

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860191

研究課題名(和文)大腸陰窩に局在するNOX1の新しい役割の解明と炎症性腸疾患治療への応用

研究課題名(英文) Identification of NOX1-expressing cells and pathophysiological roles of NOX1 in colon

研究代表者

松本 みさき (Matsumoto, Misaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80533926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗NOX1モノクローナル抗体の開発に取り組み、NOX1遺伝子欠損マウスを陰性対照としたスクリーニングによって、特異性と力価に優れた2種のクローン(26B1, 31C1)を得た。本抗体を用いた免疫組織学的解析により、NOX1はKi-67陽性の腸管上皮細胞に局在し、WGA陽性ムチンを含有する杯細胞には発現しないことを見出した。この新たな知見は、ごく最近報告されたNOX1欠損マウスで大腸粘膜修復が遅延することと関連する可能性がある。さらに、開発した抗体は中和抗体活性を有すること、および免疫沈降に使用可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Specific monoclonal antibodies against mouse NOX1 (clone: 26B1, 31C1) were established through the screening using NOX1-knockout mice as a negative control. This novel antibody revealed that NOX1 was expressed in Ki-67-positive proliferating colonic epithelial cells but not in WGA-bound goblet cells, supporting a recent finding that NOX1 is involved in mucosal wound repair. In addition, anti-NOX1 antibody partially suppressed NOX1/NADPH oxidase activity, which suggests a possible usage as neutralizing antibodies.

研究分野：薬理学

キーワード：大腸 活性酸素種 NADPH oxidase 抗体 マウス

1. 研究開始当初の背景

スーパーオキシド産生酵素 NADPH oxidase は、タンパク質や脂質の酸化修飾によって細胞機能に影響を与える酵素複合体である。NADPH oxidase の触媒サブユニットである NOX は膜タンパク質であり、このうち NOX1 は正常大腸組織に高発現する。これまでに研究代表者は独自に開発したポリクローナル抗体を用い、NOX1 が大腸陰窩アピカル膜 (内腔側膜) 上に存在することを見出したが、大腸上皮細胞のうちどのような細胞系譜に NOX1 が局在するか詳細は明らかにできていない。

大腸における NOX1 の役割については、NOX1 遺伝子欠損マウスにおいて際立った消化器系の異常が認められないことから解析が遅れていたが、近年 NOX1 遺伝子欠損マウスの大腸で Wnt/Notch シグナルと細胞増殖が低下することが示された (*Mol. Cell. Biol.* 30, 2636-2650, 2010)。研究代表者は、先行論文と独自に見出した NOX1 の局在について考察し、NOX1 の役割について 2 つの新しい可能性を推測した。すなわち、陰窩底部に存在する腸管幹細胞・プロジェニターの増殖促進を担う可能性と、アピカル側で粘膜保護因子であるムチン (ムコ多糖) 分泌調節を担う可能性である。また、これらの細胞機能は炎症性腸疾患における損傷した粘膜の再生・治癒過程に重要であることから、NOX1 遺伝子欠損マウスで炎症性腸疾患の回復が遅延する可能性が示唆される。

大腸に高発現する NOX1 の病態生理学的な意義を明らかにするために、NOX1 を発現する細胞系譜の同定が必要である。そこで本研究ではまず、抗 NOX1 モノクローナル抗体の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

- (1) 特異性と力価に優れた抗 NOX1 モノクローナル抗体を作製し、各種細胞マーカーを用いた免疫組織染色法により NOX1 を発現する細胞系譜の同定を行う。
- (2) NOX1 遺伝子欠損マウスを用いて、大腸炎モデルにおける NOX1 の役割を明らかにする。特に、NOX1 欠損が損傷後粘膜の再生過程に与える影響に着目する。

3. 研究の方法

- (1) 抗 NOX1 モノクローナル抗体の作製：マウス NOX1 の細胞外ドメイン (139-152 番目アミノ酸) に相当するポリペプチドを抗原とし、ラットに 6 回免疫後、得られた脾臓細胞からハイブリドーマを作製した。複数のハイブリドーマウェルについて、抗原ペプチドを用いた抗原固相 EIA 法により陽性ウェルを選抜した。それぞれについてさらに、マウス NOX1 強制発現細胞および NOX1 遺伝子欠損マウスを陰性対照

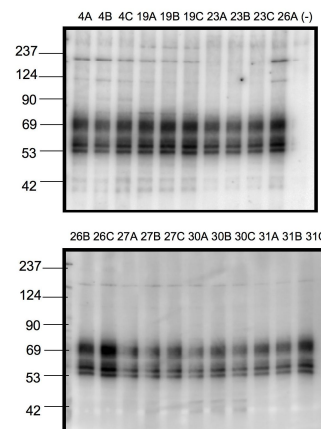
としたスクリーニング (ウエスタンブロット法および免疫染色法) を行い、NOX1 タンパクに反応する陽性ウェルを選抜した。その後、限界希釈法によるクローニング作業を 2 回実施し、最終ハイブリドーマクローンを得た。これらについて高密度培養および Protein A を用いた培養上清からの抗体精製を行い、モノクローナル抗体を得た。

- (2) 免疫組織染色：野生型マウスより大腸を摘出し、PFA 固定後、凍結切片およびパラフィン切片を作成した。抗原賦活後、抗 NOX1 モノクローナル抗体、WGA-Rhodamine、抗 Ki-67 抗体、DAPI を用いて、それぞれ NOX1 発現細胞、ムチン含有杯細胞、増殖細胞、細胞核を染色した。これらを組み合わせた多重染色法を行い、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて観察した。
- (3) 中和抗体活性の評価：HEK293 細胞に NOX1、およびコファクターである NOXA1、NOXO1 を遺伝子導入し、48 時間後に細胞を回収した。10<sup>5</sup> 細胞に、1、3、10 μg の抗 NOX1 モノクローナル抗体または 10 μg のラット IgG を添加し、氷上にて 30 分間インキュベートした。その後、活性酸素種検出試薬 L-012 を加え 37 条件下で 60 分間化学発光を計測した。

4. 研究成果

- (1) 抗 NOX1 モノクローナル抗体の開発：抗原ペプチドを用いた抗原固相 EIA 法により 30 個の陽性ウェルを選抜した。全てについて、マウス NOX1 強制発現細胞および NOX1 遺伝子欠損マウスを陰性対照としたスクリーニング (ウエスタンブロット法および免疫染色法) を行い、NOX1 タンパクに反応する陽性ウェルを 9 つ選抜した。このうち、限界希釈法により 7 株のハイブリド-

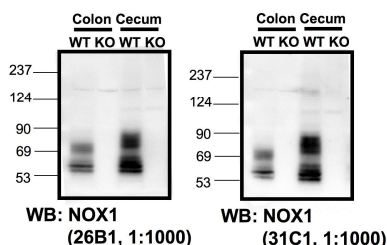
図1: ハイブリドーマ上清によるマウス大腸NOX1タンパクの検出



Sample: WT mice, colonic membrane fraction  
WB: NOX1 (supernatants, 1:10)

マクローンが得られた。全てのクローン上清はマウス大腸膜画分中の NOX1 を検出した (図 1)。この中から特異性と力価に優れた 2 種のクローン (26B1, 31C1) を選択し、それぞれの最終精製

図2: 精製IgGによる  
NOX1の検出とその特異性



IgG を得た (図 2)。開発した抗 NOX1 モノクローナル抗体は、研究代表者がこれまでに開発したポリクローナル抗体の感度を上回るものであり、発現量の低さから従来検出できなかった小腸、脾臓、肺組織の膜画分から初めて NOX1 を検出することが可能であった。今後本抗体を用いることで、これらの組織における NOX1 の局在解析などの新たな研究展開が期待される。

- (2) 大腸陰窩における NOX1 の局在解析：大腸陰窩中部～底部には、活発な細胞増殖を行う腸管幹細胞・プロジェニター細胞が存在する。一方、研究代表者が既にポリクローナル抗体を用いて見出している NOX1 の局在も、大腸陰窩中部～底部のアピカル膜上に認められることから、局在が一致する可能性が示唆される。腸管幹細胞のマーカーとしては 2007 年に同定された Lgr5 が知られるが、入手可能な優れた抗体が無いことから、腸管幹細胞・プロジェニター細胞を含む細胞増殖期の細胞に発現する Ki-67 を用いた多重染色を行った。さらに、これらの細胞が分化することで大腸には多数の杯細胞が存在するが、これら杯細胞に含有されるムチンを WGA-Rhodamine を用いて染色した。その結果、NOX1 は Ki-67 陽性の大腸上皮細胞に局在し、杯細胞には発現しないことを見出した。また興味深いことに、陰窩の最も底部で観察される NOX1 陽性細胞の形態は細長く、くさび形状の核を有する陰窩底部円柱細胞 (crypt base columnar cell, CBC 細胞) に近似するものであった。
- (3) 大腸粘膜再生における NOX1 の役割：代表者は申請時当初、大腸炎モデルマウスを作製し、粘膜損傷後の再生過程における NOX1 の解析を行う予定であった。しかしながら、本研究開始直前に海外研究グループより、大腸特異的 NOX1 遺伝子欠損マウスを用いることにより、デキストラン硫酸ナトリウム摂水大腸炎

モデルにおける NOX1 の粘膜修復促進作用が報告された (*J Clin Invest.* 123(1):443-54, 2013)。本論文では、NOX1 由来の活性酸素種がホスファターゼの酸化的修飾 (不活性化) を誘導し、細胞接着因子のリン酸化を促し大腸上皮細胞の細胞移動 (修復) を促進することを証明している。一方で同年 12 月、杯細胞におけるムチンの遊離に NADPH oxidase 由来の活性酸素種が重要であるとの知見も報告された (*EMBO J.* 32(24):3130-44, 2013)。しかしながら両論文において、大腸組織における NOX1 発現細胞の特定はなされていない。そこで研究代表者は、重複する腸炎モデルの表現型解析を変更し、独自に開発した抗 NOX1 モノクローナル抗体を用いた NOX1 発現細胞の同定を重点的に進めた。上述したように、NOX1 は Ki-67 陽性の大腸上皮細胞に局在することが明らかとなったことから、NOX1 は粘膜再生に重要な腸管幹細胞・プロジェニター細胞において機能することで粘膜修復を促進すると考えられる。また一方で、NOX1 は杯細胞に局在しないことから、単一細胞においてムチンの遊離に直接的に関与しないことも示唆された。

- (4) 中和抗体活性を有する抗体の探索：開発した抗 NOX1 モノクローナル抗体のうち 26B1 は NOX1/NOXA1/NOXO1 強制発現細胞における活性酸素産生を部分的に抑制し、中和抗体として機能することを見出した。この中和抗体活性は、糖鎖修飾を受けない NOX1 変異体 (N161,241Q-NOX1) でより増強されることから、本抗体による立体的な抗原認識に細胞外の糖鎖修飾が影響していることも明らかとなった。
- (5) 免疫沈降法による内在性 NOX1 の単離抽出：開発した抗 NOX1 モノクローナル抗体を用いた免疫沈降により、これまで不可能であった大腸組織ライセートからの NOX1 抽出に成功した。今後、生体組織内で NOX1 と相互作用する未知タンパクの同定に繋げる予定である。

以上のように、炎症性腸疾患における NOX1 の機能解析については海外研究グループに先行されたものの、抗 NOX1 モノクローナル抗体の開発により新しい独創的な知見が得られた。NOX1 発現細胞を同定した研究成果は論文にまとめ、投稿する予定である。さらに NOX1 抗体については国内外より複数件の問い合わせがあり、共同研究の発展に繋がった。

##### 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)

**Matsumoto M.**, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Zhang J, Zhu K, Nauseef WM, Yabe-Nishimura C. Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med.* 68:196-204. 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

**松本みさき**、張嘉、矢部千尋：非アルコール性脂肪性肝炎モデルにおけるスーパーオキシド産生酵素 NOX1 の役割、第 126 回日本薬理学会近畿部会、2014 年 10 月 24 日、和歌山県 JA ビル(和歌山)

**Matsumoto M.**, Tanaka M, Yabe-Nishimura C. Analysis of the role of NOX1 in renal physiology. Program No.27, Nox Family NADPH Oxidases, Gordon Research Conference, May 18~23th 2014, Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy

**松本みさき**、矢部千尋：新規抗 NOX1 抗体による NOX1 蛋白の N 型糖鎖修飾の同定とその機能解析、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜(横浜)

〔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：  
出願年月日：  
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

松本 みさき (MATSUMOTO, Misaki)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：80533926

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：