

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08132

研究課題名(和文) APC蛋白質のC末端に由来する多彩な生理機能とその異常

研究課題名(英文) Multi-functions derived from the C-terminus of APC protein and their disorders

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：10187875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：APC(adenomatous polyposis coli)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マウスの腸上皮において、様々な異常が見つかった。腸陰窩から最上位のKi-67陽性細胞までの細胞数が多く、異所性の増殖細胞が存在した。腸上皮におけるその構成細胞(杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞)の数は、杯細胞とパネート細胞が増加し、内分泌細胞は減少していた。絨毛あたりのアポトーシス細胞の数が有意に多かった。これらの結果より、APC蛋白質のC末端は小腸上皮のホメオスタシスの維持に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, various phenotypes of the APC (adenomatous polyposis coli) 1638T mouse were revealed. Cell number between the bottom of an intestinal crypt and the highest Ki-67 positive cell in the APC1638T mouse are more than that in wild-type one, suggesting the presence of ectopic proliferative cells. Though goblet cells and Paneth cells increased in number, endocrine cells decreased. Number of apoptotic cells per villus is more than that in wild-type one. These results suggest that C-terminus of APC protein is involved in maintenance of homeostasis in intestinal epithelium.

研究分野：発生学

キーワード：APC APC1638T 腸上皮 細胞増殖 パネート細胞 内分泌細胞 アポトーシス

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 β -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^{Min}) 発現細胞における APC と β -カテニンの分布・局在を明らかにした。その後、 β -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^{-/-}) 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^{Min/+} マウスのように、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) 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 β -catenin 結合ドメインを有しているので、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見られた。

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、APC の発現が高い腸上皮における APC の C 末端の機能を明らかにするために、腸にがんが発生しない APC1638T マウスを用いて、特に以下の 3 点に注目して解析を行った。

(1) APC1638T マウスの腸絨毛は野生型マウスの絨毛よりも長い、という結果が既に得られている。この原因として、腸上皮細胞の増殖能に異常がないかどうかを調べる。

(2) APC1638T マウスの腸上皮の細胞分化に

異常がないかどうかを知るために、腸上皮を構成する4種類の細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞）の構成比と分布領域を調べる。

(3) 腸絨毛の長さに影響を与えうる因子として、腸上皮細胞のアポトーシスがある。腸上皮は陰窩内で増殖し、絨毛を上行し、絨毛先端でアポトーシスを起こして脱落するという過程を経るとされる。本研究では、APC1638Tマウスの腸上皮のアポトーシスを調べる。

3. 研究の方法

(1) 腸上皮細胞の増殖能の解析方法

細胞増殖マーカーであるKi-67を免疫組織化学法によって検出し、陽性細胞の数と分布域を検索する。

(2) 腸上皮を構成する4種類の細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞）の構成比の解析方法

杯細胞はPAS染色で青紫色に濃染する。パネート細胞はphloxine-tartrazine染色で赤く染まる。内分泌細胞はChromogranin Aに対する免疫染色で検出可能である。

(3) アポトーシスの解析方法

アポトーシスを起こしている細胞は、Cleaved caspase-3陽性である。抗Cleaved caspase-3抗体による免疫染色で検出する。

4. 研究成果

(1) APC1638Tマウスの腸上皮細胞の細胞増殖能

APC1638Tマウス小腸上皮内のKi-67陽性細胞の数は野生型マウスよりも多く、しかも野生型のように陰窩内に限局せず、絨毛基部にも存在した。

(2) APC1638Tマウスの腸上皮を構成する細胞の数

- ・杯細胞は十二指腸と回腸で増加し、空腸で減少した。
- ・パネート細胞は小腸全域で増加を認めた。
- ・内分泌細胞は、十二指腸で増加し、空腸

で減少、回腸では有意差はなかった。

(3) APC1638Tマウス腸上皮におけるアポトーシスの解析

野生型APCマウスとAPC1638Tマウスの腸絨毛1本あたりのアポトーシス細胞数は、それぞれ0.62個/絨毛、1.29個/絨毛であり、APC1638Tマウスの腸絨毛1本あたりのアポトーシス細胞数は有意に多かった。

(4) 本研究において、APC1638Tマウスの小腸の構造異常に加えて、上皮細胞の動態（細胞交代現象、恒常性）にも異常が認められた。APC1638Tマウスにおける腸上皮細胞の増加とそれに伴う陰窩絨毛長の伸長は、Ki-67のデータで示された増殖細胞の増加に起因すると思われる。小腸上皮を構成する4種類の細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞および内分泌細胞）のいずれの細胞も、腸陰窩底に存在する幹細胞から分化する。その数的構成比と絨毛陰窩軸における存在部位は、腸上皮の絶え間ないターンオーバーの中で、常に一定に保たれている。しかし、APC1638Tマウスでは、この4種類の細胞の数的構成比に異変が認められたことから、増殖した前駆細胞から4種類の上皮細胞への分化過程の異常が示唆された。APC1638Tマウスの腸絨毛ではアポトーシスを起こした細胞が剥離せずに残っていることが示唆された。このことが絨毛の長さが長いことに寄与している可能性がある。

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 5件)

Matsuda S, Senda T: BRI2 as an anti-Alzheimer gene.

Medical Molecular Morphology、査読有、2018
DOI: 10.1007/s00795-018-0191-1

Wang T, Onouchi T, Yamada N-O, Matsuda S, Senda T: A disturbance of intestinal epithelial

cell population and kinetics in APC1638T mice.
Medical Molecular Morphology、査読有、2017、
50(2) : 94-102

DOI : 10.1007/s00795-016-0152-5

Sakai K, Senda T, Hata R, Kuroda M, Hasegawa M, Kato M, Abe M, Kawaguchi K, Nakai S, Hiki Y, Yuzawa Y, Kitaguchi N : Patients that have undergone hemodialysis exhibit lower amyloid deposition in the brain: Evidence supporting a therapeutic strategy for Alzheimer's disease by removal of blood amyloid.

Journal of Alzheimer's Disease、査読有、2016、
51: 997-1002

DOI : 10.3233/JAD-151139

Chen H, Senda T, Kubo K : The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis.

Medical Molecular Morphology、査読有、2015、
8 : 61-68

DOI : 10.1007/s00795-015-0099-y

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、2015

DOI:10.1371/journal.pone.0123965

〔学会発表〕(計 9件)

石田裕保、李 晨光、松田修二、千田隆夫
APC1638T マウスにおける歩行時の肢間協調
運動の異常と今後の展望

第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会(武蔵野) (2018 年 3 月 28-30 日)

王 函雅、山田名美、松田修二、尾之内高慶、千田隆夫

APC1638T マウスの小腸における上皮細胞動態 -特にアポトーシスについて-

第 77 回日本解剖学会中部支部学術集会(豊

明)(2017 年 10 月 7-8 日)

石田裕保、小川名美、松田修二、千田隆夫
APC1638T マウスにおける歩行時の肢間協調
運動の異常と脊髄形態

第 49 回日本臨床分子形態学会学術集会(岐阜) (2017 年 9 月 15 日)

山田名美、松田修二、千田隆夫
大腸がん抑制遺伝子 APC の細胞内局在と抗
APC 抗体の有用性 2017

第 49 回日本臨床分子形態学会学術集会(岐阜) (2017 年 9 月 15 日)

王 函雅、尾之内高慶、山田名美、松田修二、千田隆夫

APC1638T マウスにおける小腸上皮の細胞分
化と細胞動態の解析

第 49 回日本臨床分子形態学会学術集会(岐阜) (2017 年 9 月 15 日)

千田隆夫
APC が織りなす細胞内シグナルネットワーク
と研究者ネットワーク

第 49 回日本臨床分子形態学会学術集会(岐阜) (2017 年 9 月 15 日)

石田裕保、WANG TUYA、小川名美、松田修二、千田隆夫

APC1638T マウスにおける歩行時の肢間位相
性の欠如

日本解剖学会第 76 回中部支部学術集会(松本) (2016 年 10 月 9 日)

王 函雅、山田名美、尾之内高慶、松田修二、千田隆夫

APC1638T マウスにおける小腸上皮の細胞分
化と細胞動態の解析

日本解剖学会第 76 回中部支部学術集会(松本) (2016 年 10 月 9 日)

千田隆夫、尾之内高慶、小林克典、松田修二、山田名美

APC の C 末端欠損マウス (APC1638T マウス)
における統合失調症様症状とシナプスの形
態機能異常

第 48 回日本臨床分子形態学会学術集会(熊

本) (2016年9月24日)

〔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

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：10187875

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

清水 洋二 (SHIMIZU Yoji)

岐阜大学・大学院医学系研究科博士課程・大学院生

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

石田 裕保 (ISHIDA Hiroyasu)

岐阜大学・大学院医学系研究科博士課程・大

学院生

李 晨光 (LI Chen Guang)

岐阜大学・大学院医学系研究科博士課程・大学院生