

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590932

研究課題名(和文)炎症性腸疾患感受性遺伝子NKX2.3が関与するdisease pathway

研究課題名(英文)To determine a disease pathway related with NKX2.3 in inflammatory bowel disease

研究代表者

木内 喜孝(KINOUCHI, Yoshitaka)

東北大学・高等教育開発推進センター・教授

研究者番号：20250780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：NKX2.3は血管内皮細胞に高発現する転写因子で、炎症性腸疾患の感受性遺伝子と考えられている。NKX2.3が血管内皮細胞でどのようにして疾患感受性を高めるかを解明するために、血管内皮細胞における転写因子NKX2.3のターゲット遺伝子群を同定し、NKX2.3が疾患感受性に影響を与えるdisease pathwayを推測した。NKX2.3遺伝子導入後の発現解析とChIP on Chip両方法で同定された遺伝子は34個(MAdCAM-1を含む)あり、GO解析ではinflammatory response, cell proliferationに關与する遺伝子群が同定されてきた。

研究成果の概要(英文)：NKX2.3 is expressed in endothelial cells and is considered to be one of the candidate susceptibility genes to inflammatory bowel diseases. In this study, to investigate how NKX2.3 influences disease susceptibilities to inflammatory bowel diseases, we determined the genes regulated by NKX2.3 in endothelial cells using expression analysis and ChIP on Chip. A total of 34 genes including MAdCAM-1 were determined in these analyses. Enriched GO terms were revealed to be inflammatory response and cell proliferation using DAVID. To determine the binding site in the promoter region of the MAdCAM-1, the promoter assay using pGL4 plasmid and electrophoretic mobility shift assay were performed. But we have not found the binding site in the promoter region of the MAdCAM-1.

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：炎症性腸疾患 NKX2.3 クロウン病 潰瘍性大腸炎 感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性腸疾患は(クローン病と潰瘍性大腸炎の総称)原因不明の慢性腸炎で、日本でも発症が激増しており、病因解明が待たれている。また炎症性腸疾患は、疫学調査より発症に遺伝的要因が強く関与する多因子疾患とされ、遺伝因子を特定するため、genome wide association study (GWAS) が精力的にこの7年間行われ、本申請者からの報告(Nat Genet, 2009. 41:1325-1329)を含め既に10編以上の論文がある。その結果、現在ゲノムの約163ヶ所に有意に炎症性腸疾患と関連する領域が同定されている。その中でもNKX2.3 遺伝子領域の Tag SNP (rs10883365) は、人種を超えて炎症性腸疾患との相関が確認されたため、NKX2.3 が有力な炎症性腸疾患の感受性遺伝子候補と考えられている。なお日本人炎症性腸疾患と rs10883365 が関連することも、既に本申請者も含め複数の研究で確認されている。

(2) GWAS の次は機能解析: GWAS は統計学的に感受性遺伝子の存在する広範な領域を示すだけであり、その領域内で感受性遺伝子を確定するためには、相関を認めた Tag SNP (rs10883365) が代表する領域内に存在する遺伝子が、どのようにして炎症性腸疾患の感受性を亢進させるかという disease pathway を明らかにしなければならない。幸いにも、Tag SNP (rs10883365) が代表する領域内には、現在のところ遺伝子はNKX2.3 しか存在していない。しかし、NKX2.3 の機能解析は炎症性腸疾患分野においても世界的にまったく研究がなされていない。

(3) NKX2.3 リスク対立遺伝子は腸管血管内皮に高発現: 本申請者は、先行研究において以下のことを明らかにしている。NKX2.3 m-RNA/蛋白は炎症性腸疾患の炎症腸管粘膜局所で高発現し、非炎症腸管粘膜局所で発現が低いこと、腸管粘膜の特に血管内皮細胞に強い発現を認めること、NKX2.3 リスク対立遺伝子は、NKX2.3 の血管内皮細胞での発現を亢進させること。以上の事実より、感受性候補遺伝子NKX2.3 は、腸管血管内皮細胞に高発現することで、炎症性腸疾患の発症に関与することが推察される。しかし、なぜ血管内皮細胞にNKX2.3 が高発現すると炎症性腸疾患を発症しやすくなるか、そのメカニズム(disease pathway) に関しては不明のままである。

(4) NKX2.3 タンパクは機能不明の転写因子: NKX2.3 は、homeodomain を有する転写因子である。マウスでの検討では脾臓と消化管(上皮細胞以外)に発現を認め、NKX2.3 ノックアウトマウス(生後数日で死亡)の解析では、脾臓・小腸におけるリンパ球の減少、リンパ球分布異常(特にパイエル板の形成不全)が指摘されている。しかしそれ以上の解

析はなされておらず、転写因子としてのターゲット遺伝子についての解析も未だ行われていない。またヒトにおける機能についてもまったく解析されておらず、不明のままである。

(5) MAdCAM-1 は転写因子NKX2.3 のターゲット遺伝子のひとつ?: 既存の報告で唯一NKX2.3 の機能が推測される事実として、NKX2.3 ノックアウトマウスでは、消化管血管内皮細胞のMAdCAM-1の発現が消失していることである。MAdCAM-1 はリンパ球が発現する接着因子 4 7integrin と結合し、リンパ球の腸管へのホーミングに関わることから、NKX2.3 がリンパ球のホーミングに関与する遺伝子発現の調節をしているのではないかと予想されている。またMAdCAM-1 を含む腸管血管内皮に発現する接着因子関連分子は、炎症性腸疾患の治療標的の一つと考えられており、4 インテグリン阻害薬であるナタリズマブのクローン病に対する効果が確認されていると同時に、複数のインテグリン阻害薬が治験実施中である。以上のことから、MAdCAM-1 が本当に転写因子NKX2.3のターゲット遺伝子であるかどうかの検討は必須と考えられる。

(6) 転写因子NKX2.3のターゲット遺伝子の網羅的解析・同定: 当然転写因子NKX2.3のターゲット遺伝子がMAdCAM-1だけということは考えにくい。他のターゲット遺伝子についても、網羅的に解析する必要があるが、現在その検討は行われていない。ターゲット遺伝子を絞り込む手段として、種々の方法が存在するが、既にNKX2.3 リスク対立遺伝子が血管内皮細胞に高発現していることが明らかになっていることから、ヒト血管内皮細胞由来培養細胞に、NKX2.3 遺伝子を強制発現させる系を用いて、発現解析 microarray と ChIP (chromatin immunoprecipitation) on chip にて有力なターゲット遺伝子候補を絞ることが必要である。

2. 研究の目的

以下の点について明らかにする。1) 血管内皮細胞にNKX2.3を導入発現させ、転写因子NKX2.3が有意に発現を制御している遺伝子群を発現解析アレイにて同定する、2) ChIP (chromatin immunoprecipitation) on chip 法とNKX2.3を強制発現させた血管内皮細胞を用いて、プロモーター領域にNKX2.3が結合している遺伝子群を同定する。3) 前述の検討から転写因子NKX2.3のターゲット遺伝子候補を絞り込む。4) MAdCAM-1 遺伝子について、プロモーターアッセイ(deletion assay, mutagenesis)、electrophoretic mobility shift assay (EMSA)を行い、転写因子NKX2.3のターゲット遺伝子であることを確定する。以上の研究により、NKX2.3

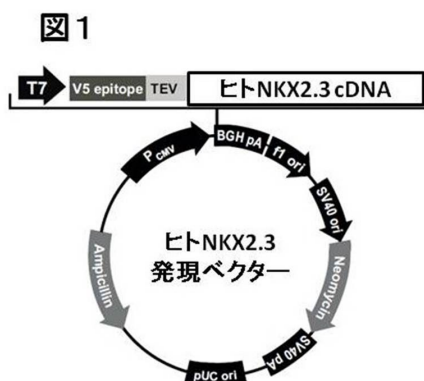
が疾患感受性に影響を与える可能性のある disease pathway を明らかにしたい。

3. 研究の方法

1) NKX2.3 遺伝子導入により制御を受ける遺伝子の同定

NKX2.3 発現ベクター作成

ヒト NKX2.3cDNA を哺乳類発現ベクターに挿入し、ヒト NKX2.3 発現ベクターを作成した。作成方法は Invitrogen 社の Gateway システムを用いた。エントリークローンとしてヒト NKX2.3 cDNA クローン (cone ID: 10H10855, Invitrogen) を、DEST ベクターとして pcDNA3.1 /nV5-DEST vector (Invitrogen) を用いて、作成した (図 1)。サブクローニング後、GeneElute エンド



トキシフリープラスミドミディプレップキット (Sigma-Aldrich) にて精製した。

遺伝子導入

導入する細胞は HUVEC を不死化した HUVEC CRL-1730 を用いた。この細胞は事前の検討で NKX2.3 発現を認めていない。遺伝子導入はトランスフェクション用試薬 Lipofectin Reagent (Invitrogen) を用いた。導入効率は pcDNA3.1/nV5-DEST vector に LacZ 遺伝子を挿入したものを用いて確認した。また Mock として、遺伝子挿入なしの pcDNA3.1 を使用した。遺伝子導入後の 12 時間後、24 時間後の発現を解析した。

発現解析用マイクロアレイ

μ MACSTM mRNA Isolation Kits を用いて mRNA を抽出精製後、Cyanine5、Cyanine3 で標識 RNA を作成し、Agilent の Whole Human Genome アレイを用いて two color 解析を行った。標識、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャン、数値化、標準化、解析に関しては Agilent のマニュアルに準拠して行った。なお realtime PCR にてアレイの結果が正しいことを確認した。

2) ChIP (chromatin immunoprecipitation) on Chip にてプロモーター領域に NKX2.3 が結合する遺伝子を同定

Chromatin immunoprecipitation

ChIP (chromatin immunoprecipitation) のクロスリンク、細胞溶解、クロマチンの断片化、抗体による免疫沈降、DNA 精製の各ス

テップは、クロマチン免疫沈降キット (NIPPON GENE) を用いて行い、詳細な条件はマニュアルに準拠した。使用する細胞は、発現解析と同じく NKX2.3 発現ベクターを遺伝子導入し、24 時間培養後の HUVEC CRL-1730 を用いた。抗体として抗 NKX2.3 抗体 sc-83438 (Santa Cruz) を用いた。

プロモーターアレイを用いた解析

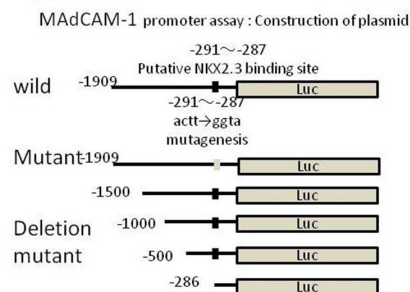
使用するアレイは、Human Promoter array 488k ChIP-on-chip (Agilent) を予定している。基本手技は、発現解析用アレイと同様に、詳細はマニュアルに準拠して行う。アレイによる有意な結果は realtime PCR にて再度確認した。取得したデータは MA2C 解析ソフトを用いて標準化、スコアリングを行い候補領域を同定した。

3) 候補ターゲット遺伝子解析

プロモーターアッセイを用いた解析

MAdCAM-1 遺伝子 5' 領域 (+10bp ~ -1909bp, reference sequence ENST00000215637) を PCR にて増幅し pGL4.11[luc2P] firefly luciferase vector (Promega) に挿入し、プロモーターアッセイ用のプラスミドとした (図 2)。HUVEC を不死化した HUVEC CRL-1730 に、ヒト NKX2.3 発現ベクターとともにコトランスフェクションし、NKX2.3 により

図2



MAdCAM-1 プロモーター活性が制御されるか確認した。確認後、NKX2.3 の結合シス配列部位を同定するために、約 500bp 毎に delete したプロモーターアッセイ用のプラスミドを作成し、どの領域に NKX2.3 の結合シス配列部位が存在するか、再度 HUVEC CRL-1730 に、ヒト NKX2.3 発現ベクターとともにコトランスフェクションし検討した。絞られた領域を転写因子結合予測ソフト (TRANSFAC) にて予測し、その部位に mutation を導入することにより、NKX2.3 による MAdCAM-1 プロモーター活性制御が消失するか確認した。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

前述の ChIP-on-chip、プロモーターアッセイ、mutagenesis の検討により絞られた結合予測配列を含む約 20 ~ 25bp 2 本鎖 DNA を合成し、プローブとする。DNA の検出系として Non-RI 系を用いるため、プローブの 5' 末端にビオチンラベルをした hot プローブとラ

ベルをしない cold プローブを作成し、EMSA に用いた。核蛋白質は、NKX2.3 発現ベクターを遺伝子導入し、12 時間培養後の HUVEC CRL-1730 から既法により抽出した。同時に対照として mock をトランスフェクションした HUVEC CRL-1730 から核蛋白質を抽出した。各プローブと核蛋白質を 30 分 16 で incubation し、ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動施行後、ナイロンメンブランにトランスファーし、化学発光にてバンドを検出した。シフトバンドが出現した場合は、抗 NKX2.3 抗体 sc-83438 (Santa Cruz) を用いてスーパーシフトしないかどうか、確認した。

4. 研究成果

1) NKX2.3 発現ベクター

作成した発現ベクターは、複数の制限酵素による切断、挿入部位前後のシークエンシングを行い確認した。HUVEC CRL-1730 に発現ベクターをトランスフェクションし、NKX2.3 が一過性発現することを、Western blot で確認した。

2) 遺伝子導入の発現解析

NKX2.3 発現ベクター (n=5) と mock (n=5) 導入後 12 時間、24 時間後について array のデータを取得し、解析を行った。1.5 fold 以上、p value < 0.05 の条件で 12 時間で 621 遺伝子、24 時間で 476 遺伝子を絞り込んだ。(両遺伝子群に MAdCAM-1 遺伝子が含まれていた)この時点で、DAVID を用いた Gene ontology 解析 (GO 解析) を行った結果、inflammatory response, cell proliferation に関する遺伝子群が有意に多く含まれていた。

3) ChIP-on-chip の結果

ゲノム上有意なシグナルを 84 ケ所に認めた。そのうち、転写開始点近傍 (TSS-1000) に存在するものは 46 ケ所 (遺伝子群に MAdCAM-1 遺伝子が含まれていた) であった。この時点でも、DAVID を用いた Gene ontology 解析 (GO 解析) を行った結果、inflammatory response, cell proliferation に関する遺伝子群が有意に多く含まれていた。

4) 統合解析

前述の発現解析と ChIP-on-chip の解析でオーバーラップしている遺伝子は、34 遺伝子あり、この時点でも、DAVID を用いた Gene ontology 解析 (GO 解析) を行った結果、inflammatory response, cell proliferation に関する遺伝子群が有意に多く含まれていた。

5) MAdCAM-1 遺伝子解析

ChIP-on-chip 解析の結果、転写開始点上流 -290bp 近傍に NKX2.3 結合領域があることが予測されたためプロモーターアッセイと EMSA 解析を行った。予想に反して、EMSA で

は抗 NKX2.3 抗体によるスーパーシフトは確認されたが、プロモーターアッセイ上は、結合領域があることを示すことはできなかった。

6) まとめ

血管内皮細胞において NKX2.3 で制御されている 34 遺伝子候補を同定した。NKX2.3 は血管内皮細胞では、inflammatory response, cell proliferation に関する遺伝子を制御していると考えられた。

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 1 件)

Shimodaira Y, Takahashi S, Kinouchi Y, et al. Modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress-induced autophagy by C/EBP homologous protein (CHOP) and inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) in human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読有、445、2014、524-533

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.054>

[学会発表](計 1 件)

Shimodaira Y, Takahashi S, Shiga H, Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Autophagy is induced by ERstress mainly through IRE1alpha in human colon cancer cells and it plays a cytoprotective role. 21th United European Gastroenterology Week、2013 年 10 月 14 日、ドイツ・ベルリン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木内 喜孝 (KINOUCHI, YOSHITAKA)

東北大学・高等教育開発推進センター・教授

研究者番号：20250780

(2) 研究分担者

角田 洋一 (KAKUTA YOICHI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50509205