

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590234

研究課題名(和文) APC蛋白質の形態形成と細胞分化に対する新規機能の解明

研究課題名(英文) APC protein's novel function related to morphogenesis and cell differentiation

研究代表者

千田 隆夫 (SENDA, TAKAO)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10187875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：APC(adenomatous polyposis coli)蛋白質は最初、癌抑制因子として発見された。APC蛋白質のC末端部分が欠損した変異APC蛋白質を発現するAPC1638Tマウスでは、 $\beta$ -カテニンとの結合領域が保存されているので癌は発生しないが、様々な異常が見つかった。APC1638Tマウスの腸の長さは野生型マウスよりも短く、小腸の陰窩底から腸絨毛先端までの長さが長かった。腸上皮細胞の移動速度は野生型マウスよりも速かった。骨格系には様々な異常(短肢、亀背、骨化不全)が認められた。歩行パターンでは四肢の協調性が欠如していた。皮膚のHair Cycleに異常が認められた。

研究成果の概要(英文)：APC (adenomatous polyposis coli) was originally identified as a tumor suppressor protein. In the present study, we investigated phenotypes of the APC1638T mouse, which lacks the C-terminus of APC but retains  $\beta$ -catenin-binding domain thus being free of tumors. Various phenotypes of the APC1638T mouse were revealed. Both length of the small intestine and that from the bottom of an intestinal crypt and the tip of a villus in the APC1638T mouse are longer than that in wild-type one. Velocity of the intestinal epithelial cell movement along the villus in the APC1638T mouse is faster than that in wild-type one. Also, the APC1638T mouse exhibited skeletal disorders (short limbs, kyphosis and mal-calcification), lacking of limb-cooperation in gait, and hair-cycle irregularities.

研究分野：発生学

キーワード：APC APC1638T 腸上皮 細胞動態 骨格 歩行異常 hair cycle

## 1. 研究開始当初の背景

(1) APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子は、家族性腺腫性ポリポシス症 (FAP) の原因遺伝子として発見された。その後、非遺伝性も含めて大部分の大腸癌の発生初期に変異を起こしていることがわかり、大腸癌抑制遺伝子として知られるようになった。一方、APC 遺伝子の発現が特に高い脳では、APC の変異と脳腫瘍の関連性は見いだせず、FAP 患者で脳腫瘍が多いという事実もない。

(2) APC 遺伝子は 2,843 個のアミノ酸からなる APC 蛋白質をコードする。APC 蛋白質は細胞増殖シグナルを伝える Wnt シグナル系を負に制御することで、癌化を抑制する。APC の変異によって Wnt シグナル系の構成因子である  $\beta$ -カテニンとの結合能を失い、Wnt シグナルが異常に促進すると、発癌に至る。研究代表者の千田は、マウスの正常 APC 発現腸上皮細胞と変異 APC (APC<sup>Min</sup>) 発現細胞における APC と  $\beta$ -カテニンの分布・局在を明らかにした。その後、 $\beta$ -カテニン以外に APC に結合する蛋白質が次々に同定され、それらの結合タンパク質との相互作用を通じて、APC 蛋白質が細胞の増殖、分化、接着、極性形成、遊走等に関与することが明らかになってきた。千田を含む研究グループは、APC が DLG と結合して細胞増殖の制御やシナプス伝達に関与していること、および Asef との結合を介して上皮細胞の遊走に関与することを明らかにした。

(3) APC は大腸癌抑制遺伝子として発見されたが、消化管以外でも広く発現しており、特に脳での発現が顕著である。しかし上述のように、APC 遺伝子の脳腫瘍への関与は否定的である。一方、Apc ノックアウトマウスでは、ホモ (Apc<sup>-/-</sup>) の胚は発生早期に死滅するので、Apc が個体の初期発生に極めて重要であることがわかるが、このマウスではその後の組織臓器発生を調べられない。また Apc<sup>Min/+</sup> マウスは生まれて来るが、若年で大腸癌が発

生するために生体機能解析が困難である。このような理由で、APC 蛋白質の個体レベルでの機能解析は進んでいない。

(4) 私たちは、APC がシナプスに濃縮していることを見出し、それを契機に APC がシナプス足場蛋白質 PSD-95 を介して、グルタミン酸受容体の 1 つである AMPA 受容体の後シナプス膜へのクラスタリングに重要であることを明らかにした。この結果より、APC は広範な脳神経機能に関与している可能性が示唆された。

(5) APC1638T ノックインマウスは、1639 アミノ酸以降の C 末端側が欠損した変異 APC 蛋白質を発現するマウスである。APC1638T マウスは  $\beta$ -catenin 結合ドメインを有しているため、癌は発生しない。私たちは APC1638T マウスを樹立者から譲り受け、行動学的、形態学的、生化学的、生理学的に多角的な解析を行った。その結果、以下のような脳の構造と高次神経機能に関する多くの興味深い結果を得た。

網羅的行動解析を実施した結果、APC1638T マウスは統合失調症様行動異常 (過活動、社会的行動の低下、うつ様行動の亢進、不安様行動の低下、学習・記憶障害) が認められた。

一部の APC1638T マウスでは著明な脳室拡大を認めた。

APC1638T マウスの海馬錐体細胞の樹状突起棘の形態異常が認められた。

APC1638T マウスの海馬、大脳皮質等のシナプスで、後シナプス肥厚部の狭小化が認められた。

私たちは、これらの表現型と APC1638T との関連を多角的に解析し、APC の末端が脳神経系の形態形成と高次神経機能の発現に密接に関わっていることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では次の 4 つの観点で APC1638T マウスを解析し、APC 蛋白質 (特にその C 末端) の生体機能解明を目指す。

(1) APC の発現が高い腸上皮における C 末端

の機能を明らかにするために、1638Tマウスの腸を検索する。特に、腸上皮の細胞分化と細胞動態に異常があると推測されるので、これに注目する。

(2) APC1638Tマウスは同じ週齢の野生型と比較して、体が小さい。発育障害の一因と推測される骨形成と骨吸収の動態を知るために、胎生期から生後の骨質の三次元構造の変化を明らかにする。

(3) APC1638Tマウスは歩行に異常が認められる。歩行のパターンを検索し、その原因を解明する。

(4) APCが毛根細胞の発現し、その機能に関与しているという報告がある。そこで、APC1638Tマウスの毛根細胞の形態と機能を追究する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腸上皮の解析方法

肉眼による観察。

HE染色による形態観察。

BrdUを取り込ませて、腸上皮細胞の移動速度を調べる。

#### (2) 骨の解析方法

マイクロCTによる海綿骨(腰椎、脛骨)の観察。

走査電顕による海綿骨(腰椎、脛骨)の観察。

胎生期および出生早期の全身切片に骨染色と軟骨染色を施し、骨化過程を観察する。

#### (3) 歩行の解析

歩行の動画撮影。

フットプリントの解析。

#### (4) 皮膚の解析

HE染色による形態解析。

Hair Cycle Scoreの解析。

### 4. 研究成果

(1) APC1638Tマウスの腸上皮の細胞分化と細胞動態の解析

APC1638Tマウスの小腸の近位・中央・遠位のすべての部位において、陰窩～絨毛の長さが野生型マウスよりも長かった。

APC1638Tマウスの小腸の陰窩～絨毛の腸上皮細胞数は野生型よりも多かった。しかし、陰窩・絨毛100 $\mu$ mあたりの腸上皮細胞数に有意差はなかった。

APC1638Tマウスの大腸の陰窩の長さ、陰窩を構成する腸上皮細胞数および100 $\mu$ mあたりの腸上皮細胞数は、野生型と同じであった。

BrdUを腹腔内投与し、24時間後に頂上皮におけるBrdUを取り込んだ細胞の位置を調べると、APC1638TマウスにおいてBrdU陽性細胞が絨毛先端に向かって、より長い距離を移動していた。

これらの結果より、APC1638Tマウス的小腸上皮細胞の増殖能が高いことが示唆された。また、APC1638Tマウスでは、小腸の栄養吸収面積が広いにもかかわらず体重が軽いことより、栄養吸収能が劣っていること可能性が示唆された。

#### (2) APC1638Tマウスの骨格系の解析

APC1638Tマウスの骨格系に様々な異常(短肢、亀背、骨化不全)が認められた。

#### (3) APC1638Tマウスの歩行パターンの解析

APC1638Tマウスの歩行では、四肢の協調性が欠如していた。

#### (4) APC1638Tマウスの皮膚の解析

組織学的には、APC1638Tマウスの皮膚(特に毛包)に異常は認められなかった。

APC1638Tマウスの皮膚のHair Cycleに異常が認められた。

これらの研究成果はいずれもAPC蛋白質の新規機能を示す新知見であり、発生学・形態形成学において相当なインパクト有するものと判断する。本研究成果をもとに、さらに発展的な研究を計画立案し遂行するつもりである。

### 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8件)

- 1) Chen H, Senda T, Kubo K : The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Medical Molecular Morphology* (査読有) (in press)
- 2) Iizuka-Kogo A, Senda T, Akiyama T, Shimomura A, Nomura R, Hasegawa Y, Yamamura K, Kogo H, Sawai N, Matsuzaki T : Requirement of DLG1 for cardiovascular development and tissue elongation during cochlear, enteric, and skeletal development: possible role in convergent extension. *Plos One* (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0123965 April 10 (2015)
- 3) Onouchi T, Kobayashi K, Sakai K, Shimomura A, Smits R, Sumi-Ichinose C, Kurosumi M, Takao K, Nomura R, Iizuka-Kogo A, Suzuki H, Kondo K, Akiyama T, Miyakawa T, Fodde R, Senda T : Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurogenic phenotypes related to schizophrenia. *Molecular Brain* (査読有) 7 : 21-34 (2014)  
DOI 10.1186/1756-6606-7-21
- 4) Chen H, Senda T, Emura S, Kubo K : An update on the structure of the parathyroid gland. *Open Anatomy* (査読有) 5 : 1-9 (2013)
- 5) Shimomura A, Takasaki A, Nomura R, Hayashi N, Senda T : Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit as a novel interaction partner of lymphocyte enhancer factor 1. *Medical Molecular Morphology* 46 : 14-19 (2013) DOI 10.1007/s00795-012-0002-z
- 6) Kogo A, Akiyama T, Senda T : Decreased apoptosis and persistence of the common nephric duct during the development of an aberrant vesicoureteral junction in Dlg1 gene-targeted mice. *Anatomical Record* (査読有) 296 :

1936-1942 (2013) DOI 10.1002/ar.22814

- 7) Yokoyama A, Nomura R, Kurosumi M, Shimomura A, Onouchi T, Iizuka-Kogo A, Smits R, Fodde R, Itoh M, Senda T : Some fine-structural findings on the thyroid gland in *Apc*<sup>1638T/1638T</sup> mice that express a C-terminus lacking truncated Apc. *Medical Molecular Morphology* (査読有) 45 : 161-167 (2012)  
DOI 10.1007/s00795-011-0553-4

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 向後晶子、向後 寛、千田隆夫、松崎利行 : Dlg1 遺伝子ノックアウトマウスにおける心臓奇形の発症機構 第119回日本解剖学会全国学術集会、2014年3月27-29日、自治医科大学(栃木県下野市)
- 2) 陳 華岳、久保金弥、千田隆夫 : 老化促進マウス SAMP6 における骨細胞・骨細管系の構造解析 第119回日本解剖学会全国学術集会、2014年3月27-29日、自治医科大学(栃木県下野市)
- 3) 陳 華岳、千田隆夫、久保金弥 : 慢性ストレスおよびチューイングによるストレス緩和によるマウス骨の構造変化 第73回日本解剖学会中部支部学術集会、2013年10月5-6日、山梨大学医学部(山梨県甲府市)
- 4) 千田隆夫、王 函雅、陳 華岳 : 消化管上皮における APC (Adenomatous Polyposis Coli) の発現・局在と機能 第45回日本臨床分子形態学会学術集会 2013年9月14日、アクロス福岡(福岡県福岡市)
- 5) Kitaguchi N, Sakai K, Senda T, Kawaguchi K, Kato M, Kuroda M, Nakai S, Hata R, Yuzawa Y, Hiki Y: Removal of blood Aβ might reduce brain Aβ deposition based on the study of hemodialysis patients : Extracorporeal Aβ Removal System (EARS) for Alzheimer's Disease therapy. *Alzheimer's Association International Conference* July 13-18, 2013, Boston (U.S.A.)

6) 向後晶子、千田隆夫、松崎利行：Dlg1 は収斂的伸長 (convergent extension) 機構による組織の伸長に必要である 第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2013 年 3 月 28-30 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川県高松市)

7) 陳華岳、久保金弥、千田隆夫：老化促進マウス SAMP6 における骨構造の変化 第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2013 年 3 月 28-30 日サンポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川県高松市)

8) 千田隆夫、横山敦司、野村隆士、黒住昌史、伊藤光泰：APC1638T マウスにおける甲状腺の形態異常と甲状腺ホルモン分泌異常 第 72 回日本解剖学会中部支部学術集会、2012 年 10 月 13-14 日、じゅうろくプラザ (岐阜県岐阜市)

9) 千田隆夫、横山敦司、野村隆士、黒住昌史、伊藤光泰：C 末端欠損 APC 発現マウスにおける甲状腺形態異常と甲状腺ホルモン分泌異常 第 44 回日本臨床分子形態学会学術集会、2012 年 9 月 29 日、高知市文化プラザかるぽーと (高知県高知市)

〔図書〕(計 3 件)

1) 千田隆夫、陳華岳、清水洋二、日本組織細胞化学会、2013 年、組織細胞化学 2013 (1 ページ-16 ページ)

〔その他〕

1) 千田隆夫：からだ作り、指令系統解明へ 岐阜新聞、2012 年 11 月 27 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千田 隆夫 (SENDA TAKAO)

岐阜大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：1 0 1 8 7 8 7 5

### (2) 研究分担者

東 華岳 (AZUMA KAGAKU)

岐阜大学大学院医学系研究科・講師

研究者番号：2 0 2 7 3 1 4 6

### (3) 研究協力者

王 函雅 (WANG TUYA)

岐阜大学大学院医学系研究科博士課程・大学院生