

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07801

研究課題名(和文)非コードRNAによる腸管上皮機能と腸内共生系の制御

研究課題名(英文) Regulation of epithelial function and symbiotic system in the intestine by non-coding RNA

研究代表者

高橋 恭子 (TAKAHASHI, Kyoko)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70366574

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)：非コードRNAによる腸管上皮機能と腸内共生系の制御機構の解明を目的とした。まず、腸内細菌により発現が誘導されるマイクロRNAを介した腸管上皮機能調節の分子機構を明らかにした。また、圧倒的多数の腸内細菌が生息する大腸の上皮細胞で顕著に発現が高いマイクロRNAにより制御される分子を特定した。さらに、菌体認識受容体遺伝子のDNAメチル化の誘導に関わる分子を同定した。これらの結果は、腸内細菌叢の乱れに起因する腸管上皮透過性の亢進、腸管炎症の制御のための新たな標的の確立につながる事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管には莫大な数の腸内細菌が共生する。腸内共生系の恒常性維持は、宿主の健康の維持・増進に不可欠であり、腸内細菌叢の乱れと様々な疾患との関連が数多く報告されている。非コードRNAの腸管上皮機能および腸内共生系における役割に関する本研究の結果は、腸内共生系の恒常性破綻が関与する様々な疾患の予防・症状緩和のための新しいターゲットやバイオマーカーの確立への応用が期待される。特に、腸管に到達して腸管上皮細胞に直接作用する食品を利用した腸管上皮機能、腸内共生系の制御の新たな評価方法・指標の確立につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand the mechanisms underlying the regulation of epithelial function and symbiosis with the microbiota in the intestine. First, molecular mechanisms for the control of intestinal epithelial cells through miRNA which was induced by gut microbiota were elucidated. Next, proteins regulated by miRNA which was expressed much more abundantly in epithelial cells of the colon than in those of the small intestine were identified. In addition, a molecule involved in inducing DNA methylation of the gene encoding a pattern recognition receptor in colonic epithelial cells was identified. These results could be applied to establish targets for prevention of increase in epithelial permeability and inflammation in the intestine.

研究分野：腸管免疫

キーワード：非コードRNA 腸管上皮細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品を消化・吸収する腸管には、莫大な数の多種多様な共生細菌が生息し、腸内細菌叢を形成している。一方、腸管には生体で最大の免疫系が存在し、口、食道を経て外界から侵入してくる病原菌の感染から宿主を守っている。腸内細菌も免疫学的には非自己すなわち攻撃対象となる異物でありながら、この免疫系に排除されてしまうことなく“共生”している。最近では、腸内細菌叢の構成やその乱れと、アレルギー、炎症性腸疾患、感染症、大腸がん、肥満、自閉症などとの関連が次々と報告され、腸内細菌叢が宿主の免疫系をはじめとして、内分泌系、神経系にも作用してそれらの機能を調節するという理解のもと、急速に研究が展開されてきている。

腸管の管腔と体内とを隔てる広大な粘膜面は単層の上皮細胞で覆われており、これらの腸管上皮細胞は、管腔の環境を常に最前線でモニタリングして上皮層下に存在する免疫担当細胞に情報を伝える。免疫による異物の排除応答は炎症反応を伴うことから、管腔に生息する大量の共生細菌は潜在的に強い炎症反応を誘導するものである。しかしながら、腸管上皮細胞は共生細菌に対する応答を厳密に制御する多彩なシステムを備え、実際には健常な腸管においては過剰な炎症反応は誘導されない。腸管上皮におけるこのような制御システムは、共生を基盤とした腸管の生態系の恒常性維持、ひいては宿主の健康の維持・増進に不可欠なものである。そして、腸管に到達して腸管上皮細胞に直接作用する食品は、その最も重要な調節因子となる。

我々はこれまでに、腸内細菌が宿主腸管上皮細胞の DNA メチル化を誘導することにより、腸管上皮細胞の腸内細菌に対する応答性を制御することを見出し、腸内細菌が宿主遺伝子のエピジェネティックな変化を誘導し自身の共生を可能にするという機構が存在することを報告した。エピジェネティックな制御を媒介する機構として、DNA メチル化、ヒストン修飾に加え、非コード RNA の関わりが注目されている。非コード RNA は、アミノ酸配列情報を持たない RNA であり、このような RNA が細胞内で活発に転写され、様々な生理機能を発揮することが明らかにされてきている。非コード RNA のうち機能がよく知られているものが、18-25 塩基程度の短鎖 RNA であるマイクロ RNA(miRNA)である。miRNA は、通常、標的 mRNA の 3'非翻訳領域に相補的に結合し、mRNA からタンパク質への翻訳抑制、あるいは標的 mRNA の分解を引き起こすことにより、遺伝子発現を負に制御する。近年、これらの miRNA の様々な疾患に対する創薬の標的として、あるいは診断のバイオマーカーとしての有用性が期待されている。

2. 研究の目的

非コード RNA を介した腸管上皮機能の調節と共生の成立の関係を統合的に理解することが、腸内共生系の恒常性維持機構を解明するための重要な鍵となると考えられることから、本研究では、非コード RNA による腸管上皮機能の調節、それによる共生の成立・維持の分子機構を明らかにすることを目的とした。これにより、何故腸内細菌が免疫系により排除されてしまうことなく共生できるのか、また、腸内共生系を介した健康の維持・増進の分子機構の一端を明らかにすることを目指した。

さらに、腸内共生系の恒常性の破綻が関与する疾患に対して、食を利用して新たな予防・症状緩和の方法を開発することを目指し、本研究から得られる成果を食品による腸管上皮機能、腸内共生系の制御の新たな評価方法・指標の確立につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌により発現が誘導される miRNA の解析

腸内細菌により発現が誘導される miR-21-5p に依存的であるとして同定した低分子量 GTP アーゼ ARF4 について以下の解析を行った。

miR-21-5p による ARF4 の発現誘導機構

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 に PTEN、PDCD4 の siRNA を導入し、Occludin および Claudin-4 の発現に及ぼす影響をウェスタンブロットングにより解析した。さらに、Caco-2 細胞を Akt 阻害剤 LY-294002 および JNK 阻害剤 SP600125 で処理し、ARF4 の発現に及ぼす影響をウェスタンブロットングにより解析した。

マウス腸管における ARF4 の発現分布

通常および無菌マウスより小腸および大腸を摘出し、凍結組織切片を作製した。抗 ARF4 抗体および Alexa647 標識二次抗体を用いて染色後、共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した。また、近位小腸、中位小腸、遠位小腸、結腸よりそれぞれ腸管上皮細胞を調製し、ウェスタンブロットングにより ARF4 の発現を解析した。

ARF4 を過剰発現する腸管上皮細胞株の樹立

Caco-2 から総 RNA を抽出し、逆転写を行った。得られた cDNA を鋳型として PCR により ARF4 遺伝子を増幅し、pEF1α-IRES-AcGFP1 ベクターに挿入して発現プラスミドを構築した。得られた発現プラスミドを Caco-2 細胞へ導入し、G418 を用いて薬剤選択後、セルソーターにより GFP 陽性細胞を分取した。分取した細胞を培養後、再度セルソーターにより GFP 陽性細胞を分離し限界希釈を行った。得られたクローンの ARF4 遺伝子の mRNA 発現を定量 PCR により測定し、最も発現量の高かったクローンを以降の実験に用いた。なお、cDNA を挿入していないベクターについて同様の操作を行い、対照株を樹立した。

腸管上皮透過性の測定

無処理の Caco-2 細胞と得られた ARF4 過剰発現株および対照株をそれぞれトランスウェルインサート膜上に播種し、経時的に経上皮抵抗値(TER)を測定した。

タイトジャンクションおよび細胞骨格の解析

Caco-2 細胞、ARF4 過剰発現株、対照株をそれぞれ透明トランスウェルインサート膜上に播種し、抗 ZO-1 抗体を用いた蛍光免疫染色および蛍光標識 Phalloidin を用いた F-actin の染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

ARF4 と相互作用するタンパク質の同定

Caco-2 より細胞ライセートを調製し、抗 ARF4 抗体あるいはアイソタイプコントロール抗体を用いた免疫沈降を行った。得られた沈降物を SDS-PAGE および銀染色に供し、抗 ARF4 抗体を用いた場合に特異的なバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化後、質量分析によりタンパク質の同定を行った。同定された候補分子について、それらの抗体を用いた免疫沈降物について抗 ARF4 抗体を用いてプロットすることにより ARF4 との物理的相互作用の有無を確認した。さらに、トランスウェルインサート膜上に Caco-2 細胞、ARF4 過剰発現株、対照株を播種し、ARF4 との相互作用が確認された分子に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。

マウス大腸炎モデルを用いた解析

BALB/c マウスに 3% デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)含有水を 5 日間自由摂取させ、体重および便の状態を経時的に測定した。対照群には、DSS を含まない水を同様に自由摂取させた。その後、腸管を採取して組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。また、大腸上皮細胞を調製し、細胞ライセートについて抗 ARF4 抗体および抗 Occludin 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

(2) 大腸上皮に高発現する miRNA の解析

マウス小腸上皮細胞に比べて大腸上皮細胞で顕著に発現が高いとして同定した miRNA について、その機能を明らかにするために以下の実験を行った。Caco-2 細胞にこの miRNA のアンチセンスインヒビターあるいはコントロールインヒビターを導入し、それぞれ細胞ライセートを調製した。各ライセートを二次元電気泳動後、発現量に顕著な差が観察されたスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化後に質量分析によりタンパク質を同定した。次に、同定した候補分子に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、miRNA のアンチセンスインヒビターあるいはコントロールインヒビターを導入した Caco-2 細胞における候補分子の発現を比較した。

(3) 菌体認識受容体遺伝子の DNA メチル化誘導機構の解析

Toll-like receptor 4(TLR4)遺伝子を低発現する腸管上皮細胞株 HCT116、高発現する腸管上皮細胞株 SW480 からそれぞれ核抽出物を調製し、*de novo* DNA メチル化酵素 DNMT3a および DNMT3b に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物を SDS-PAGE および銀染色に供し、HCT116 の核抽出物を用いた場合にのみ特異的に観察されたバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化後、質量分析によりタンパク質の同定を行った。次に、同定された候補分子に対する抗体を用いて ChIP アッセイを行い、HCT116 および SW480 における TLR4 遺伝子領域と候補分子の相互作用を比較した。次に、HCT116 に特異的に TLR4 遺伝子領域との相互作用が確認された分子について siRNA 導入試験を行い、TLR4 遺伝子 5'領域の DNA メチル化頻度の変化をバイサルファイト法により解析した。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌により発現が誘導される miRNA を介した腸管上皮機能の制御

我々はこれまでに腸内細菌により発現が誘導される miRNA として miR-21-5p を同定し、この miR-21-5p が低分子量 GTP アーゼ ARF4 を介してタイトジャンクションの形成を抑制し、上皮透過性を亢進させることを明らかにした。そこで、miR-21-5p による腸管上皮機能の制御機構を明らかにするために、腸管上皮における ARF4 の発現と機能について解析した。

ARF4 の発現制御機構と発現分布

まず、miR-21-5p による ARF4 の発現誘導機構を明らかにするために、miR-21-5p のターゲットとして報告されている PTEN、PDCD4 の siRNA をヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 へ導入した。その結果、ARF4 の発現が有意に上昇した。PTEN、PDCD4 はそれぞれ Akt および JNK 経路の抑制因子であることから、それらの阻害剤を Caco-2 細胞に添加したところ、ARF4 の発現の低下が認められた。したがって、miR-21-5p により PTEN、PDCD4 の発現が抑制されることにより Akt、JNK 経路が活性化され、ARF4 の発現が増大することが明らかになった。

次に、マウス腸管における ARF4 の発現分布を免疫蛍光染色およびウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、マウス腸管組織において ARF4 が絨毛上皮に発現すること、さらに、大腸上皮細胞における発現が無菌マウスでは通常マウスに比べて有意に低いことが確認された。したがって、大腸上皮における ARF4 の発現が腸内細菌により誘導されることが明らかになった。

ARF4 による上皮透過性および細胞骨格の制御

腸管上皮細胞における ARF4 の機能を解析するために、ARF4 を過剰発現する腸管上皮細胞株を樹立した。ARF4 の過剰発現株を単層培養した際には対照株と比較して TER の低下が認めら

れ、ARF4 が腸管上皮透過性を亢進させることが示された。この結果は以前に行った ARF4 の siRNA 導入試験の結果と一致するものであった。次に、単層培養した過剰発現株および対照株についてタイトジャンクション関連タンパク ZO-1 の蛍光免疫染色を行ったところ、ARF4 過剰発現株においてタイトジャンクションの形成不全が観察された。さらに、ARF4 過剰発現株では対照株と比べて F-actin の発現分布に差異が認められ、細胞骨格の変化を伴うことが明らかになった。したがって、腸管上皮細胞における ARF4 の過剰発現により、タイトジャンクションと細胞骨格の両方の制御により上皮透過性が上昇すると考えられた。

ARF4 と相互作用する分子の同定

ARF4 による腸管上皮細胞におけるタイトジャンクションおよび細胞骨格の制御機構を明らかにするため、Caco-2 の細胞ライセートを用いた免疫沈降により ARF4 と相互作用するタンパク質の同定を試みた。その結果、ARF4 と直接あるいは間接的に結合する因子として細胞骨格・細胞形態の制御に関与する 2 つのタンパク質を同定した。ARF4 過剰発現株では、同定したタンパク質の発現分布が異なり、ARF4 はこれらの分子の発現分布に影響を及ぼすことにより、細胞骨格を変化させることが示唆された。

腸炎における ARF4 の役割

マウスの DSS 誘導性大腸炎モデルを用い、腸管炎症への ARF4 の関与を解析した。大腸上皮細胞を用いた解析を行うため、その調製が困難になるような重度の腸炎が誘導されないようにマウスの系統と DSS 濃度を設定した。その結果、マウスへの DSS 投与により、体重減少は観察されなかったが、DSS 投与群において結腸・盲腸の萎縮、血便、わずかな上皮損傷が確認された。対照群と比較して DSS 投与群では、大腸上皮細胞における ARF4 の発現が上昇し、タイトジャンクションタンパク質である Occludin の発現は減少していた。これらの結果から、炎症上皮では ARF4 の発現が増加することが明らかになり、それによりタイトジャンクションの形成抑制を引き起こし、上皮透過性の亢進、炎症増悪につながる可能性が示唆された。

(2) 大腸上皮に高発現する miRNA の同定

大腸には小腸に比べて格段に多い腸内細菌が生息し、腸内細菌の 99% 以上が大腸に存在する。これまでに小腸上皮細胞に比べて大腸上皮細胞で顕著に発現が高い miRNA を同定しており、本 miRNA が腸内細菌との共生関係の維持に関わる可能性が考えられた。そこで、同定した miRNA の腸管上皮細胞における機能を明らかにするため、Caco-2 細胞においてアンチセンスインヒビターの導入により発現が変化する分子をプロテオーム解析により探索した。その結果、インヒビターの導入により発現が顕著に上昇する分子と低下する分子を 1 つずつ特定した。前者は核タンパク質、後者はシャペロンタンパク質であった。

(3) 腸管上皮細胞における菌体認識受容体遺伝子の DNA メチル化誘導機構

我々は以前に、腸管上皮細胞において腸内細菌に対する過剰応答を抑制する 1 つの機構として、菌体成分を認識する受容体 TLR4 の DNA メチル化による発現抑制を報告し、大腸上皮細胞における TLR4 遺伝子のメチル化が腸内細菌により誘導されることを示している。TLR4 遺伝子の高メチル化および低メチル化がそれぞれ確認された腸管上皮細胞株 HCT116 および SW480 について DNA メチル化酵素に対する抗体を用いた免疫沈降を行った結果、DNA メチル化酵素を TLR4 遺伝子に特異的にリクルートする候補因子として RNA 結合タンパク質を同定した。ChIP アッセイの結果、SW480 と比較して HCT116 においては本分子と TLR4 遺伝子の相互作用が有意に高いことが示された。さらに、HCT116 細胞へ同定した分子に対する siRNA を導入すると、TLR4 遺伝子 5'領域の DNA メチル化頻度の低下が認められた。これらの結果から、本分子が腸管上皮細胞において TLR4 遺伝子へ DNA メチル化酵素をリクルートすることにより DNA メチル化を誘導することが示された。

以上、本研究により非コード RNA を介した腸管上皮機能および腸内共生系の制御機構の新たな側面が明らかになり、これらの結果は、腸内細菌叢の乱れに起因する腸管上皮透過性の亢進、腸管炎症の制御のための新たな標的の確立につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, Kobayakawa T, Nakanishi Y, Tsuda M, Hosono A, Kaminogawa S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Regulation of gene expression through gut microbiota-dependent DNA methylation in colonic epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunohorizons	6. 最初と最後の頁 178-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.1900086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakata K, Sugi Y, Narabayashi H, Kobayakawa T, Nakanishi Y, Tsuda M, Hosono A, Kaminogawa S, Hanazawa S, Takahashi K.	4. 巻 292
2. 論文標題 Commensal microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through the small GTPase ARF4.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 15426-15433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M117.788596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計33件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saika Miyashita, Kazuaki Nakata, Yusuke Nakanishi, Kyoko Takahashi
2. 発表標題 FBP1 regulates the barrier function of intestinal epithelial cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田一彰、津田 真人、細野 朗、上野川 修一、高橋 恭子
2. 発表標題 腸管上皮細胞における低分子量GTPアーゼARF4の役割
3. 学会等名 日本食品免疫学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuaki Nakata, Yusuke Nakanishi, Masato Tsuda, Akira Hosono, Kyoko Takahashi
2. 発表標題 The role of small GTPase ARF4 in intestinal epithelial cells
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 恭子
2. 発表標題 腸内細菌によるmiRNAを介した腸管上皮透過性調節とその機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋恭子
2. 発表標題 腸管上皮細胞の菌体成分に対する応答性の調節
3. 学会等名 第26回内毒素・LPS研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 檜林ひかり、添田讓、倉岡克弥、中田一彰、中西祐輔、花澤重正、高橋恭子
2. 発表標題 腸管上皮細胞におけるTLR4遺伝子のDNAメチル化誘導機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	細野 朗 (HOSONO Akira) (70328706)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	