

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590712

研究課題名（和文）エピゲノム制御による消化管の組織修復機構

研究課題名（英文）Epigenetically regulated tissue repair mechanism in gastrointestinal tract

研究代表者

河村 由紀（KAWAMURA I. YUKI）国立国際医療研究センター（研究所）・

肝炎・免疫研究センター・消化器疾患研究部・消化器病態生理研究室・室長

研究者番号：10392391

研究成果の概要（和文）：本研究では傷害を受けた消化管の組織修復を促す因子を、マウス腸炎モデルを用いて探索した。再生上皮においてムチン産生細胞の分化やムチン合成に関する遺伝子群の発現が低下していること、その DNA メチル化が亢進していることを見出した。更に潰瘍性大腸炎においてもヒトホモログの発現低下が同様に起こっていることを明らかにした。また、潰瘍性大腸炎において L-1 トランスポゾン の DNA メチル化レベルの低下と、転写および分化にかかわる遺伝子群の DNA メチル化亢進を見出し、傷害上皮の再生のための増殖促進におけるエピジェネティック機構の重要性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we searched for the factors which promoted the regeneration of damaged gastrointestinal epithelium in the murine colitis model. We found that a group of genes involving in the differentiation to mucin-producing cells and the synthesis of mucins was DNA methylated and their expression were significantly decreased in regenerative epithelial cells isolated from the inflamed colon. Decreased expression of some human homologues was also observed in the ulcerative colitis. In addition, the DNA methylation level of the L-1 retrotransposon was dramatically decreased while the DNA methylation of genes involving in the transcription and the differentiation was accelerated in ulcerative colitis. These results suggest the importance of epigenetic gene regulation for the regeneration of the injured epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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）、糖鎖、エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

消化管の慢性炎症では、傷害を受けた粘膜修復のために、急速な上皮細胞分裂と機

能細胞への分化が起きている。申請者らはこれまでに、潰瘍性大腸炎の再生上皮は発現する糖鎖が正常状態とは異なること、そ

の主たる要因として正常型糖鎖の合成に関与する複数の遺伝子がDNAメチル化亢進により発現抑制されていることを見出した。この事実は、腸管粘膜治癒過程におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の重要性を示唆している。すなわち、傷害を受けた再生上皮の分裂促進およびその後の分化誘導に重要な因子はエピジェネティックな発現制御を受けおり、その機構の破綻が炎症性腸疾患の病因・病態形成にも寄与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

傷害を受けた消化管再生上皮の分裂促進およびその後の分化誘導の鍵となる因子を同定し、その機能を明らかにする。また、同定した因子の発現制御におけるエピジェネティック機構の意義を解明することで、傷害粘膜の効率的な治癒法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウスにデキストラン硫酸ナトリウムを投与して誘導する腸炎モデルを用い、再生上皮細胞を分離・回収する。トランスクリプトーム解析およびメチローム解析を施行し、炎症治癒過程の上皮細胞でエピジェネティックな発現制御を受ける遺伝子の網羅的探索を行う。

(2) 腸炎モデルに DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine を投与することで、(1)で見出した傷害上皮の再生への関与が予想される候補遺伝子の機能的意義について検討する。DNA メチル化についてはメチル化特異的 PCR (MSP) 法により確認する。

(3) (1)で見出した傷害上皮の再生への関与が予想される遺伝子のヒトホモログについて、正常大腸粘膜、潰瘍性大腸炎組織に置ける発現パターンを定量 RT-PCR 法により、DNAメチル化についてはpyrosequence法により評価し、マウスモデルと比較する。

(4) 候補遺伝子の発現を抑制することで、再生上皮を誘導可能か否か、*in vitro*培養系を用いて検証する。

4. 研究成果

(1) マウス大腸炎モデルより分離・精製した炎症治癒過程の上皮細胞を用いたマイクロアレイ解析、DNAメチル化アレイ解析より、エピジェネティックな発現制御を受ける遺伝子候補として MUC2 ムチン遺伝子、ムチン型糖鎖合成に関与する複数の糖転移酵素遺

伝子、ムチン産生細胞への分化に関与する複数の転写因子等を見出した。

(2) マウス大腸炎モデルに DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine を投与した結果、投与群における体重減少、TNF α 等の炎症性サイトカインの発現亢進と、上皮再生の障害が認められた。DNA メチル化阻害剤投与群からも上皮細胞を分離・精製し、マイクロアレイ解析を施行した。その結果、炎症時に見られた MUC2 ムチン遺伝子およびムチン型糖鎖合成遺伝子群の発現抑制は、DNA メチル化阻害剤投与により解除された。また、MSP法により複数のムチン型糖鎖合成遺伝子が炎症治癒過程の上皮細胞においてメチル化されていることが確認された。MUC2 ムチン遺伝子はそのプロモーター領域に DNA メチル化され発現調節を受ける CpG アイランド領域を有しておらず、メチル化標的配列 CpG も密集していないため bisulfite sequence 解析を行ったが、調べた範囲において障害再生上皮特異的 DNA メチル化は見出せなかった。一方で、ムチン産生細胞への分化に関与する転写因子遺伝子の DNA メチル化は認められたことから、エピジェネティック機構を介したムチン産生細胞への分化障害が、結果として障害上皮の再生促進に寄与している可能性が示唆された。

(3) マウス大腸炎モデルの網羅的解析により見出された傷害上皮の再生への関与が予想される候補遺伝子のうち、ヒトホモログが明らかとなっているものについて、その発現を正常大腸粘膜と潰瘍性大腸炎組織を用いて比較検討した。その結果、レトロトランスポゾン抑制に関与する遺伝子と、ホメオボックス遺伝子については、マウスと同様に正常組織と比べて炎症粘膜において発現の低下が認められた。更に、潰瘍性大腸炎手術標本より分離した上皮細胞において、Long interspersed nuclear element, L-1 トランスポゾンの低メチルが起きていることが pyrosequence 法より明らかとなり、実際のヒト疾患においてエピジェネティック機構の破綻が起きていることが明らかとなった。

(4) 傷害上皮再生における DNA メチル化の機能的意義を明らかにするため、潰瘍性大腸炎手術標本より分離した上皮細胞を DNA メチル化阻害剤存在下でゲル培養を行った。正常粘膜より分離した上皮細胞では増殖が認められない条件下でも、潰瘍性大腸炎由来上皮細胞には増殖が見られたが、この細胞増殖は DNA メチル化阻害剤処理により著しく抑制された。再生上皮の増殖亢進に関与する DNA メチル化標的遺伝子を次世代シーケンサ

一を用いて網羅的に解析し、見出した潰瘍性大腸炎由来上皮細胞特異的にDNAメチル化を受ける遺伝子についてオントロジー解析を行った。正常上皮でのみメチル化されている遺伝子には有意に濃縮されているGOは見つからなかったが、再生上皮でDNAメチル化亢進する遺伝子は転写および分化にかかわるものが多く、傷害上皮再生のための増殖促進におけるエピジェネティックな分化抑制機構の重要性が示唆された。

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7件)

- ① Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura YI, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, Dohi T, Kannagi R, Colonic epithelial cells express specific ligands for macrophage immunosuppressive receptors Siglec-7 and -9, *J Immunol*, 査読有, 188(9), 2012, 4690-4700
- ② Tsubokawa D, Goso Y, Kawashima R, Ota H, Nakamura T, Nakamura K, Sato N, Kurihara M, Dohi T, Kawamura YI, Ichikawa T, Ishihara K, The monoclonal antibody HCM31 specifically recognizes the Sd^a tetrasaccharide in goblet cell mucin, *FEBS Open Bio*, 査読有, 2, 2012, 223-233
- ③ Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Mizutani N, Okada T, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T, Comprehensive analysis of chemokines and cytokines secreted in the peritoneal cavity during laparotomy, *J Immunoassay Immunochem*, 査読有, 33(3), 2012, 291-301
- ④ Kawamura YI, Dohi T, Incomplete synthesis of carbohydrate determinants in ulcerative colitis, *J Nihon Rinsho*, 査読無, 70(1), 2012, 646-650
- ⑤ Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Eu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T, Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice - A pathway associated with ulcerative colitis, *Gastroenterology*, 査読有, 141(6), 2011, 2119-2129
- ⑥ Takahashi D, Hase K, Kimura S, Nakatsu F, Ohmae M, Mandai Y, Sato T, Date Y, Ebisawa M, Kato T, Obata Y, Kawamura YI, Dohi T, Katsuno T, Yokosuka O, Waguri S, Ohno H, The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B secures gut immune homeostasis in mice, *Gastroenterology*, 査読有, 141(2), 2011, 621-632
- ⑦ 河村由紀, 炎症-発癌と糖鎖不全現象, 大腸癌フロンティア, 査読無, 3(3), 2010, 214-218

[学会発表] (計11件)

- ① Kawamura YI, Otsubo T, Oshima K, Endo TA, Toyoda T, Hagiwara T, Kawamura YJ, Konishi F, Yano H, Saito Y, Hattori M, Dohi T, Genome-wide epigenomic analysis of lamina propria mononuclear cells isolated from patients with inflammatory bowel disease, 日米消化器病学会議, 東京, 2012, 口演
- ② Sakurai T, Kawamura YI, Hagiwara T, Otsubo T, Hirano Maeyashiki C, Kojima Y, Gotoda T, Yano H, Saito Y, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T, DNA hypermethylation of the Sd^a carbohydrate synthase gene as a possible biomarker for the prognosis of ulcerative colitis, 米国消化器病週間, サンディエゴ, 2012, 口演
- ③ Otsubo T, Kawamura YI, Oshima K, Endo TA, Toyoda T, Hagiwara T, Kawamura YJ, Konishi F, Yano H, Saito Y, Hattori M, Dohi T, Genome-wide epigenomic analysis of lamina propria mononuclear cells of inflammatory bowel disease, 米国消化器病週間, サンディエゴ, 2012, 示説
- ④ 大坪武史, 遠藤高帆, 豊田哲郎, 大島健志朗, 萩原輝記, 河村裕, 小西文雄, 矢野秀朗, 斉藤幸夫, 服部正平, 稲垣匡子, 河村由紀, 土肥多恵子, Epigenomic analysis for small cell numbers of lamina propria T cells and macrophage/dendritic cell fraction in ulcerative colitis, 日本生化学会, 福岡, 2012, 示説
- ⑤ Kawamura YI, Toyota M, Hagiwara T, Suzuki H, Yamazaki M, Okada T, Kawamura YJ, Konishi F, Yano H, Saito Y, Dohi T, IL-6, a potential inducer of DNA hypermethylation and malignant-type glycosylation in ulcerative colitis, 米国消化器病週間, シカゴ, 2011, 示説
- ⑥ Yamazaki M, Kawamura YI, Okada T, Dohi T, Establishment of a long term culture of self-replicating colon epithelial cells derived from a mouse model of inflammation-related tumor, 米国消化

- 器病週間、シカゴ、2011、示説
- ⑦ 河村由紀、豊田実、橋本真一、萩原輝記、山崎元美、河村裕、小西文雄、斉藤幸夫、服部正平、土肥多恵子、消化管でみられる癌性糖鎖不全とエピゲノム異常 ワークショップ 2 癌の epigenetics と microRNA、日本病態治療研究会、東京、2011、招待講演
- ⑧ Kawamura YI、Toyota M、Kawashima R、Okada T、Hagiwara T、Kawamura YJ、Konishi F、Matsumoto T、Dohi T、IL-6 induces expression of DNA methyltransferases, gene silencing, and malignant-type glycosylation in ulcerative colitis and colitic cancer、米国消化器病週間、ニューオリンズ、2010、示説
- ⑨ 河村由紀、豊田実、川島麗、萩原輝記、河村裕、小西文雄、斉藤幸夫、松本誉之、神奈木玲児、今井浩三、土肥多恵子、IL-6 誘導性DNA高メチル化がもたらす潰瘍性大腸炎およびcolitic cancerの糖鎖異常、日本生化学会、神戸、2010、口演
- ⑩ 河村由紀、秋山純一、土肥多恵子、バレット食道癌における粘液形質異常 ワークショップ 22 Barrett食道のサーベイランス・治療を巡って、日本消化器病学会、横浜、2010、口演
- ⑪ 河村由紀、豊田実、Vongsavanh Phongsisay、岡田俊彦、山崎元美、河村裕、小西文雄、斉藤幸夫、鈴木拓、神奈木玲児、松本誉之、今井浩三、土肥多恵子、IL-6 はDNAメチル基転移酵素の異所性発現を介して潰瘍性大腸炎における糖鎖異常を誘導する、日本癌学会、大阪、2010、口演

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 由紀 (KAWAMURA I. YUKI)
 国立国際医療研究センター (研究所)・肝炎・免疫研究センター・消化器疾患研究部・消化器病態生理研究室・室長
 研究者番号：10392391

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

豊田 実 (TOYOTA MINORU)
 札幌医科大学・医学部・教授
 研究者番号：70270676