

令和元年6月19日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19375

研究課題名(和文)胆汁酸によるエピジェネティック修飾の解明

研究課題名(英文)Role of epigenetic modification by bile acid

研究代表者

岡田 季之(Okada, Toshiyuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10607328

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)：本研究は、腸炎によって胆汁酸が大腸に流れ出すことでAID(活性化誘導シチジンデアミナーゼ)の発現が誘導され、腸管上皮細胞の遺伝子発現が変化する可能性について検討した。大腸由来の培養細胞に胆汁酸処理を行うとAIDの発現が誘導されることが示唆された。そこで、「AIDを発現させた培養細胞」と「腸炎を発症したマウスの腸管上皮細胞」の遺伝子発現プロファイルを比較したが、共通する遺伝子は同定することができなかった。興味深いことに、マウスの腸管上皮細胞において細胞の生存環境に重要な足場を構成する遺伝子の発現にAIDが寄与していることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸管の上皮細胞で異所性に発現するAIDが、細胞の生存環境に重要な足場を構成する遺伝子の発現に寄与していることを同定した。この足場は、細胞の増殖や維持、そして組織修復と多岐にわたり重要な役割を担っていることが知られている。つまり、炎症に伴い発現するAIDの役割を理解することは、おなかを健康に保つために重要であり、新たな治療法の確立にも貢献することが期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate whether gene expression, which changes by ectopically expressed AID (activation induced cytidine deaminase) in colonic epithelial cells (CECs), is induced by leaked bile acids under inflammatory conditions. Here we found that AID is ectopically expressed by treatment of bile acid in colon cancer cell lines. However, the mutually altered genes between AID stable expressing cell line and CECs from mice under inflammatory conditions could not be identified. Therefore, we next focused on gene expression profiles comparing wild type mice and AID deficient mice. Interestingly, we revealed that loss of AID in CECs from mice under inflammatory conditions is associated with altered gene expression, including the extracellular matrix-associated molecules.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：炎症性腸疾患 胆汁酸 異所性発現 活性化誘導シチジンデアミナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病患者において、胆汁酸吸収不良による腸肝循環がうまくいかず、胆汁酸が回盲部や結腸へ流れ込むことがよく知られているが、病態形成にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。これまで、①食事由来の脂肪によって誘導された胆汁酸(タウロコール酸)が、腸内細菌叢を変化させ大腸炎を悪化すること (Devkota S et al, *Nature* 2012)、②扁平上皮がん細胞株へ胆汁酸処理をすると、異所性に AID の発現が誘導されること (Morita S et al, *Carcinogenesis* 2011)、③Activation-induced cytidine deaminase (AID)は、通常B細胞にのみ発現し、免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異やクラススイッチに重要なだけでなく (Maul RW et al, *Adv Immunol* 2010)、DNA の脱メチル化酵素として働くことが報告されている (Bhutani et al, *Nature* 2010, Popp C et al, *Nature* 2010)。このような背景より、大腸炎によって胆汁酸が大腸に流出することで AID の異所性発現が誘導され、腸管上皮細胞の遺伝子発現が変化し、粘膜のバリア機構の破綻を招いている可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず①正常患者由来の大腸上皮細胞を用いて胆汁酸処理を行い、AID の異所性発現が誘導されるのか明らかにする。そして、②AID の発現が誘導された細胞にどのような影響を与えているのか明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 胆汁酸による AID の発現誘導の検討

外科手術により摘出された大腸組織より大腸クリプトのみを精製し、そのヒト臨床サンプル由来の大腸クリプトに胆汁酸処理を行うことで、AID の発現が誘導されるか検討を行った。また、大腸がん細胞株を用いて同様に胆汁酸処理を行うことで、AID の発現が誘導されるか検討した。AID の発現の確認には、real-time PCR を用いて AID の mRNA の発現量を確認した。タンパク質の発現は、ウエスタンブロットによって確認を試みた。しかし、異所性発現した AID を検出できる市販の抗 AID 抗体がなかったので、抗 AID 抗体の作成を試みた。

### (2) AID 依存的に変化する遺伝子の同定

AID を過剰発現させた大腸がん細胞株を用いて、AID 依存的に発現が変化する遺伝子を同定するために、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。Mock(空ベクター)と過剰発現細胞株との間で遺伝子発現プロファイルを比較検討し、Z スコアが2以上の遺伝子を抽出した。さらに、その抽出した遺伝子と Yamane ら (*Nature Immune* 2011)によって同定されたB細胞におけるAIDの標的遺伝子を比較検討することで、候補遺伝子の絞り込みを行った。

### (3) AID 依存的に発現が変化する遺伝子の DNA メチル化解析

AID 依存的に発現が変化する遺伝子のプロモーター領域の DNA の脱メチル化を明らかにするために、Agena Bioscienc 社の EpiTYPER DNA メチル化解析を用いて検討を行った。

Mock と AID を過剰発現させた細胞株から抽出・精製したゲノム DNA を用いて、プロメガ社の EZ DNA Methylation キットを使用してバイサルファイト処理を行った。AID 過剰発現細胞において優位に発現が変化した遺伝子のプロモーター領域を、バイサルファイト処理済み DNA を鋳型として用いて PCR を行い増幅した。その PCR 産物が一本バンドかどうか電気泳動にて確認を行い、質量分析にて解析を行うことでプロモーター領域のメチル化レベルを定量した。PCR の鋳型として用いた DNA は、バイサルファイト処理を行うことで、非メチル化シトシンはウラシル(チミン)に変換される一方で、メチル化シトシンはそのまま保持される特徴を利用し、その変化を質量分析で定量することでメチル化を検証した。

### (4) 大腸炎誘導マウスにおいて AID 依存的に変化する遺伝子の同定

in vitro の実験系で同定した遺伝子が、大腸炎を誘導したマウスの大腸上皮細胞で、AID 特異的に発現が変化するかどうか確認を行った。AID を発現すると mTOMATO から mGFP に変化するフェイトマッピングダブルレポーターマウスを用いて、大腸炎誘導後の大腸上皮細胞において、AID の発現が誘導されていることをあらかじめ確認している。そこで、この実験系を用いて野生型マウスと AID 欠損型マウスに 4% Dextran sulfate sodium(DSS)を4日間自由飲水させて大腸炎を誘導し、その後マウスの大腸クリプトを精製した。その精製した大腸クリプトから DNA および total RNA の精製を行い、in vitro の実験系で同定した遺伝子の発現が AID 依存的に変化しているか確認を行った。遺伝子の発現の確認には、精製した totalRNA を逆転写して cDNA を合成後、Real-time qPCR を用いて mRNA の発現を確認した。また、大腸炎を誘導した野生型マウスおよび AID 欠損マウスより精製した totalRNA を用いて、網羅的発現解析を行うことで AID 依存的に発現が変化する遺伝子の同定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 胆汁酸による AID の発現誘導の検討

ヒト大腸組織より大腸クリプトを精製後、胆汁酸刺激を行ったが、他の増殖因子などの刺激なしでは、すぐにアポトーシスを起こすため胆汁酸だけの影響を評価することが困難だった。そこで次に、ヒト大腸由来の培養細胞を用いて胆汁酸処理を 24 時間行ったところ、ごく僅かであるが AID の発現が誘導される可能性が示唆された。胆汁酸により発現が誘導された AID のタンパク質の発現をウェスタンブロットで確認したが、検出することはできなかった。そこで、微量に発現する AID を検出するために抗ヒト抗 AID 抗体を作成し、同様にタンパク質の検出を試

みたが検出可能な抗体を作成することはできなかった。

## **(2) AID 依存的に変化する遺伝子の同定**

胆汁酸によって AID の mRNA の発現が誘導される可能性が示唆されたが、タンパク質の発現は検出できなかった。そこで、AID を発現しない大腸由来の培養細胞を用いて AID を安定発現させた細胞を作成し、マイクロアレイ発現解析を行った。その結果、Mock と AID 安定発現株の間で遺伝子発現プロファイルを比較検討したところ、Z スコアが 2 以上の遺伝子を 619 個単離することができた。次に、単離した 619 遺伝子と Yamane ら (Nat Immuno 2011) によって同定された、B 細胞における AID の標的遺伝子を比較検討したところ、33 遺伝子を単離することができた。そこで、実際に単離した遺伝子の発現が変化しているか qPCR で確認したところ、AID 過剰発現細胞株にて 2 倍以上に発現量が変化している 16 遺伝子を同定した。

## **(3) AID 依存的に発現が変化する遺伝子の DNA メチル化解析**

AID 依存的に発現が変化する 16 遺伝子のプロモーター領域の DNA の脱メチル化を明らかにするために、Agena Bioscienc 社の EpiTYPER DNA メチル化解析を行い検討したところ、16 遺伝子中 5 つの遺伝子のプロモーター領域で AID 依存的に脱メチル化されている可能性が示唆された。

## **(4) 大腸炎誘導マウスにおいて AID 依存的に変化する遺伝子の検証**

プロモーター領域の脱メチル化が認められた 5 遺伝子が、大腸炎を誘導したマウスの大腸上皮細胞で AID 特異的に発現が変化するか検討した結果、野生型と比較して AID 欠損マウスにおいて 3 遺伝子 (DNM1, NINJ2, KIF21B) の発現が減少することが認められた。しかしながら、AID の発現が誘導される野生型マウスの腸管上皮細胞では、大腸炎を誘導する前と後で、3 つの候補遺伝子の優位な発現増強は認められなかった。そこで、大腸炎を誘導した野生型マウスおよび AID 欠損マウスより精製した total RNA を用いて、網羅的発現解析を行うことで AID 依存的に発現が変化する遺伝子の探索を行った。その結果、興味深いことに培養細胞の実験系で単離した遺伝子はほとんど含まれておらず、細胞外マトリックス (ECM) 関連分子の発現が変化している可能性が示唆された。今後は、炎症条件下において発現が誘導される AID が、どのようにこれらの ECM 関連分子の発現を調節しているか明らかにするために、さらに解析を進めていく必要がある。