

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790194

研究課題名(和文) 転写調節因子 Id2 による消化管上皮細胞の発生分化制御機構

研究課題名(英文) Cell fate specification in gastrointestinal epithelial cells by helix-loop-helix factor Id2

研究代表者

森 健太郎 (Mori, Kentaro)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：50397296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：消化管上皮細胞は内胚葉に由来し、胎生期における領域特異的な運命決定により食道、胃、腸といった領域特異的な上皮細胞へと分化する。しかしそうした領域特異的な細胞分化に関わる分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究遂行者は転写調節因子 Id2 の遺伝子欠損マウス小腸において、胎生期に形成される異所性胃上皮に由来する腫瘍が形成されることを見いだした。解析の結果、Id2 は前腸内胚葉因子の抑制制御を介して小腸上皮細胞の運命決定を制御していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Gastrointestinal epithelial cells are derived from endoderm, and region-specific endoderm differentiation establishes the functionally distinct organ, esophagus, stomach and caudally positioned intestine. How region-specific epithelial characteristics are generated during development remains poorly understood. I have found that the knockout mice of transcriptional repressor Id2 develop intestinal tumors, and revealed that the tumors are derived from ectopic gastric tissues formed in the small intestine during development. This study demonstrates that Id2 is involved in the cell fate specification of the intestinal epithelial cells through the suppression of the foregut endoderm genes expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞分化 消化管上皮 内胚葉 転写因子 Id2 Irx3 Irx5

1. 研究開始当初の背景

食道、胃、小腸や大腸などの内腔を覆う消化管上皮細胞は、領域特異的な機能と形態を持ち、体内外の隔絶と消化吸収などの生体の維持に重要な役割を果たしている。

マウスの領域特異的な消化管上皮細胞の発生は、胎生9日までに原腸が前後軸に沿った、食道、胃、膵/肝、腸などの各領域への分化のためのコンピテンスを獲得する事に始まる。Sox2(食道/胃)、Barx1(胃)、Cdx2(腸)等の転写因子は領域特異的に発現し、各領域の形成には必須の因子と考えられている(Zorn and Wells, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25:221-251, 2009)。しかしそうした転写因子の領域特異的な発現がどのように制御されているのかは不明な点が多く、また、上皮-間充織相互作用におけるその機能についての詳細は明らかになっていない。

Id (Inhibitor of DNA binding/differentiation) はMyoD に代表されるbasic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子の機能抑制因子の1つである。細胞の分化の阻害と増殖を促進する活性を有しており、分化調節と増殖制御の接点で機能する分子と考えられている。これまでに研究代表者はIdファミリーの一つであるId2の機能解析に従事し、増殖促進活性をもつId2の欠損マウスが小腸腫瘍を発症するという奇異な病態を見出し、腫瘍は胎生期に異所性に生じた胃上皮細胞に由来する事を明らかにしている。また、Id2欠損マウスの小腸にはマウス前胃や食道上皮を構成する扁平重層上皮も確認された。胎生期の解析により、Id2欠損マウス中腸内胚葉では腸上皮の形成に必須のCdx2が局所的に欠損し、欠損部位では本来前腸内胚葉で発現するSox2の異所性発現が認められた。これらの事から、Id2欠損マウスでは小腸の未分化消化管上皮細胞の運命決定に障害を来している事が予想された。また、

マウス消化管形成過程におけるId2の発現は、胃では低く小腸では高いことから、胎生13日の胃にId2を異所性に発現させたところ、胃上皮の形成が阻害され、腸上皮が形成された。これらの結果よりId2は腸上皮の形成に必須であり、胃における発現抑制は胃上皮の形成に重要な機構である事が想定された。小腸上皮形成が始まる直前の胎生13日における遺伝子発現解析の結果、Id2欠損マウスでは前腸内胚葉で発現することが報告されている転写因子Irx (Iroquois related homeobox) 3とIrx5が、そして間充織では前腸間充織で発現し、上皮へのWntシグナルの作用を調節する転写因子Barx1が異所性に発現している事が判明した。Wntシグナルは発生過程で消化管の後方を誘導する活性を持つが、Wntシグナルのレポーターマウス (TOPGAL) を用いた解析から、Id2欠損マウス小腸ではWntシグナルが顕著に抑制されていることが確認された。すなわち、Id2欠損マウス中腸では消化管の形成過程において前方化が亢進し、そのことが胃上皮細胞が発生してくる要因となっていることが予想された。Irx因子の異所性胃上皮形成への関与を検討するために、腸上皮で異所性にIrx5を発現するトランスジェニックマウス (vil-Irx5Tg) を作出したところ、Id2欠損マウスと同様の胃上皮細胞を含む小腸腫瘍の形成が確認された。

以上の解析結果より、Id2は消化管上皮細胞の領域特異的な発生分化に重要な役割を担っており、その機能は上皮-間充織間相互作用を支える遺伝子発現ネットワークを制御するものであることが判明した。

2. 研究の目的

消化管上皮細胞の運命決定を制御する分子基盤を解明することを目的とし、本研究ではIrx3およびIrx5の消化管上皮細胞の発生分化過程における機能解析を行い、また転写

調節因子 Id2 による Irx3 および Irx5 の発現調節機構についても検討する。

3. 研究の方法

(1) Irx 因子 (Irx3 および Irx5) の消化管上皮細胞の発生分化における機能を調べるため、初代胎仔小腸上皮細胞への遺伝子導入により、上皮細胞の分化マーカーの発現を検討する。また、in vivo における Irx 因子の機能解析を行うため小腸上皮において Irx3 を異所性発現するトランスジェニックマウス (vil-Irx3Tg) を作出し、小腸上皮細胞の分化における影響を検討する。さらに、vil-Irx5Tg マウスと vil-Irx3Tg マウスの交配により、ダブルトランスジェニックマウス (vil-Irx3/5Tg) を作出し、胎仔小腸についてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、Irx 因子により発現調節を受ける因子を探索する。

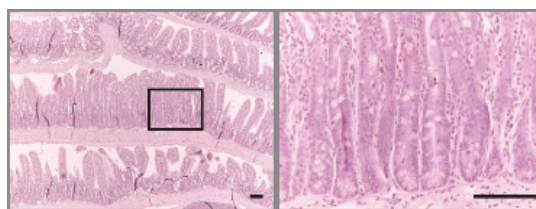
(2) Irx 因子の胎仔消化管における発現調節を担うエンハンサー領域を同定するため、各生物種および組織のゲノム情報をもとに、Irx3 および Irx5 の遺伝子近傍において特徴的な領域を検出し、レポーターアッセイにより検討する。

4. 研究成果

(1)

- ① 胎生 9.5 日より腸上皮特異的に発現する *Villin* 遺伝子プロモーター制御下で Irx3 を発現するトランスジェニックマウス (vil-Irx3Tg) を作出した。作出された 6 系統のうち、胎仔腸管において Irx3 を発現する 2 系統を同定し、そのうち胎生 13 日において Id2 欠損マウスと同程度の発現を示す 1 系統について以降の解析を行った。小腸上皮細胞の発生分化への影響について組織化学的解析を行ったところ、吸収上皮細胞、杯細

胞、腸内分泌細胞、パネート細胞など小腸上皮を構成する各種細胞については野生型と同様に確認されたが、一部の個体に小腸腫瘍が確認された (図)。



(図) (左) vil-Irx3-Tg 小腸に形確認された腺腫腫瘍の HE 染色像 (右) 左図黒枠の拡大図 scale bar; 100 μ m

腫瘍は明瞭な腺構造の異型を示していたが、AB-PAS 染色、抗プロトンポンプ抗体を用いた免疫染色の結果、胃上皮細胞は検出されなかった。また胎生期においては Id2 欠損マウスに見られるような局所的な Cdx2 の欠損や Sox2 の発現は確認されなかった。

- ② Irx 因子は各種臓器において発現に重複を示すことから、協調的に機能することが予想されている。胎仔小腸上皮細胞初代培養にレトロウイルスを用いて Irx3 と Irx5 を共発現した所、胎仔胃上皮細胞の形成に必須な転写因子 Sox2 の弱い発現誘導が確認された。この事は前腸内胚葉からの食道、胃の上皮の形成において Irx3 と Irx5 が協調的に働いており、Irx 因子は Sox2 の発現に関わる因子として機能する事を示唆している。また、Id2 欠損マウス小腸に形成される異所性胃上皮も Sox2 陽性細胞に由来すると考えられ、Irx3 と Irx5 の協調的な作用が異所性胃上皮細胞の分化を誘導している事が想定された。
- ③ vil-Irx5Tg マウスの小腸腫瘍の発症について、これまでに引き続き検討したところ、解析を行った個体の約一割について腫瘍が観察された。RT-PCR による遺伝子発現解析の結果、腫瘍では *Muc1*、*GIF*、*Tff2*、

Pgc といった各種胃上皮細胞特異的遺伝子が様々なレベルで発現していることが明らかになった。*Cdx2* は腸上皮の形成および恒常性の維持におけるマスター因子と考えられているが、*Irx5Tg* マウスの腫瘍は *Id2* 欠損マウスの腫瘍と異なり、正常部と同様に *Cdx2* の発現を認めた。そのことから *Irx5* の異所性発現は *Cdx2* の発現ではなくその機能に影響を与えていることが予想された。

④ *Irx* 因子の異所性発現により胎仔小腸において発現が誘導される遺伝子を同定するため、*vil-Irx3Tg* マウスと *vil-Irx5Tg* マウスの交配により胎仔小腸において *Irx3* と *Irx5* を同時に発現するダブルトランスジェニックマウス (*vil-Irx3/5Tg*) を作出した。*vil-Irx3/5Tg* マウスはメンデル比に従い出生することを確認したが、同腹子の *vil-Irx3Tg* および *vil-Irx5Tg* と比して著しい成長遅滞がみられた。胎生 13 日の *vil-Irx3/5Tg* マウス胎仔小腸について DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、胃上皮で発現する遺伝子の発現上昇が確認されたが、一方、腸上皮で発現する遺伝子について顕著な発現量の変化は検出されなかった。これらの結果から、*Irx* 因子は胃上皮の分化を誘導する機能を持つが、腸上皮の分化を抑制しない事が示唆された。*Irx* 因子と同様に胎仔胃上皮で発現する *Sox2* を胎仔小腸上皮で異所性発現するトランスジェニックマウスでは、小腸において胃上皮の分化が誘導される一方で、*Cdx2* の発現は抑制されず、その転写活性を阻害することが報告されている (Raghoebir et al., *J Mol Cell Biol* 4, 377-385.) が、*Irx* 因子の小腸上皮における異所性発現についても同様の事が生じていると想定された。すなわち、*Irx* 因子の異所性発現により小腸上皮細胞のアイデンティティは保たれるが、胃

上皮への分化をもたらす遺伝子発現が誘導されるため、腸上皮の特徴を有した胃上皮が形成されると考えられる。

(2) *Irx3* と *Irx5* は発現組織において発現パターンが重複する事から組織特異的発現を制御するエンハンサーを共有していると考えられている。*Id2* 欠損マウス胎仔小腸における *Irx3* と *Irx5* の異所性発現は *Id2* がそうしたエンハンサー領域の制御に機能している事を示唆している。エンハンサー領域の解析を行うにあたり、初代胎仔小腸上皮細胞を用いたレポーターアッセイ方法について検討した。まず、転写に必要な最小プロモーターについて検討した所、*Irx5* の転写には転写開始点から上流 1.7 kb の領域が重要であることが判明した。次に、*Id2* により調節されるエンハンサー領域を同定するため、UCSF Genome Browserをはじめとする複数のデータベースを用いて *Irx3-Irx5* 遺伝子座間 (約 0.55Mbp) およびその近傍の配列中に生物種間で保存されている領域を検出したところ、およそ 100 領域に及んだ。そのうち *Irx5* プロモーター上流約 23.2k bp にある 2 k bp の配列について検討した。この領域には *Id2* の制御標的である E タンパク質の結合モチーフ (E-box) が 6 カ所認められたが、レポーターアッセイの結果、この領域の明らかなエンハンサー活性は検出されなかった。最近の報告により *Irx* 因子の組織特異的転写調節領域はこれまで想定されていたよりもさらに広範囲に及ぶことが明らかになった (Smeno et al., *Nature* 507, 309-310)。 *Id2* による消化管上皮特異的転写調節領域を同定する上では、より広範囲の領域について検討を行う必要があり、今後はレポーター遺伝子を利用した解析に加え、胎児組織を利用したクロマチン高次構造変換解析による検討が必要であると思われる。

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 3 件)

- (1) Adachi AA, Fujioka A, Nagano M, Masumoto KH, Takumi T, Yoshimura T, Ebihara S, Mori K, Yokota Y, Shigeyoshi Y: Helix-loop-helix Protein Id2 Stabilizes Mammalian Circadian Oscillation Under Constant Light Conditions. *Zoolog Sci.* 査読あり 30: 1011-1018, 2013
- (2) Kurooka H, Sugai M, Mori K, Yokota Y: The metalloid arsenite induces nuclear export of Id3 possibly via binding to the N-terminal cysteine residues. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり 433: 579-585, 2013.
- (3) Kurooka H, Nakahiro T, Mori K, Sano K, Yokota Y: BMP signaling is responsible for serum-induced Id2 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり 420: 281-287, 2012.

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 森 健太郎, 宮地 均, 横田 義史: Irx3/5 トランスジェニックマウスを用いた異所性胃上皮形成機構の解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013. 12. 3 神戸
- (2) 黒岡 尚徳, 菅井 学, 森 健太郎, 横田 義史: ヒ素による転写抑制因子 Id3 の核外輸送 第 86 回日本生化学会大会 2013. 9. 12 横浜
- (3) 美谷島 杏子, 瀧 暁東, 森 健太郎, 武藤 誠, 横田 義史: Id2 の欠損は Apc 遺伝子変異マウスの回腸腫瘍の形成

を抑制する 第 35 回日本分子意生物学会年会 2012. 12. 13 福岡

- (4) 森 健太郎, 中村 ハルミ, 宮地 均, 玉田 紘太, Hui Chi-Chung, 内匠 透, 横田 義史: 転写調節因子 Id2 による消化管上皮細胞の運命決定機構 第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11 福岡

[図書] (計 0 件)

なし

[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

<http://seikal.med.lab.u-fukui.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 健太郎 (MORI KENTARO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：50397296

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：