

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08968

研究課題名(和文) Dectin-1を介した選択的Foxl1制御に基づく腸管再生の基礎的検討

研究課題名(英文) Fundamental study on development of intestinal epithelial cell regeneration mechanism based on myofibroblast regulation

研究代表者

馬場 重樹 (BAMBA, Shigeki)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：40422901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋線維芽細胞にはDectin-1が発現しておりDectin-1依存性にSchizophyllan (SPG) という -1,3-glucanを担体とし、Foxl1アンチセンスDNA塩基配列を筋線維芽細胞内に導入することが可能である。本研究では、Dextran sulfate sodium (DSS) 腸炎モデルにFoxl1アンチセンスDNA塩基配列とSPGとの複合体を投与することにより腸炎における効果を検討した。Foxl1アンチセンスDNA塩基配列とSPGとの複合体をDSS腸炎マウスモデルに投与したところ、複合体を投与した群において体重減少率の低下と大腸腸管長の短縮抑制、大腸陰窩長の延長が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Myofibroblasts are known to play an important role in inflammatory bowel diseases. Schizophyllan (SPG) can be used as a transporter of DNA sequence into cytoplasm via Dectin-1 which is expressed on the surface of myofibroblasts. We have investigated the application of this drug delivery system focusing on Foxl1. Inhibition of Foxl1 using antisense-Foxl1/SPG complex ameliorates body weight loss and significant increase in length of the colon and crypts in dextran sodium sulfate (DSS) colitis model.

研究分野：内科学臨床医学

キーワード：腸管上皮細胞 筋線維芽細胞 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

短腸症候群の現状について

近年、クローン病などの炎症性腸疾患の著しい増加に伴い、短腸症候群 (short bowel syndrome) に陥る症例も増加傾向にあります。高度な消化吸収障害に対しては一般的に在宅の中心静脈栄養療法が用いられますが、長期間の敬樹尾動脈栄養はしばしばカテーテル関連血流感染 (catheter-related blood stream infection: CRBSI) や腸管不全合併肝障害 (intestinal failure-associated liver disease: IFALD) を合併し生命予後に影響を与える場合があります。近年、欧米を中心に GLP-2 (glucagon-like peptide-2) アナログによる残存小腸の機能向上を目指した臨床応用が行われており、一定の効果を上げておりますが、本邦では未だ保険承認されておられません。

我々は GLP-2 とは異なったアプローチを模索しており、Hedgehog シグナルの中でも後述する Foxl1 という転写因子に着目しております。Foxl1 は筋線維芽細胞などの間葉系細胞に特異的に発現し、Foxl1 ノックアウトマウスにおいて筋線維芽細胞の Wnt 発現亢進と上皮細胞の増殖亢進が報告されております (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 29(1):G163)。

腸管上皮細胞と間葉系細胞との相互作用 (epithelial-mesenchymal interaction) について

以前は不可能であったマウス正常腸管上皮幹細胞の単独培養が 2009 年に報告されてから上皮細胞の増殖因子が大きく脚光を浴びることとなりました (Nature. 2009 14; 459(7244): 262)。具体的には Matrigel を培養に用い、EGF, R-spondin1, Noggin を添加することにより、マウス腸管上皮細胞の長期単独培養系が確立されました。しかし、極性を持った腸管上皮細胞の分化・増殖には、その足場となる間葉系細胞、特に筋線維芽細胞と上皮細胞との細胞間情報伝達 (epithelial-mesenchymal interaction) が重要であり、筋線維芽細胞が上皮幹細胞の分化・増殖に必要な環境 (niche) を提供していると考えられています。近年、Hedgehog シグナルが epithelial-mesenchymal interaction に重要であるとの報告がなされております (Gastroenterology. 2010 139(3): 893)。

本研究では Hedgehog シグナルの中でも Foxl1 という転写因子に着目して研究を進めることとしました。Foxl1 は筋線維芽細胞などの間葉系細胞に特異的に発現し、Foxl1 ノックアウトマウスにおいて筋線維芽細胞の Wnt 発現亢進と上皮細胞の増殖亢進が報告されております (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 29(1): G163)。しかしながら、Foxl1 の in vivo における制御の報告はなされていません。

間葉系細胞、特に筋線維芽細胞の制御に発現する Dectin-1 と Schizophyllan (SPG) を単体として Drug delivery system (DDS) について

自然免疫におけるパターン認識受容体として Toll 様受容体 (TLR) や C-type lectin の一種である Dectin-1 (別名 CLEC7A) が存在します。Dectin-1 は β -1,3-D-gulcan の受容体であり、樹状細胞に発現が見られることが報告されておりますが、我々は筋線維芽細胞に Dectin-1 の発現が見られることを免疫染色で確認しております。また、小腸筋線維芽細胞は大腸由来の筋線維芽細胞に比較し、より多くの Dectin-1 の発現が見られることを real time PCR で確認しております。

β -1,3-D-gulcan は Dectin-1 を介して細胞内に取り込まれますが、我々は in vivo における塩基配列の細胞内導入に Schizophyllan (SPG) という β -1,3-D-gulcan が有用であると考えております。SPG はスエヒロダケから抽出される β -1,3-D-gulcan で、日本では既に子宮頸癌の放射線療法の増感作用目的で薬価収載されている医薬品です。Sakurai らのグループから報告されておりますが、この β -1,3-D-gulcan は三重らせん構造をとっており、その三本鎖のうち一本に DNA 塩基配列を組み込むことが可能であります (Bioconjugate Chem. 2007 18:1280-76)。

組み込ませる DNA 配列には 40mer 以上の poly A を付加し、設計段階で phosphodiester (PO) から phosphorothioate (PS) 化することにより DNA 配列自体の半減期を数分から 2 日間に延長することができ、また、SPG との会合率が PS 化することによりほぼ 100% になることが分かっています。

我々の教室では既に Macrophage-migration inhibitory factor (MIF) に対するアンチセンス DNA 塩基配列を SPG と会合させた複合体を DSS (dextran sodium sulfate) 腸炎モデルに投与することで腸炎が改善することを報告しております (Mol Ther. 2012 20(6):1234)。

2. 研究の目的

我々は Foxl1 アンチセンス DNA 塩基配列と SPG との複合体 (Foxl1-NLA-As-ODN/SPG_complex) をマウスに投与することにより複合体が上皮細胞ではなく、上皮を裏打ちするように存在し、niche を形成している筋線維芽細胞に取り込まれることにより Foxl1 を細胞特異的に制御することが可能であると考えております。

筋線維芽細胞からの Foxl1 産生が抑制されることで上皮細胞の分化増殖が亢進し、小腸の上皮細胞機能が増強されることを確認すること目的としております。

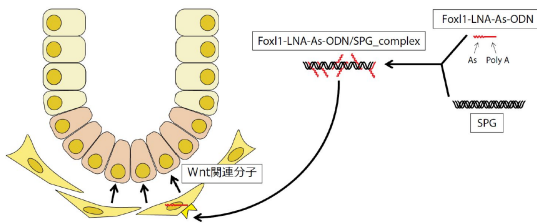
本研究では以下の点について検討を加えています。

Epithelial-mesenchymal interaction の解析

Foxl1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列と SPG とを会合させることにより複合体 (Foxl1-NLA-As-ODN/SPG_complex) を作成し、DSS 腸炎モデルマウスへ投与を行う。

以上の実験を行うことにより、Foxl1 アンチセンス DNA 塩基配列と SPG との複合体 (Foxl1-NLA-As-ODN/SPG_complex) 腸管上皮細胞の分化・増殖能に与える影響について検討を試みています。

下図は Foxl1 アンチセンス DNA 塩基配列と SPG との複合体 (Foxl1-NLA-As-ODN/SPG_complex) の作用機序 (仮説) を示したものになります。



3. 研究の方法

Epithelial-mesenchymal interaction の解析

12 週齢の雌性 C57/BL6 マウスの腸管から EDTA を用い上皮細胞のみを単離後に mRNA を抽出したものと、培養したマウス筋線維芽細胞から mRNA を単離したものに対して Wnt 関連分子の mRNA 発現量を real time PCR にて検討しています。

また、Wnt 関連分子発現の局在を明らかにする目的で 12 週齢の雌性 C57/BL6 マウスの小腸、大腸を摘出し、凍結切片を作製後に laser capture microdissection を行いました。具体的には、小腸の絨毛頂部または大腸の陰窩頂部領域と、小腸の陰窩底部または大腸の陰窩底部から細胞を採取することで、小腸と大腸における Wnt 関連分子の発現局在を明らかとしています。

筋線維芽細胞における Dectin-1 発現に影響を与える因子について

マウス筋線維芽細胞において Dectin-1 の発現は確認されていますが、発現増強がみられる因子について検討を加えています。Interleukin (IL)-4, Flt3, IL-12, TNF-α と 7 日間培養し筋線維芽細胞における Dectin-1 の発現量を real time PCR を用いて検討を行っています。

Foxl1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列と SPG との複合体 (Foxl1-NLA-As-ODN/SPG_complex) を作成。マウスへ投与を行う。

(1) アンチセンス・SPG 複合体の作成

SPG を 0.25N の NaOH に溶かし(1本鎖にするため) 2 日ほど放置します。

DNA 溶液(water)と 1 M Tris buffer (pH = 7.6)を混和後、攪拌します。

SPG/NaOH 溶液を添加し攪拌する vortex し、完全に混合後、4°C で静置します。

(2) Foxl1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列を以下に示します。塩基配列は全て

phosphorothioate 化しており、さらに poly A tail を 40mer 付加することにより SPG との会合高率が 100%にすることが可能になります。

Foxl1 アンチセンス

TGGAAAGTGTGAGTGGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAA

(3) 急性腸炎モデルの作成

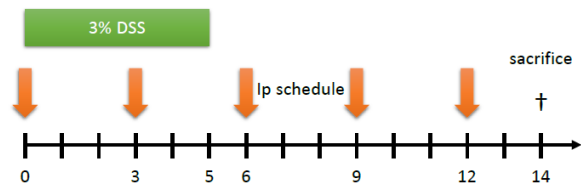
DSS 腸炎モデル

以下に示すとおり、雌性 C57/BL6 マウスに 3% dextran sodium sulfate を自由飲水にて投与。5 日後に蒸留水に変更し 14 日後まで体重変化を記録。14 日後に屠殺し、腸管重量や長さなどを検討しています。

検討は以下の 3 群に対して行っています。一群は n = 5 で施行しています。

- (I) DSS 単独投与群 (以下、DSS 群)
- (II) DSS 投与下に Foxl1 アンチセンス DNA 塩基配列と SPG を会合させずに腹腔内投与を行った群 (以下、非会合群)
- (III) DSS 投与下に Foxl1 アンチセンス DNA 塩基配列と SPG の複合体を腹腔内投与を行った群 (以下、会合群)

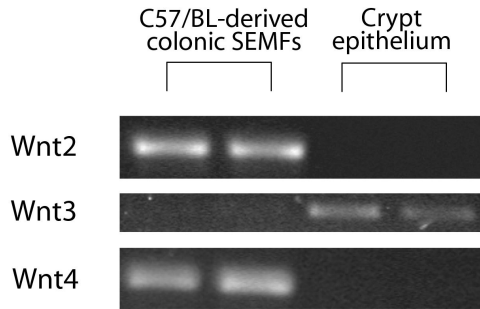
以下の3群について検討
①DSS単独投与群(生食ip)
②アンチセンス単独投与群(Foxl1-NLA-As-ODNとSPGをip)
③複合体投与群(Foxl1-NLA-As-ODN/SPG_complexをip)



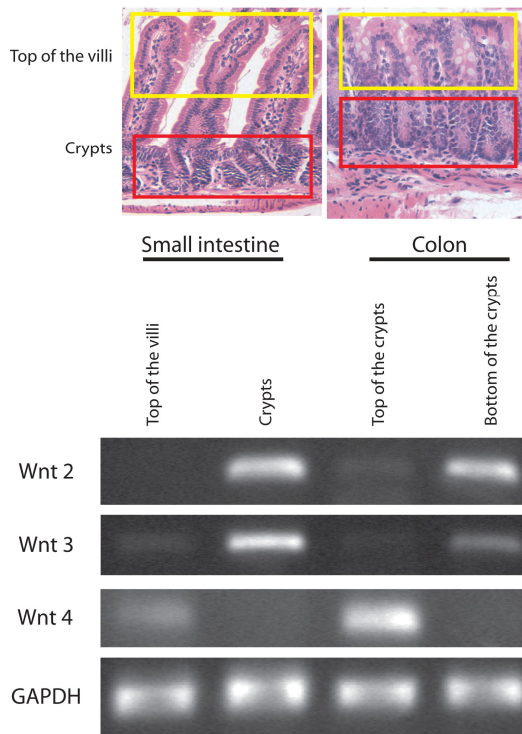
4. 研究成果

Epithelial-mesenchymal interaction の解析

培養により得られたマウス筋線維芽細胞と EDTA にて単離された上皮細胞の real time PCR の結果を提示します。Wnt2 と Wnt4 は筋線維芽細胞を中心に発現が確認できました。一方、Wnt3 の発現は上皮細胞を中心に発現が確認できました（下図）。



次に laser capture microdissection による結果を提示します。小腸と大腸において陰窩底部には Wnt2 と Wnt3 の発現が確認できました。一方で Wnt4 は大腸の陰窩頂部に強く発現が確認できています。小腸に関しては絨毛頂部で Wnt4 の発現が弱く確認することが出来ました（下図）。

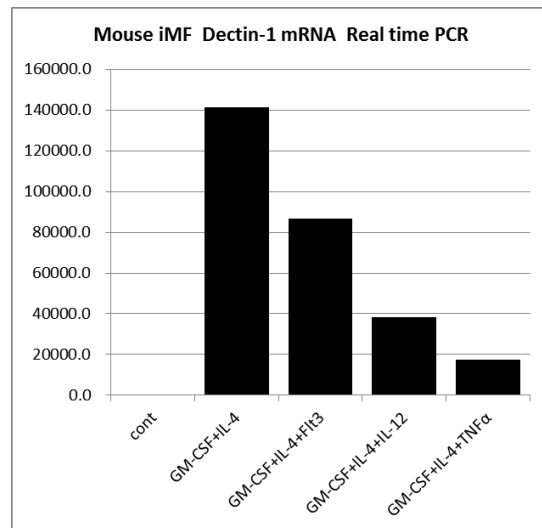


以上の結果を組み合わせることにより Wnt2 は陰窩底部の筋線維芽細胞から、Wnt3 は陰窩底部の上皮細胞から、Wnt4 は頂部の筋線維芽細胞からの発現であると結論付けることが可能でした（右上図）。

	Basal	Apical
Epithelial	Wnt3	
Mesenchymal	Wnt2	Wnt4

筋線維芽細胞における Dectin-1 発現に影響を与える因子について

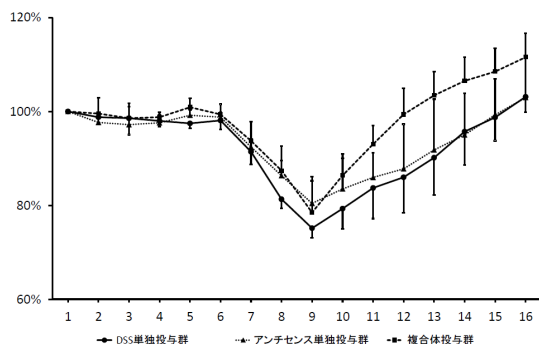
マウス筋線維芽細胞の Dectin-1 発現は GM-CSF により上昇し、その増強効果は IL-4 と共培養したときに最も強く認められました。



Foxl1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列と SPG との複合体 (Foxl1-NLA-As-ODN/SPG complex) を作成。マウスへ投与を行う。

本研究において DSS 単独投与群、Foxl1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列と SPG との会合をさせずに投与するアンチセンス単独投与群、アンチセンス DNA 塩基配列とは SPG との複合体 (Foxl1-NLA-As-ODN/SPG complex) を投与する複合体投与群の 3 群を作り検討を行っています。

体重変化を以下に示します。DSS 投与により 3 群とも 9 日目をピークに体重減少を示しています。しかしながら、その後の体重増加率が会合群において有意に高い結果が得られました。アンチセンス単独投与群では複合体投与群と当量の Foxl1 アンチセンス塩基配列が投与されていますが、体重の回復率で良好な結果が得られませんでした（次頁上図）。



腸管長は DSS 単独投与群において $71.4\text{mm} \pm 6.0\text{mm}$ であったのに対し、アンチセンス単独投与群では $84.5\text{mm} \pm 8.4\text{mm}$ 、複合体投与群で $85.5\text{mm} \pm 2.1\text{mm}$ と複合体投与群で有意に腸管長の延長を認めました。

また、湿重量に関しても DSS 単独投与群では $304.6\text{g} \pm 20.7\text{g}$ であったのに対し、アンチセンス単独投与群では $251.0\text{g} \pm 33.4\text{g}$ 、複合体投与群で $258.8\text{g} \pm 15.3\text{g}$ と複合体投与群で有意に腸管長の延長を認めました。

単位長さ当たりの腸管湿重量についても DSS 単独投与群で $43.0\text{g}/\text{cm} \pm 6.0\text{g}/\text{cm}$ であったのに対し、アンチセンス単独投与群では $29.6\text{g}/\text{cm} \pm 1.3\text{g}/\text{cm}$ 、複合体投与群で $30.3\text{g}/\text{cm} \pm 2.4\text{g}/\text{cm}$ となり、DSS 単独投与群ではアンチセンス単独投与群や複合体投与群と比較すると有意に単位長さ当たりの腸管湿重量が重いという結果が得られました。

Foxl1 の投与にて陰窩の長さが延長することが期待されるため、近位大腸と遠位大腸において陰窩長を計測しています。

近位大腸において、DSS 単独投与群では $0.083\text{mm} \pm 0.018\text{mm}$ 、アンチセンス単独投与群では $0.13\text{mm} \pm 0.046\text{mm}$ 、複合体投与群では $0.149\text{mm} \pm 0.039\text{mm}$ であり、複合体投与群で有意に陰窩長の延長が認められました。

一方、遠位大腸では、DSS 単独投与群では $0.098\text{mm} \pm 0.018\text{mm}$ 、アンチセンス単独投与群では $0.94\text{mm} \pm 0.0050\text{mm}$ 、複合体投与群では $0.092\text{mm} \pm 0.012\text{mm}$ であり、三群間で有意な変化を認めませんでした。

以上より、選択的な Foxl1 阻害により、DSS による粘膜傷害刺激に対し、腸管保護的な作用が得られることが明らかとなりました。今後、短腸症候群に対する治療選択としての臨床応用の可能性が期待されるため、今後、安全性の検討に加え、glucagon-like peptide-2 (GLP2) などとの比較実験を行いたいと考えています。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 重樹 (BAMBA SHIGEKI)

滋賀医科大学医学部附属病院・栄養治療部・講師

研究者番号：40422901