

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07972

研究課題名（和文）消化管上皮幹細胞における古典的WNTシグナル伝達経路の多様性に関する研究

研究課題名（英文）Diversity of the canonical WNT signaling pathway in gastrointestinal epithelial stem cells

研究代表者

土井 知光 (Doi, Tomomitsu)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：70437218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：消化管上皮の更新には幹細胞が重要であり、WNT/ β -cateninシグナルは幹細胞の自己複製と分化制御に中心的な役割を果たす。このシグナルの異常は癌化につながる。 β -cateninがTCFと結合し、転写を制御するが、CBPまたはp300との結合がシグナルの分岐点であり、c-JUNがp300/ β -catenin複合体のゲノムへの結合を制御している。本研究では、 β -catenin/c-JUN結合が小腸の陰窩底部で特異的に見られることを発見した。また、分化誘導する化合物をスクリーニングにより複数得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

WNT/ β -cateninシグナルは多くの癌で活性化されており、その制御は癌治療の鍵となる。本研究では、CBPとp300という二つのコアクチベーターが、幹細胞の自己複製と分化の制御において異なる役割を果たしていることを示した。これにより、より効果的で副作用の少ない癌治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Stem cells are important for the renewal of the digestive tract epithelium, and WNT/ β -catenin signaling plays a central role in controlling stem cell self-renewal and differentiation. Abnormalities in this signaling lead to carcinogenesis. β -catenin binds to TCF and controls transcription, but binding to CBP or p300 is the branching point of the signal, and c-JUN controls the binding of the p300/ β -catenin complex to the genome. In this study, we discovered that β -catenin/c-JUN binding is specifically found at the base of the crypts of the small intestine. We also screened several compounds that induce differentiation in cancer cells.

研究分野：腫瘍

キーワード：幹細胞 カテニン p300 CBP タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

消化管上皮は消化に伴うストレスに曝され続けるため、頻繁に更新される必要がある。この上皮細胞の更新を担うのが組織幹細胞である。幹細胞は生涯を通して自己複製をする一方、非対称分裂によって上皮細胞を構成する多様な細胞に分化できる。幹細胞は各組織においてニッチと呼ばれる微小環境で維持されているが、腸管では陰窩底部に、胃粘膜では峽部に存在する。WNT/ β -catenin は、ニッチにおける幹細胞の自己複製と非対称分裂制御において中心的な役割をしており、その制御異常は組織の再生不全や癌化につながる。大腸癌では、80%以上で β -catenin の抑制因子 APC に変異が見られ、胃癌においても WNT/ β -catenin の活性化が見られる。そのために癌に対する治療法として、WNT/ β -catenin は魅力的な標的であるが、正常組織におけるこのシグナルの重要性が原因で成功していない。

受容体に WNT が結合すると β -catenin が核内に蓄積し、転写因子 TCF を介してゲノム上の標的配列に結合することで標的遺伝子の発現制御を行っている。WNT/ β -catenin シグナルは状況に応じて、幹細胞の未分化能維持と分化誘導に関わる相反した遺伝子群を誘導するが、その切換え機構は明らかになっていない。TCF に結合した β -catenin はさらにコアクチベーター CBP、または、その相同因子 p300 と結合することで転写誘導する。CBP と p300 は非常に相同性の高い因子で、機能重複因子であると考えられてきた。しかし、 β -catenin と CBP の結合を特異的に阻害する ICG-001 は分化誘導を、

p300 の結合を特異的に阻害する IQ-1 は幹細胞能維持に働くことから、CBP または p300 との結合は Wnt/ β -catenin シグナルの相反するシグナルの分岐点である可能性が示唆されている (Emami et al, 2004、Miyabayashi et al, 2007、Teo, 2005、図 1)。また、この β -catenin に結合している CBP と p300 のバランスは、癌細胞で著

しく CBP に偏っており、対称分裂によって癌幹細胞の数を増やしている。ICG-001 によって CBP から p300 へ結合因子を補正することで、多くの癌種において抗腫瘍効果が示されている。以上より、幹細胞の自己複製、分化、癌化は β -catenin に結合する CBP、p300 の結合のバランスによって制御されている可能性が示唆されるが、それぞれのコアクチベーターによって、異なる遺伝子の発現が制御されるメカニズムは不明であった。我々は ICG-001 を用いて、膵癌細胞株 PANC-1 において CBP と p300 による β -catenin の遺伝子選択性制御を解析したところ、p300 による β -catenin のゲノムへの結合に c-JUN が関与していることを明らかにした。

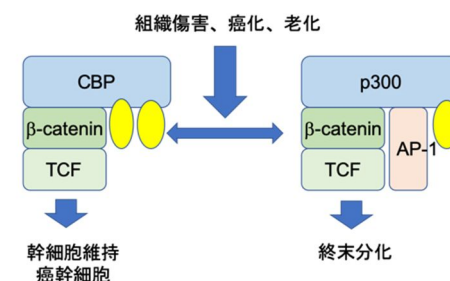


図 1 足場タンパク質として機能するコアクチベーター p300 を含む β -catenin 複合体は転写因子 AP-1 を含み、TCF と AP-1 モチーフ両方を持つ領域に結合する。一方、CBP と結合した β -catenin 複合体は TCF モチーフ単独領域に結合する。

2. 研究の目的

本研究では、消化管上皮幹細胞の WNT/ β -catenin に対する反応が、自己複製から分化に切り替わる時、及び癌化（自己複製の異常な亢進）において、 β -catenin 複合体構成因子が果たす役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

そこで幹細胞から分化細胞に至るまでの β -catenin と c-JUN との結合を、組織切片や固定した細胞内の近接したタンパク質を検出する Proximity Ligation Assay (PLA)を用いて解析した(図2)。また、Caki-1 細胞に分化誘導する化合物を分化マーカーである LTL レクチン染色を指標にスクリーニングした。

様々な幹細胞において β -catenin と結合する CBP と p300 のバランスが、自己複製及び分化に関与することが示唆されてきたが、組織内の幹細胞及び分化細胞におけるバランスは検討されていない。そこで幹細胞から分化細胞に至るまでの β -catenin と CBP、p300、及び c-JUN との結合を、組織切片や固定した細胞内の近接したタンパク質を検出する Proximity Ligation Assay (PLA)を用いて解析する(図2)。

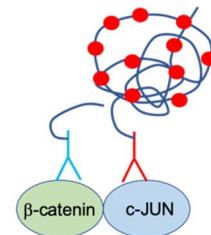


図2 β -cateninとc-JUN相互作用のPLAによる検出。タンパク質が近接していると、それぞれの抗体に連結されたオリゴDNAからDNAの合成が起こり、蛍光プローブで検出できる。

4. 研究成果

これまでの研究で、 β -catenin / p300 は c-JUN と共局在することを明らかにしている。そこで、胃、小腸、大腸粘膜上皮における β -catenin と c-JUN の結合を検討した結果、小腸陰窩底部においてのみ、 β -catenin と c-JUN の結合が検出された(図3)。 β -catenin / c-JUN シグナル陽性細胞は陰窩、最底部の数個の細胞に見られ、いわゆる静的幹細胞として注目されている+4 とは異なる領域であった。 β -catenin / p300 は幹細胞から1段階分化が進行した Transitional Amplifying (TA)細胞で機能すると考えられているため、このような細胞が検出されていると考えられた。

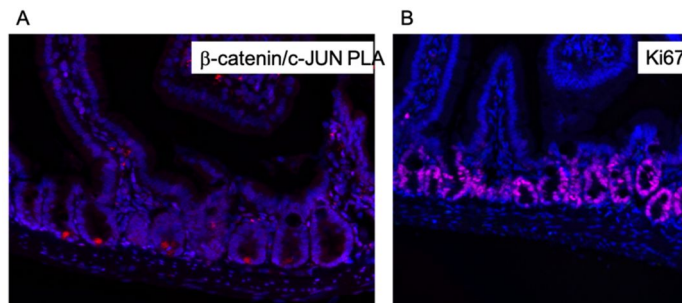


図3 A マウス小腸の β -catenin/c-JUN PLA染色。B マウス小腸のKi67染色。

当初、 β -catenin と p300 及び CBP のゲノム上での結合領域の解析に用いた膵癌細胞株 PANC-1 を用いる予定であったが、 β -catenin の誘導剤 CHIR-99021 や β -catenin と CBP の結合阻害剤 ICG-001 を作用させた時の、分化状態に変化が無く、幹細胞能と分化応答の切り替えを制御する化合物のスクリーニングには適さないことがわかった。そこで、他の細胞株を検討した結果、腎癌細胞株 Caki-1 が CHIR-99021 に応答して、近位尿細管分化マーカーである L T L レクチンの染色性を示すことを見出し、化合物のスクリーニングを実施した。その結果、Caki-1 細胞に対して分化能を示す化合物を複数得ることができた (図 4)。これらの中に β -catenin のコアクチベーターの選択制に関わる化合物が含まれることが期待される。

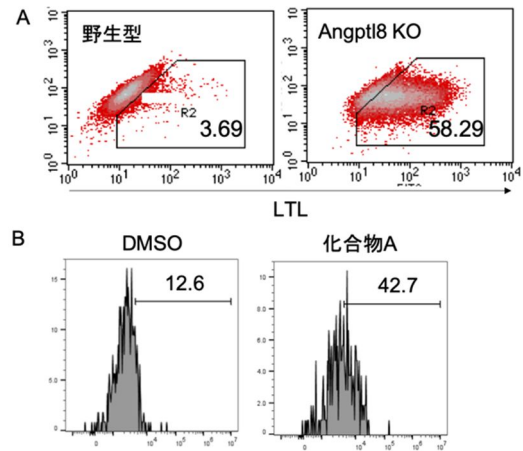


図 4 A 野生型およびAngptl8欠損Caki-1細胞のLTL染色。 B Caki-1細胞をDMSOまたは化合物Aで1週間培養後のLTL染色。LTL:Lotus Tetragonolobus Lectin (近位尿細管マーカー)

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 Takuo Matsukawa , Tomomitsu Doi , Kunie Obayashi , Kazuhiro Sumida , Naohiro Fujimoto , Motoyoshi Endo	4. 巻 114
2. 論文標題 ANGPTL8 links inflammation and poor differentiation, which are characteristics of malignant renal cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1410-1422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15700.	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 Doi T, Hojo H, Ohba S, Obayashi K, Endo M, Ishizaki T, Katoh A, Kouji H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of activator protein-1 family members in -catenin and p300 association on the genome of PANC-1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e08890	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松川卓生、土井 知光、大林 邦衣、隅田 和広、藤本 直浩、遠藤 元誉
2. 発表標題 Angiopoietin-like protein-8(ANGPTL8)は、淡明細胞型腎癌の分化に関与する。
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松川卓生、土井 知光、大林 邦衣、隅田 和広、藤本 直浩、遠藤 元誉
2. 発表標題 Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) は淡明細胞型腎癌の未分化状態の維持と腫瘍微小環境形成に関わる
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 隅田 和広、土井 知光、大林 邦衣、遠藤 元誉
2. 発表標題 肝細胞におけるCaspase4のストレス調整因子としての機能解析
3. 学会等名 第16回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉要祐, 遠藤元誉, 土井知光, 大林邦衣, 矢寺和博
2. 発表標題 The Possible Role of Inflammatory Caspase and Pyroptosis in the Pathogenesis of Respiratory Disease
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉 要祐, 土井 知光, 大林 邦衣, 松川 卓生, 隅田 和広, 加藤 香織, 遠藤 元誉, 矢寺和博
2. 発表標題 非小細胞肺癌の進展における炎症性カスパーゼの機能解明
3. 学会等名 第40回産業医科大学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Doi T, Hojo H, Ohba S, Obayashi K, Endo M, Ishizaki T, Katoh A, Kouji H.
2. 発表標題 転写因子AP-1は カテニンの補助因子CBP及びp300の選択に関与する
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大林 邦衣、土井 知光、遠藤 元誉
2. 発表標題 抗体産生細胞の分化促進におけるERストレスの関連解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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