

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05475

研究課題名(和文) 大腸粘液層の形成における転写抑制因子Bach1の機能解明と大腸がん予防への展開

研究課題名(英文) Involvement of transcription repressor Bach1 in colonic mucous secretion

研究代表者

東村 泰希 (Higashimura, Yasuki)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：70628924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸粘液層の脆弱化は大腸がん発症に関与することから、粘液層を強固に保つことが大腸がん予防において肝要である。しかし、大腸における粘液分泌機構に関しては未だ不明な点が多く、粘液分泌を起点とした大腸がん予防確立における問題点となっている。申請者は本課題において、転写抑制因子であるBach1が大腸粘液の産生に関わることを見出した。遺伝子改変マウスを用いた結果より、Bach1欠損に伴い、大腸におけるゴブレット細胞の増加が観察された。また、その作用機序としては、部分的ではあるが、Notchシグナルの下流に位置するHes1-Math1経路が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における大腸がん罹患者は増加の一途を辿っている。また、大腸がんの発症には、大腸粘液層の脆弱化が深く関与する。本研究では、転写抑制因子であるBach1が大腸粘液の産生に関わることを新たに判明した。従って、Bach1は大腸がん予防における新たな分子標的となる可能性が示唆された。また、大腸粘液層の脆弱化に伴う腸管炎症は、大腸がん以外にも、糖尿病など多くの疾患発症と密接に関与している。そのため、上述の研究成果は多くの疾病の予防や進行抑制に対して大きな波及効果をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The maintenance of the colonic mucus layer is involved in the development of colorectal cancer. Thus, maintaining a strong mucus layer is essential for the prevention of colorectal cancer. However, the mechanism of mucus secretion in the large intestine is still unclear. In this study, we reveal that BTB domain and CNC homolog 1 (Bach1), a transcriptional repressor, is involved in the production of colonic mucus. The results using Bach1-deficient mice showed that the number of goblet cells in the colon increased in Bach1-deficient mice, compared with that of wild type mice. In addition, the Hes1-Math1 pathway, which is located downstream of Notch signaling, may be partially involved in the enhanced mucus production associated with Bach1 deficiency.

研究分野：食品生化学

キーワード：ゴブレット細胞 ムチン 大腸がん 炎症性腸疾患 糖鎖 Bach1 リンパ球 インターロイキン-13

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸がん罹患者は増加の一途を辿っている。大腸管腔内はゴブレット細胞から分泌されたムチンを主成分とする粘液で覆われており、この粘液層の脆弱化が大腸がん発症に関与する。一方、大腸がん罹患者が急増する背景には、食習慣の変化が大きな要因として挙げられる。中でも加工肉の過剰摂取は大腸がんリスクとされており、事実、加工肉に多く含まれる食品乳化剤の摂取は大腸粘液層を破壊し、結果として大腸がんを誘発することが明らかとなっている。即ち、大腸粘液層を強固に保つことが大腸がん予防における鍵であり、食品因子によるゴブレット細胞の活性化が新たな着眼点になると申請者は考えている。ある種の難消化性多糖には粘液分泌を促進する作用が報告されているが、多くは小腸からの粘液分泌を対象とした研究であり、大腸における粘液分泌に特化した食品科学的研究はこれまでに施行されていない。その背景には、小腸に比べ大腸における粘液分泌機構に関しては未だ不明な点が多く、食品因子を用いた大腸粘液分泌の活性化を達成するうえでの問題点となっている。その解決策として申請者は、大腸における杯細胞の分化や増殖、粘液分泌における分子機序を明らかにすることを立案する。即ち、本課題により明らかとなる分子機序は、粘液分泌の活性化を起点とした大腸がん予防における新たな分子標的となる。

これまでの研究において申請者は、ヘムオキシゲナーゼ-1 など抗酸化酵素群の発現制御に関わる転写抑制因子である BTB domain and CNC homolog 1 (Bach1) に着目した研究を進めており、Bach1 欠損マウスの大腸では粘液産生が亢進することを見出している。つまり、Bach1 の発現制御は粘液分泌に着目した大腸がん予防における新たな分子標的となることが強く示唆される。しかしながら、Bach1 が大腸粘液分泌機構に及ぼす詳細な分子機序ならびに大腸発がん過程への影響に関しては明らかでない。

### 2. 研究の目的

大腸での粘液分泌機構における Bach1 の機能を詳らかにし、Bach1 を粘液分泌の活性化を起点とした大腸がん予防における新たな分子標的として位置づけることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、Bach1 欠損マウスを用いた *in vivo* 試験ならびに、株化細胞や初代培養系を用いた *in vitro* 試験を施行し、Bach1 欠損に伴う大腸粘液の産生亢進に関する作用機序の解明を目指した。株化細胞としては、粘液産生能を有するヒト大腸がん細胞株である LS174T 細胞およびヒト白血病 T 細胞由来細胞株である Jurkat 細胞を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) Bach1 欠損に伴うゴブレット細胞の増殖促進について

Bach1 欠損に伴う粘液産生の亢進が大腸特異的な現象であるかを検証するため、Bach1 欠損マウスより小腸および大腸を摘出し、PAS 染色法による粘液分泌細胞数の評価をおこなった。その結果、小腸下部から大腸にかけて、Bach1 欠損に伴う粘液分泌の亢進が観察され、その現象は大腸において特に顕著であった。得られた染色像を解析した結果、粘液産生を担うゴブレット細胞の数が有意に増加するのみならず、一細胞あたりにおける粘液を内包した分泌顆粒の面積が増大していた。

腸管組織において、腸上皮細胞やゴブレット細胞などは全て同一の腸幹細胞から分化・成熟する。この腸幹細胞からゴブレット細胞への分化過程においては Notch 経路が関与している。具体的には、Notch 経路が阻害されることで、下流に位置する転写抑制因子である Hes-1 の下方制御が生じ、さらにその下流に存在する Math1 の発現上昇へとつながる。その結果、Math1 がマスターレギュレーターとして機能し、腸幹細胞からゴブレット細胞への分化が達成される。従って、Bach1 欠損マウスの大腸粘膜を用いて、これら関連因子の遺伝子発現レベルを定量的 PCR 法により解析した。その結果、Bach1 欠損に伴い、Hes1 発現の低下ならびに Math1 発現の上昇が観察された。一方で、Hes1-Math1 経路の上流に位置する Notch1 の発現に関して変化は観察されなかった。以上の結果より、限定的にはあるが、Bach1 は Hes1-Math1 経路の制御に関与する可能性が示唆された。

#### (2) ゴブレット細胞の増殖促進における IL-13 の関与

Bach1 に対する抗体を用いた免疫組織染色の結果、大腸における Bach1 の発現局在はゴブレット細胞を含む上皮組織ではなく、粘膜固有層以下の領域に点在しており、リンパ球などの免疫担当細胞における Bach1 欠損が粘液分泌には重要であることが推測された。実際に、Bach1 欠損マウスの脾細胞からは、ゴブレット細胞の増殖に関与するサイトカインである IL-13 の産生

が亢進していた。従って、IL-13 の発現が Bach1 により制御されている可能性について、ヒト白血球 T 細胞由来細胞株である Jurkat 細胞を用いた *in vitro* 試験による評価した。Bach1 遺伝子に対する siRNA を用いたノックダウン実験を施行した結果、Bach1 のノックダウンに伴う IL-13 の発現変動は観察されなかった。

腸管免疫機構における主な IL-13 産生細胞としては、2 型ヘルパー T 細胞および 2 型自然リンパ球が知られている。従って、野生型マウスおよび Bach1 欠損マウスから抽出した腸間膜リンパ節および大腸粘膜固有層より免疫細胞を単離し、上述の IL-13 産生細胞の存在量についてフローサイトメーターを用いて評価した。その結果、腸間膜リンパ節および大腸粘膜固有層ともに、Bach1 欠損に伴う有意な変化は観察されなかった。以上の *in vitro* および *in vivo* 試験の結果より、Bach1 欠損に伴うゴブレット細胞増加に関して IL-13 は関与しないと考えられる。

### (3) 大腸ムチンの性状に及ぼす Bach1 の影響について

粘液層の主成分はムチンをコアとした糖タンパク質であり、大腸における主なコアタンパク質は MUC2 である。ゴブレット細胞内で合成された MUC2 は糖鎖修飾や分子間ジスルフィド結合などを経て、分泌小胞内において高密度にパッケージングされる。その後、細胞外に分泌され、三次元の網目構造を形成することで物理的なバリア層を形成する。Bach1 欠損マウスの大腸組織では粘液産生が亢進していることから、糞便中のムチン含量も増加していることが推測される。従って、野生型および Bach1 欠損マウスより糞便を回収し、便中ムチン含量を測定した。その結果、予想とは反して、Bach1 欠損マウスの便中ムチン含量は野生型マウスと同程度であった。このことは、Bach1 欠損マウスの大腸組織は、Bach1 欠損に伴うゴブレット細胞数の増加、Bach1 欠損に伴う粘液分泌経路の異常、という 2 つの事象が同時に発生している可能性が示唆された。今後は、糖鎖修飾等に着目した大腸ムチンの質的变化、そして分泌経路への変化を解析する必要があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12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<br>Higashimura Yasuki, Tanaka Yumiko, Takagi Tomohisa, Uchiyama Kazuhiko, Mizushima Katsura, Niki Etsuo, Naito Yuji   | 4. 巻<br>529             |
| 2. 論文標題<br>Trans-unsaturated fatty acid activates NLRP3 inflammasome in macrophages and exacerbates intestinal inflammation in mice  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>243 ~ 250 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2020.06.005   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Takagi Tomohisa, Naito Yuji, Higashimura Yasuki, Uchiyama Kazuhiko, Okayama Tetsuya, Mizushima Katsura, Katada Kazuhiro, Kamada Kazuhiro, Ishikawa Takeshi, Itoh Yoshito   | 4. 巻<br>107             |
| 2. 論文標題<br>Rectal administration of carbon monoxide inhibits the development of intestinal inflammation and promotes intestinal wound healing via the activation of the Rho-kinase pathway in rats   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Nitric Oxide   | 6. 最初と最後の頁<br>19 ~ 30   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.niox.2020.12.006   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Uchiyama Kazuhiko, Naito Yuji, Yagi Nobuaki, Mizushima Katsura, Higashimura Yasuki, Hirai Yasuko, Dohi Osamu, Okayama Tetsuya, Yoshida Naohisa, Katada Kazuhiro, Kamada Kazuhiro, Ishikawa Takeshi, Takagi Tomohisa, Konishi Hideyuki, Kuriu Yoshiaki, Nakanishi Masayoshi, Otsuji Eigo, Honda Akira, Itoh Yoshito | 4. 巻<br>-               |
| 2. 論文標題<br>Identification of colorectal neoplasia by using serum bile acid profile   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Biomarkers   | 6. 最初と最後の頁<br>1 ~ 6     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/1354750X.2021.1917663  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Ushiroda Chihiro, Naito Yuji, Takagi Tomohisa, Uchiyama Kazuhiko, Mizushima Katsura, Higashimura Yasuki, Yasukawa Zenta, Okubo Tsutomu, Inoue Ryo, Honda Akira, Matsuzaki Yasushi, Itoh Yoshito  | 4. 巻<br>65              |
| 2. 論文標題<br>Green tea polyphenol (epigallocatechin-3-gallate) improves gut dysbiosis and serum bile acids dysregulation in high-fat diet-fed mice   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition   | 6. 最初と最後の頁<br>34 ~ 46   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3164/jcbrn.18-116   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Higashimura Yasuki, Takagi Tomohisa, Naito Yuji, Uchiyama Kazuhiko, Mizushima Katsura, Tanaka Makoto, Hamaguchi Masahide, Itoh Yoshito | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Zinc Deficiency Activates the IL-23/Th17 Axis to Aggravate Experimental Colitis in Mice   | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Crohn's and Colitis   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/ecco-jcc/jjz193  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nishida Saki, Horinouchi Ayumu, Higashimura Yasuki, Akahori Reina, Matsumoto Kenji  | 4. 巻<br>43              |
| 2. 論文標題<br>Cholestyramine, a Bile Acid Sequestrant, Increases Cecal Short Chain Fatty Acids and Intestinal Immunoglobulin A in Mice | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Biological and Pharmaceutical Bulletin  | 6. 最初と最後の頁<br>565 ~ 568 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1248/bpb.b19-00923   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Suyama Y, Handa O, Naito Y, Takayama S, Mukai R, Ushiroda C, Majima A, Yasuda-Onozawa Y, Higashimura Y, Fukui A, Dohi O, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Itoh Y. | 4. 巻<br>498             |
| 2. 論文標題<br>Mucus reduction promotes acetyl salicylic acid-induced small intestinal mucosal injury in rats   | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>228 ~ 233 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2018.02.202  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Uchiyama K, Naito Y, Yagi N, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, Dohi O, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Nonaka D, Asada K, Lee LJ, Tanaka K, Kuriu Y, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y. | 4. 巻<br>53                |
| 2. 論文標題<br>Selected reaction monitoring for colorectal cancer diagnosis using a set of five serum peptides identified by BLOTCHIP?-MS analysis   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Gastroenterology  | 6. 最初と最後の頁<br>1179 ~ 1185 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00535-018-1448-0  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuzaki C, Takagaki C, Higashimura Y, Nakashima Y, Hosomi K, Kunisawa J, Yamamoto K, Hisa K.  | 4. 巻<br>82                |
| 2. 論文標題<br>Immunostimulatory effect on dendritic cells of the adjuvant-active exopolysaccharide from <i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain NTM048 | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>1647 ~ 1651 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/09168451.2018.1482195   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hotta Y, Uchiyama K, Takagi T, Kashiwagi S, Nakano T, Mukai R, Toyokawa Y, Yasuda T, Ueda T, Suyama Y, Murakami T, Tanaka M, Majima A, Doi T, Hirai Y, Mizushima K, Morita M, Higashimura Y, Inoue K, Fukui A, Okayama T, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Naito Y, Itoh Y. | 4. 巻<br>506             |
| 2. 論文標題<br>Transforming growth factor 1-induced collagen production in myofibroblasts is mediated by reactive oxygen species derived from NADPH oxidase 4   | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>557 ~ 562 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2018.10.116  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takagi T, Homma T, Fujii J, Shirasawa N, Yoriki H, Hotta Y, Higashimura Y, Mizushima K, Hirai Y, Katada K, Uchiyama K, Naito Y, Itoh Y. | 4. 巻<br>134             |
| 2. 論文標題<br>Elevated ER stress exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis in PRDX4-knockout mice   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Free Radical Biology and Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>153 ~ 164 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.024   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>谷川潤、水島かつら、平井泰子、武藤哲彦、五十嵐和彦、高木智久、内藤裕二、東村泰希 |
| 2. 発表標題<br>転写抑制因子Bach1の欠損は大腸上皮において細胞増殖を促進する         |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                          |
| 4. 発表年<br>2021年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>濱田理久、高木智久、水島かつら、武藤哲彦、五十嵐和彦、内藤裕二、東村泰希 |
| 2. 発表標題<br>腸管粘膜でのIgA分泌における 転写抑制因子Bach1の機能解析     |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                      |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>米澤明莉、谷川潤、水島かつら、平井泰子、武藤哲彦、五十嵐和彦、高木智久、内藤裕二、東村泰希 |
| 2. 発表標題<br>転写抑制因子Bach1の欠損に伴う大腸ムチンの性状変化について               |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                               |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Jun Tanikawa, Yasuki Higashimura, Tomohisa Takagi, Katsura Mizushima, Yasuko Hirai, Akihiko Muto, Kazuhiko Igarashi, Yuji Naito |
| 2. 発表標題<br>Involvement of transcription repressor Bach1 in colonic mucous secretion in mice  |
| 3. 学会等名<br>9th biennial meeting for the Society for Free Radical Research Asia (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>東村泰希、谷川潤、高木智久、水島かつら、武藤哲彦、五十嵐和彦、内藤裕二 |
| 2. 発表標題<br>転写抑制因子Bach1欠損に伴う大腸粘液分泌亢進における機序解析    |
| 3. 学会等名<br>第72回日本酸化ストレス学会学術集会                  |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>谷川潤、高木智久、水島かつら、平井泰子、武藤哲彦、五十嵐和彦、内藤裕二、東村泰希 |
| 2. 発表標題<br>転写抑制因子Bach1は大腸粘液分泌に関与する                  |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2020年度大会                          |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>東村泰希、柳沼明日香、高木智久、水島かつら、武藤哲彦、五十嵐和彦、内藤裕二 |
| 2. 発表標題<br>大腸粘液分泌機構における転写抑制因子Bach1の機能解析          |
| 3. 学会等名<br>第72回日本栄養・食糧学会大会                       |
| 4. 発表年<br>2018年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>東村泰希                          |
| 2. 発表標題<br>抗酸化経路制御に基づく大腸疾患予防に関する食品機能学的研究 |
| 3. 学会等名<br>第74回日本栄養・食糧学会中部支部大会（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yasuki Higashimura                                 |
| 2. 発表標題<br>Beneficial functions of oligosaccharides from agar |
| 3. 学会等名<br>Gut Health Congress Asia 2018（招待講演）（国際学会）          |
| 4. 発表年<br>2018年   |



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|