

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590929

研究課題名(和文) Reg 蛋白の消化管粘膜保護作用に関する研究

研究課題名(英文) Protective role of Reg protein on mucosal injury in the gastrointestinal tract

研究代表者

福井 広一 (Fukui, Hirokazu)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60378742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：Reg 蛋白は抗菌ペプチドとして機能する可能性があり、その発現には IL-22 が中心的な役割を果たすと考えられた。加えて、Reg 蛋白は消化管粘膜上皮細胞のみならず血管内皮細胞に対して細胞増殖作用および抗アポトーシス作用を有することが示された。これらの作用は消化管粘膜保護に有用であるが、Reg 蛋白発現の制御機構が破綻した癌組織では、Reg 蛋白の抗アポトーシス作用が胃癌細胞の抗癌剤耐性獲得に繋がる可能性もあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reg protein may function as an antimicrobial peptide and its expression is significantly regulated by IL-22 stimulation. Furthermore, Reg protein functions a trophic and/or anti-apoptotic factor on not only epithelial but also endothelial cells in the gastrointestinal mucosa. These effects are advantageous to protect the gastrointestinal mucosal injury. However, in gastric cancer tissues the anti-apoptotic effect of dysregulated Reg protein may confer resistance to chemotherapeutic drugs in gastric cancer cells.

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：遺伝子 再生医学 臨床 感染 癌

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、Reg 蛋白が消化管粘膜の再生過程で強発現すること、さらには消化管の炎症性疾患の病態形成に役割を果たすことを明らかにしてきた。加えて我々は、Reg 蛋白が消化管粘膜上皮細胞に対し細胞増殖作用と抗アポトーシス作用を示すことを報告したが、Reg 蛋白の分子機能については未だ詳細は明らかでない。他方で近年、興味深いことに、Reg 蛋白に抗菌ペプチドとしての作用がある可能性が示唆され始めている。これらの事実より、Reg 蛋白が消化管粘膜の保護に役割を果たしている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

- (1) IL-22 による 抗菌ペプチドおよび抗菌ペプチド候補 Reg 蛋白の発現機序を明らかにすること。
- (2) Reg 蛋白の発現異常が胃癌進展に及ぼす影響を検討し、Reg 蛋白発現異常が臨床病理学的に有用なマーカーに成り得るかを明らかにすること。
- (3) 薬剤起因性消化管粘膜傷害における Reg ファミリー蛋白の粘膜上皮細胞および間質細胞に対する作用を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

- (1) IL-22 による 抗菌ペプチドおよび抗菌ペプチド候補 Reg 蛋白の発現機序

大腸癌細胞株を用い、IL-22 による刺激実験を行った。その際に生じる遺伝子発現変化のプロファイルをマイクロアレイ解析によって検討した。

胃・大腸癌細胞株を IL-22 で刺激した時の細胞内シグナル伝達経路の活性化を Western 法で確認し、それぞれの経路を

siRNA または特異的な阻害剤で遮断する阻害実験を行った。

Reg 蛋白の抗菌ペプチド作用を検討するために、*H. pylori* にリコンビナント Reg 蛋白を投与してその効果を検証した。

- (2) 胃癌組織における Reg 異常発現とその臨床病理学的意義

化学療法を受ける胃癌患者を対象に、胃癌組織における Reg 発現と臨床病理学的因子の関連および化学療法奏功性との関連を検討した。

Reg 遺伝子を過剰発現させた胃癌細胞を樹立し、抗癌剤に対する反応性を検討した。

- (3) 薬剤起因性消化管粘膜傷害における Reg 蛋白の役割

ICR マウスにインドメサシンを皮下投与し、薬剤起因性消化管粘膜傷害モデルを作成した。経時的に胃・小腸・大腸組織を摘出して Reg ファミリー遺伝子の発現変化と病理組織学的因子の評価を行い、それらの関連を解析した。

Reg 蛋白の血管内皮細胞に対する作用を検討するため、血管内皮細胞における Reg 受容体の発現を確認した。その上で、リコンビナント Reg 蛋白を用いて HUVEC 細胞を刺激し、細胞増殖作用と抗アポトーシス作用を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) IL-22 による 抗菌ペプチドおよび抗菌ペプチド候補 Reg 蛋白の発現機序

大腸癌細胞株 SW403 細胞を IL-22 で刺激して遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析した結果、強発現する遺伝子として

Reg, DMBT1, Linpocalin 2 といった抗菌ペプチド候補分子が共通して同定された。このことから、IL-22 は抗菌ペプチドの発現に関して中心的な役割を果たす可能性が示唆された。

胃癌細胞株 AGS 細胞および大腸癌細胞株 SW403 細胞を IL-22 で刺激したところ、STAT3 および ERK のリン酸化が促進された。他方、IL-22 刺激で亢進したこれらの細胞内シグナル伝達経路を STAT3 siRNA および MEK 阻害剤で遮断すると、IL-22 の標的分子である Reg と DMBT1 の発現は抑制された。

*H. pylori* にリコンビナント Reg 蛋白を投与したところ、*H. pylori* と Reg 蛋白が結合することが免疫沈降法で確認された。

## (2) 胃癌組織における Reg 異常発現とその臨床病理学的意義

Stage IV で化学療法を受けた胃癌患者の約 30% において、Reg 蛋白の発現異常が認められた。Reg 陽性胃癌患者は陰性患者に比べ有意に化学療法の効果が乏しく、無増悪生存期間および全生存期間も有意に短かった。これらのことから、Reg 蛋白の発現異常が抗癌剤耐性のマーカーになる可能性が示唆された。

Reg 遺伝子を過剰発現させた AGS 胃癌細胞に抗癌剤 5-FU または CDDP を投与し、細胞死とアポトーシス反応を FACS 法で評価したところ、Reg 発現胃癌細胞群で有意に細胞死およびアポトーシスが抑制された。これは上記の臨床データを支持する所見と考えられた。

## (3) 薬剤起因性消化管粘膜傷害における Reg 蛋白の役割

Reg 蛋白は type I から type IV までフ

ミリーを形成しているが、消化管において Reg I は胃から空腸、Reg III は小腸、Reg IV は回腸から大腸と発現分布が異なることを見出した。インドメサシンによる消化管粘膜傷害は主に胃から小腸にかけて生じるが、この粘膜傷害を抑制するには Reg ファミリーの中で Reg I が重要であると推測された。

インドメサシンによる消化管傷害では、組織内の血管内皮細胞にも大きな傷害が生じていた。他方、血管内皮細胞には Reg 受容体が発現していること、さらには、Reg 蛋白が血管内皮細胞 HUVEC に対し、細胞増殖作用と抗アポトーシス作用を有することが *in vitro* 実験で明らかとなった。これらのことより、Reg 蛋白は消化管粘膜上皮細胞のみならず、血管内皮細胞の増殖や生存にも役割を果たす可能性が示唆された。

## 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 10 件)

Sekikawa A, Fukui H, Zhang X, Maruo T, Tsumura T, Okabe Y, Wakasa T, Osaki Y, Chiba T, Tomita T, Oshima T, Watari J, Miwa H. REG I $\alpha$  is a biomarker for predicting response to chemotherapy with S-1 plus cisplatin in patients with unresectable stage IV gastric cancer. Br J Cancer 2013; 108: 395-401. (査読有)

Shan J, Oshima T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Acidic deoxycholic acid and chenodeoxycholic acid induce IL-8 production through p38 MAPK and PKA in a squamous epithelial model. J Gastroenterol Hepatol 2013; 28: 823-828. (査読有)

Oshima T, Shan J, Okugawa T, Chen X, Hori

K, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Down-regulation of claudin-18 is associated with the proliferative and invasive potential of gastric cancer at the invasive front. PLoS One 2013; 8: e74754. (査読有)

Okamoto K, Fujimori T, Yamaguchi T, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Ohkura Y, Yao T, Fujii S, Kusaka T, Sekikawa A, Fukui H, Chiba T, Kato H, Mitomi H. Overexpression of regenerating gene I $\alpha$  appears to reflect aberration of crypt cell compartmentalization in sessile serrated adenoma/polyps of the colon. Diagn Pathol 2013; 8: 187. (査読有)

Fujishiro M, Nozawa K, Kawasaki M, Yamaguchi A, Iwabuchi K, Yanagida M, Suzuki F, Miyazawa K, Fukui H, Kaneko K, Ogawa H, Takamori K, Takasaki Y, Sekigawa I. Regenerating gene (REG) 1 alpha promotes pannus progression in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 2012; 22: 228-237. (査読有)

Okugawa T, Oshima T, Chen X, Hori K, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. Down-regulation of claudin-3 is associated with proliferative potential in early gastric cancers. Dig Dis Sci 2012; 57: 1562-1567. (査読有)

Chen X, Oshima T, Shan J, Fukui H, Watari J, Miwa H. Bile salts disrupt human esophageal squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins. Am J Physiol 2012; 303: G199-G208. (査読有)

Shan J, Oshima T, Chen X, Fukui H, Watari J, Miwa H. Trypsin impaired epithelial barrier function and induced IL-8 secretion through basolateral PAR-2: a lesson from a stratified squamous epithelial model. Am J Physiol 2012; 303: G1105-G1112. (査読有)

Fukui H, Sekikawa A, Tanaka H, Fujimori Y, Katake Y, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S,

Imura J, Chiba T, Fujimori T. *DMBT1* is a novel gene induced by IL-22 in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2011; 17: 1177-1188. (査読有)

Chen X, Oshima T, Tomita T, Fukui H, Watari J, Matsumoto T, Miwa H. Acidic bile salts modulate the squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins. Am J Physiol 2011; 301: G203-G209. (査読有)

[学会発表](計 11 件)

福井 広一. 胃炎—胃癌相関における STAT3 シグナル活性の意義について . 第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 24 日 東京

福井 広一. NSAID 起因性消化管粘膜傷害における *Reg* 遺伝子の発現意義について . 第 41 回日本潰瘍学会 2013 年 12 月 7 日 吹田市

Sun C, Fukui H. Expression of *Reg* family genes in the gastrointestinal tract injured by indomethacin. The Asian Pacific Digestive Week/World Congress of Gastroenterology. Sep 23, 2013. Shanghai, China.

Fukui H. GRO $\alpha$  promotes invasion of gastric cancer cells. Digestive Disease Week 2013. May 18, 2013. Orland, USA.

Fukui H. REG I $\alpha$  plays a role in resistance to chemotherapy in gastric cancer. United European Gastroenterology Week. Oct 23, 2012. Amsterdam, Netherland.

福井 広一. 腸上皮化生と胃癌組織における REG 蛋白発現の意義について . 第 54 回日本消化器病学会大会 2012 年 10 月 11 日 神戸

Fukui H. Involvement of IL-22 signaling in gastric cancer cell invasion. Digestive Disease Week 2012. May 20, 2012. San

Diego, USA.

福井広一. 胃癌細胞の浸潤におけるインターロイキン 22 の役割について. 第 98 回日本消化器病学会総会 2012 年 4 月 20 日 東京

福井広一. 胃炎発癌における STAT3/REG シグナルの役割. 第 53 回日本消化器病学会大会 2011 年 10 月 21 日 福岡

Fukui H. Involvement of IL-22/STAT3 signaling in the expression of antimicrobial molecules in gastrointestinal epithelial cells. Digestive Disease Week 2011. May 15, 2011. Chicago, USA.

福井広一. 胃癌治療における REG 蛋白の標的分子としての可能性について. 第 97 回日本消化器病学会総会 2011 年 5 月 15 日 東京

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福井 広一 (FUKUI, HIROKAZU)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 60378742

### (2) 研究分担者

三輪 洋人 (MIWA, HIROTO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 80190833

渡 二郎 (WATARI, JIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 10311531

大島 忠之 (OSHIMA, TADAYUKI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 00381814

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :