

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K08631
研究課題名(和文)大腸の恒常性維持におけるマグネシウムの役割の解明

研究課題名(英文)The role of magnesium in intestinal homeostasis

研究代表者
山崎 大輔(Yamazaki, Daisuke)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：50422415
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CNNM4は大腸に強く発現するMg²⁺トランスポーターである。Cnnm4遺伝子破壊マウスの大腸上皮の表現型を解析したところ、CNNM4を欠損すると大腸上皮細胞の増殖性および幹細胞性が増加し腸での発がんが促進されることがわかった。CNNM4を欠損した大腸上皮細胞では、Ca²⁺チャネルTRPVの機能が低下しEGFRシグナルの亢進がみられた。CNNM4は大腸上皮細胞において細胞外にMg²⁺を排出し細胞内のMg²⁺濃度を一定に保つことで、EGFRシグナルの過剰な活性化による細胞増殖の亢進を抑えていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mg²⁺トランスポーターCNNM4の遺伝子破壊マウスを用いた解析から、細胞内Mg²⁺を適切な濃度に保つことが大腸上皮細胞の正常な細胞分化につながることで過剰な増殖を抑制することに必要であることがわかった。これは腸上皮細胞において細胞内Mg²⁺の量を制御することがもつ生理的な役割を明らかにしたはじめての事例である。またCNNM4を欠損した大腸上皮細胞ではTRPV1を介した細胞内へのCa²⁺流入が抑制されていたが、CNNM4を欠損した精子でも同様の現象がみられることから、Mg²⁺とCa²⁺の機能的相互作用は広く保存されている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：CNNM4 is a Mg²⁺ transporter highly expressed in the colon epithelia. I showed that Cnnm4 deficiency promotes cell proliferation and partly suppresses cell differentiation in the colon epithelia, making them vulnerable to cancer development. Ca²⁺-imaging analyses reveal that Ca²⁺ influx stimulated by capsaicin, which is dependent on TRPV1, is greatly impaired by Cnnm4 deficiency. Moreover, EGF receptor signaling is constitutively activated in the colon epithelia of Cnnm4-deficient mice, as is the case with Trpv1-deficient mice. The administration of gefitinib, an inhibitor of EGF receptor, cancels the augmented proliferation of cells observed in Cnnm4-deficient mice. Collectively, these results establish the functional interplay between Mg²⁺ and Ca²⁺ in the colon epithelia, which is crucial for maintaining the dynamic homeostasis of the epithelial tissue.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) マグネシウムの摂取量と炎症性腸疾患や大腸がんの発症リスクが逆相関することが疫学研究で示されており、腸管の恒常性維持におけるマグネシウムの重要性が示唆されるが、その作用機序は不明である。

(2) 申請者は腸でのマグネシウム吸収に必要な分子 CNNM4 のノックアウトマウスが、大腸炎の増悪や炎症性発がんの促進を示すことを見出した。腸管上皮細胞の異常や腸内細菌叢の変動はいずれも腸管での炎症や発がんに結びつくことが知られているが、このマウスでは腸管上皮細胞の増殖が亢進しているほか、腸内細菌叢の中で *Lactobacillus* が占める割合が顕著に低下していた。CNNM4 は腸管上皮細胞や腸内細菌叢を制御することで腸管の恒常性を保つのに寄与している可能性がある。

2. 研究の目的

Cnnm4 KO マウスの大腸組織や単離した腸管上皮組織からの三次元組織構造体(オルガノイド)培養を利用して、大腸における CNNM4 の働きを個体および細胞レベルにおいて解析することで、CNNM4 が腸管上皮細胞の増殖を制御する分子機序を明らかにする。またその制御に関与するシグナル伝達経路が大腸での炎症や発がんに与える影響を検討し、CNNM4 による腸管上皮細胞増殖制御機構の重要性を示す。これらの解析を通して、「腸管の恒常性維持」における「マグネシウム」の役割を分子レベルで理解することが目的である。

3. 研究の方法

(1) *Cnnm4* KO マウスの大腸陰窩構造底部では Ki67 陽性細胞の数が増加していたことから、腸管上皮幹細胞の増殖や分化に異常が生じている可能性が高い。そこで *Cnnm4* KO マウス大腸における腸管上皮細胞の分化を調べるため、腸管組織中の腸管上皮幹細胞、幹細胞のニッチとして機能する Reg4 陽性 deep crypt secretory (DCS) 細胞、そして腸管上皮を構成する主要な分化細胞(吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞)の数を計測する。腸管上皮幹細胞および DCS 細胞を同定するため、それぞれのマーカー遺伝子である *Lgr5*, *Olfm4* や *Reg4* の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検出する。内分泌細胞は、Chromogranin A を免疫染色することで同定する。吸収上皮細胞は Alkaline phosphatase 活性の検出で、杯細胞は Alcian blue/PAS 染色により同定する。また *Cnnm4* KO マウスでは細胞増殖が亢進しているが陰窩構造自体の大きさに違いがないことから、細胞のターンオーバーに変化が生じている可能性がある。そこで BrdU による標識実験により細胞の移動速度を、TUNEL 染色によりアポトーシスを検討し、*Cnnm4* KO マウス腸管上皮の動的平衡の実態を調べる。

(2) Wnt-3a を含む複数の増殖因子を含む培地中で大腸陰窩を三次元培養すると、腸管上皮幹細胞が自己複製することによってオルガノイドを形成する。オルガノイド培養系では腸管上皮幹細胞を *in vitro* で継続的に培養できるほか、培地より Wnt-3a を除去することで幹細胞が分化する様子を観察することができる。そこで *Cnnm4* KO オルガノイドの成長速度や Ki67 陽性細胞の計測から腸管上皮幹細胞の増殖速度を検討する。また分化を誘導させた後、以下の方法で腸管上皮幹細胞の分化能を評価する。オルガノイドにおける吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞の存在を確認するため、各種分化細胞のマーカー分子の発現をホルマウント免疫染色および定量的 PCR 法にて検討する。マーカーとして Villin (吸収上皮細胞)、Mucin2 (杯細胞)、Chromogranin A (内分泌細胞)を用いる。さらにはオルガノイド形成効率を測定することにより大腸陰窩に含まれる幹細胞機能をもつ細胞の数を調べる。またマイクロアレイ法を用いて両者の遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、違いを生み出す分子機序を推定するための手がかりを掴む。

4. 研究成果

(1) Mg^{2+} トランスポーターとして働く CNNM4 が腸管上皮の恒常性を制御する仕組みを明らかにするため、CNNM4 欠損マウスの大腸よりクリプトを回収し、*in vitro* での三次元培養を行った。回収したクリプトの大きさを比較したところ、CNNM4 欠損マウスのクリプトは野生型マウスのものより小さかった。回収前の腸管組織ではクリプトの大きさに違いが見られないことから、CNNM4 欠損マウスのクリプトは回収時の衝撃により崩れて小さくなったと考えられ、組織構造に何らかの変化が生じていることが示唆される。野生型マウスより回収したクリプトをマトリゲルの中に包埋すると、開いていた一端が次第に閉じて 4 時間後には球状のスフェロイドとなった。しかし CNNM4 欠損マウスのクリプトの場合は、マトリゲルに包埋してから 1 時間後には多くのクリプトがすでにスフェロイド構造をとっていた。これらの培養を続けたところ、CNNM4 欠損マウス由来のスフェロイドは、野生型マウス由来のそれと比較して有意に成長する速度が大きかった。また同数のクリプトを播種した場合、CNNM4 欠損マウス由来の

クリプトからは野生型マウス由来のそれと比較してより多くのスフェロイドが形成された。これらの結果から、CNNM4 欠損マウス由来のクリプトにはスフェロイドを形成する能力を有する増殖性の未分化な細胞が多く含まれている可能性が考えられた。そこでクリプトをトリプシン処理することにより単一の細胞へと分離させ、個々の細胞がもつスフェロイドを形成する能力を調べたところ、CNNM4 欠損マウスのクリプト野生型マウスのそれと比較してより多くのスフェロイドを形成する能力をもつ細胞が含まれていることがわかった。以上の結果から CNNM4 は腸管上皮における多分化能を有する細胞の数を制御している可能性が示唆された。

(2) CNNM4 を欠損した腸管上皮細胞では細胞外への Mg^{2+} 排出が抑えられるため、細胞内の Mg^{2+} 濃度が上昇していた。大腸の腸管上皮細胞では Ca^{2+} チャネル TRPV1 により細胞の増殖が負に制御されていること、また細胞内 Mg^{2+} 濃度の増加により TRPV1 の活性が低下することが報告されていたので、CNNM4 が細胞内 Mg^{2+} 量の調節を介して TRPV1 の活性を制御している可能性が考えられた。そこで CNNM4 欠損腸管上皮細胞において TRPV1 の活性を調べたところ、野生型細胞と比較して有意に低下していたことから、CNNM4 が腸管上皮細胞における TRPV1 の活性に必要であることがわかった。TRPV1 は EGF シグナルを抑制することで過剰な細胞の増殖を抑えているが、CNNM4 欠損腸管上皮細胞では細胞増殖における EGF の要求性が低下しており、培地中に含まれる血清の量を減らした場合でも野生型細胞と比較してより多くの細胞が増殖を維持していた。これらの結果から CNNM4 は TRPV1 を介して EGFR シグナルを負に調節することで、腸管上皮における過剰な細胞の増殖を妨げていると考えられる。実際、*Cnnm4* の遺伝子欠損マウスに対して EGFR シグナルの阻害剤である gefitinib を投与したところ、腸管上皮における増殖細胞の数が有意に低下した。また、AOM/DSS 投与時に *Cnnm4* 遺伝子欠損マウスで見られた大腸での腫瘍形成の促進は、gefitinib 投与により抑制された。

(3) CNNM4 の遺伝子を欠損したマウスでは、AOM/DSS の投与による大腸での炎症関連発がんが促進されるが、それらのマウスに形成された腫瘍では筋層への浸潤もまた亢進していた。別の腸発がんモデル *Apc* 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいても、CNNM4 遺伝子の欠損はがんの浸潤を促進したことから、CNNM4 には大腸がんの悪性を抑制する働きがあると考えられた。そこで、CNNM4 遺伝子を欠損した *Apc* 遺伝子ヘテロ欠損マウスにできた腫瘍の解析を行った。このマウスにできた腫瘍の薄切切片を作製し、腸に存在する分化細胞のマーカー分子の発現を調べたところ、浸潤先端ではパネート細胞のマーカーである Lysozyme を発現している細胞が集積していることがわかった。この細胞は別の分化細胞である杯細胞を染色する色素アルシアンブルーでも同時に染色されたことから、正常組織には存在しない分泌系の前駆細胞であると考えられた。これらとは異なる分泌系細胞である内分泌細胞のマーカーである chromograninA や吸収上皮細胞のマーカーのアルカリフォスファターゼは、浸潤先端には存在しなかったことから、未分化ながん細胞が分泌系前駆細胞へ特異的に分化することで、大腸がんの浸潤を促進する可能性が考えられる。一方、遺伝子欠損マウスおよびオルガノイド培養系を用いた解析から、CNNM4 の欠損が正常な腸管上皮細胞の分化を妨げることがわかった。

(4) パネート細胞のマーカー Lysozyme を発現している細胞の挙動が CNNM4 遺伝子の欠損によるものなのか、あるいは悪性化した腫瘍では一般的にみられるものなのかを検討するため、大腸がんモデルマウスの改良を行った。*Apc* 遺伝子ヘテロ欠損マウスでは腫瘍が悪性化する前に死亡してしまうので、マウスの遺伝的背景を変更することで寿命を延長し、時間経過とともに悪性化した腫瘍を観察することができるマウスを作出した。このマウスでは 8-9 ヶ月齢で一部の腫瘍が悪性化し周囲組織へと浸潤する様子が観察された。そこで同じマウスの中に形成された腫瘍を比較したところ、浸潤性の腫瘍では非浸潤性の腫瘍と比較して Lysozyme 発現細胞の数が多く、それらは浸潤部位に集まっている様子が観察された。このことから Lysozyme 発現細胞の出現は、時間経過に伴い悪性化する腫瘍で一般的にみられる現象であることがわかった。重要なことに、腫瘍から回収した細胞をオルガノイド培養したところ、Lysozyme 発現細胞が他のがん細胞が形成するオルガノイドから離脱して周囲に散らばっている様子が観察された。これらの結果から、Lysozyme 発現細胞は浸潤性であり、転移を引き起こす可能性があることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osamu Hashizume , Yosuke Funato , Daisuke Yamazaki, Hiroaki Miki	4. 巻 -
2. 論文標題 Excessive Mg ²⁺ Impairs Intestinal Homeostasis by Enhanced Production of Adenosine Triphosphate and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxid Redox Signal .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2019.7951.	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 -
1. 著者名 Yamazaki D, Hasegawa A, Funato Y, Tran HN, Mori MX, Mori Y, Sato T, Miki H	4. 巻 -
2. 論文標題 Cnm4 deficiency suppresses Ca ²⁺ signaling and promotes cell proliferation in the colon epithelia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0682-0.	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 -
1. 著者名 Funato Yosuke, Yoshida Atsushi, Hirata Yusuke, Hashizume Osamu, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 55
2. 論文標題 The Oncogenic PRL Protein Causes Acid Addiction of Cells by Stimulating Lysosomal Exocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2020.08.009	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Yamazaki Daisuke, Hashizume Osamu, Taniguchi Shiho, Funato Yosuke, Miki Hiroaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of adenomatous polyposis coli in proliferation and differentiation of colon epithelial cells in organoid culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83590-6	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎大輔、長谷川綾郁、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 CNNM4は腸管上皮において細胞の増殖と分化を制御する
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎大輔、長谷川綾郁、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 Mg ²⁺ トランスポーターCNNM4は 大腸での発がんを抑制する
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎大輔、長谷川綾郁、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 Mg ²⁺ + トランスポーターCNNM4は大腸での発がんを抑制する
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎大輔、橋爪修、谷口詩保、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 オルガノイド培養を用いた大腸上皮細胞の増殖および分化におけるAPCの役割の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山崎大輔、三木裕明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 276
3. 書名 レドックス疾患学	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------