する。

(2) パネート細胞分化シグナル伝達機構解析

前年度に解析した、Notch シグナル、Wnt シグナル、FGF シグナルに関してそれぞれクロストークが存在するか、HIEC 細胞に各シグナルを同時に亢進させた状態での形質発現を解析する。また発現増加を認めた抗菌物質に関して Hath1 との関与を ChIP アッセイにより解析し、同時に Hath1 siRNA による形質発現抑制効果を解析することで Hath1 依存性を確認する。

(3) 抗菌物質産生による消化管バリアー機能解析

慢性腸炎における抗菌物質発現解析

計画 (2) で明らかとなったシグナル伝達による抗菌物質産生機序を基盤とし、シグナル動揺処理において、実際に抗菌物質が産生亢進されるか確認する。抗菌物質産生亢進するシグナル動揺系において腸炎モデルにより抑制効果を下記項目により解析する。

・臨床的評価 (体重減少、便性状、血便の有無)

・組織学的評価 (細胞浸潤部位、細胞浸潤数、組織障害度) に加えて細胞表面マーカーによる浸潤リンパ球性状解析 (T:B 細胞比率、メモリー細胞比、CD4/8 比)

Atoh1 発現におけるバリアー機能解析

前年度作成した腸管上皮細胞特異的 Hath1 発現マウスをさらに Rag 欠損マウスと交配した上で、腸炎モデル (CD45Rb high リンパ球移入モデル) を作成し、パネート形質発現におけ

る腸炎抑制効果を解析する。

4. 研究成果

(1)HD6 遺伝子発現機構解析

腸管上皮細胞の細胞株である LS174T 細胞、SW480 細胞を用いて Hath1 を強制発現させたとき、HD6 の発現を解析したところ、両方の細胞で HD6 の発現上昇を認めた。さらに siRNA にて Hath1 遺伝子発現を抑制すると、HD6 の発現は減少したことから HD6 発現は Hath1 に依存することが示唆された。

(2)HD6 プロモーター解析

HD6 の発現機構を解析するために HD6 のプロモーター部分 1000bp を抽出し、ルシフェレセンスベクターに組みこみ、Hath1 による転写活性を解析した。プロモーター内には Hath1 が結合される Ebox 配列が計 4 カ所存在し、さらに TCF4 の結合配列が 3 カ所存在した。Hath1 発現により HD6 のプロモーター活性は有意に上昇した。Ebox 配列由来の転写活性かを解析するため、4 カ所の Ebox 配列を変異させたプロモーターをそれぞれ作成したところ、Hath1 の発現にて 5 側から 3 番目の Ebox 配列変異プロモーターのみ活性の上昇を認めなかった。つまり 3 番目の Ebox 配列に Hath1 が結合し、転写を活性させることが示唆された。

さらに Human Defensin 5 (HD5) では beta-catenin/TCF4 により転写活性、遺伝子発現上昇を認める報告があることから、HD6 プロモーター領域内の TCF4 結合配列の解析を行った。3 カ所の TCF4 結合配列をそれぞれ変異させたプロモーター活性を解析したところ、興味深いことに、5 側から 3 番目の TCF 結合配列に変異のあるプロモーターは Hath1 によるプロモーター活性の上昇を認めなかった。これは Hath1 由来の活性上昇にはその近傍に TCF4 が結合していることが重要であり、Hath1 と TCF4 が協調して HD6 の遺伝子発現を制御することが示唆された。また TCF4 の転写活性は beta-catenin の結合により増強されるが、beta-catenin の阻害剤にて Hath1 発現による HD6 発現上昇は消失した。以上より、HD6 の発現には TCF4/beta-catenin/Hath1 の3者の複合体による転写活性により制御されていることが判明した。

(3)Hath1, beta-catenin 共局在機構解析

以前の解析から Hath1 は Wnt シグナルにより beta-catenin と相補的に蛋白分解を認めることから、beta-catenin と Hath1 が共局在することは難しいと考えられた。しかしヒト小腸の絨毛を免疫染色したところ、パネート細胞では beta-catenin と Hath1 が共局在することを明らかとした。beta-catenin が Wnt

シグナル以外で核に局在するかを解析したところ、FGF シグナル刺激により、beta-catenin が核に局在し、Hath1 と共在することを HIEC 細胞を用いて明らかとした。つまりパネート細胞では FGF シグナルにて beta-catenin と Hath1 が共局在し抗菌物質の産生を制御することが示唆された。

(4)小腸生検検体解析

実際のヒト小腸における抗菌物質の産生を解析した。DBE にて全小腸のマッピング生検をしたところ、同一人物の小腸部位による抗菌物質の発現は一定であった。しかし、クローン病患者においては、病変を認めない空腸粘膜の生検においてパネート細胞は正常と同じく存在するにもかかわらず、Hath1 と HD6 の発現は低下していた。以上よりクローン病では Hath1 遺伝子発現低下が抗菌物質の産生を減少し、バリア機能を低下させることが腸炎の発症の一因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

1. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M: The suppression of Hath1 gene expression directly regulated by Hes1 via Notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis.** 2011 (in press). 査読有
2. Shinohara T, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Ikuta K, Watanabe M: Upregulated IL-7 Receptor {alpha} Expression on Colitogenic Memory CD4+ T Cells May Participate in the Development and Persistence of Chronic Colitis. **J Immunol.** 2011 (in press). 査読有
3. Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Toriihara A, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe M.: Magnetic resonance enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.** 2010 (in press). 査読有
4. Iwasaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Zheng X, Kano Y, Okamoto E, Okada E, Araki A, Suzuki S, Sakamoto N, Kitagaki K, Akashi T, Eishi Y, Nakamura T, Watanabe M: Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4. **J Gastroenterol.** 2010

(in press) 査読有

5. Nishimura-Sakurai Y, Tsuchiya K, Watanabe M (他 18 名、18 番目): Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. **J Gastroenterol**. 45: 523-536, 2010. 査読有
6. Akiyama J, Tsuchiya K, Watanabe M (他 5 名、6 番目): Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 393: 662-667, 2010. 査読有
7. Karakama Y, Tsuchiya K, Watanabe M (他 10 名、10 番目): Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serin-arginine-rich protein kinase. **Antimicrob Agent Chemother**. 54(8):3179-86, 2010. 査読有
8. Mishima K, Tsuchiya K, Watanabe M (他 12 名、10 番目): Cell culture and in-vivo analyses of plaque-derived cytopathic hepatitis C virus mutants. **Virology**. 405(2):361-9, 2010. 査読有
9. Suda G, Tsuchiya K, Watanabe M (他 15 名、14 番目): IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. **Virology**. 407(1):80-90, 2010.
10. Kameyama K, Tsuchiya K, Watanabe M (他 8 名、6 番目): IL-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4+ IL-7R alpha high memory T cells in chronic colitis. **Eur J Immunol**. 40(9):2423-36, 2010. 査読有
11. Nemoto Y, Tsuchiya K, Watanabe M (他 9 名、8 番目): Long-Lived Colitogenic CD4+ Memory T Cells Residing Outside the Intestine Participate in the Perpetuation of Chronic Colitis. **J Immunol**. 183: 5059-5068, 2009. 査読有
12. Totsuka T, Tsuchiya K, Watanabe M (他 9 名、6 番目): RANK-RANKL Signaling Pathway Is Critically Involved in the Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Chronic Colitis. **J Immunol**. 182: 6079-6087, 2009. 査読有
13. Onizawa M, Tsuchiya K, Watanabe M (他 13 名、12 番目): Signaling pathway via TNF /NF B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **Am J Physiol GI & Liver**. 296:G850-G859, 2009. 査読有
14. Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M (他

4 名、2 番目): Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. **Am J Physiol GI & Liver**. 296:G23-G35, 2009. 査読有

15. Murayama M, Tsuchiya K, Watanabe M (他 6 名、3 番目): Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell specific genes in human intestinal epithelial cells. **J Gastroenterol**. 44:173-182, 2009. 査読有
16. Araki A, Tsuchiya K, Watanabe M. (他 6 名、2 番目): Single-operator double-balloon endoscopy (DBE) is as effective as dual-operator DBE. **J Gastroenterol Hepatol**. 24(5):770-5, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M: Silencing of Atoh1 gene expression by Hes1 via Notch signaling results in the goblet cell depletion of Ulcerative Colitis. 14th International Congress of Immunology. Kobe. 2010 年 9 月 25 日
2. Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M: The contribution of Atoh1/Hath1 to phenotypic gene expression for Paneth cells. DDW2010. New Orleans. 2010 年 5 月 5 日
3. Xiu Zheng, Tsuchiya K, Watanabe M: Hes1 via Notch signaling directly suppresses Atoh1/Hath1 gene transcription, resulting in the goblet cell depletion of Ulcerative Colitis. DDW2010. New Orleans. 2010 年 5 月 5 日
4. Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M: Colon carcinogenesis is divided in the undifferentiation and proliferation regulated by Atoh1 and beta-catenin on Wnt signaling, respectively. UEGW2009. London. 2009 年 11 月 23 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/grad/gast/gast.htm>
|

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 輝一郎 (TSUCHIYA KIICHIROU)
東京医科歯科大学医学部附属病院・講師
研究者番号: 40376786