

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06827

研究課題名(和文) APC蛋白質の多角的解析-細胞内局在・上皮機能・神経機能から臓器発生まで-

研究課題名(英文) Multilateral analyses for APC protein -intracellular localization, epithelial function, nervous function and organogenesis-

研究代表者

千田 隆夫 (Senda, Takao)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10187875

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)：C末端が欠損したAPC蛋白質(APC1638T)を発現するAPC1638Tマウスでは、空腸絨毛の伸長、絨毛M細胞数の増加、絨毛先端部のアポトーシス細胞数の増加およびE-cadherinの発現増強が見られた。学習・記憶能力に障害があるAPC1638Tマウスの海馬歯状回の顆粒細胞層が厚く、顆粒細胞がより密集していた。野生型(APC+/+)マウスの海馬では、APCとAMPA受容体およびAPCとPSD-95の共局在と分子結合が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APC遺伝子は最初は大腸がん抑制遺伝子として発見された。APCは腸以外の全身諸組織で発現し、特に脳で高い発現が見られる。しかし、脳腫瘍の原因にはなっておらず、脳における大量のAPCの働きはよくわかっていなかった。私はAPCが脳の認知機能や記憶に関係していることを明らかにし、本研究で海馬にその原因があることが示唆された。また大腸がんの抑制以外に腸の形態形成や上皮の細胞のターンオーバーに関わっていることが本研究で示された。

研究成果の概要(英文)：In APC1638T mice expressing C-terminus deleting APC protein (APC1638T), there was an increase in the elongation of the enteric villi, an increase in the number of villous M cells, an increase in the number of apoptosis cells at the tip of the villi, and an increase in the expression of E-cadherin. The granule layer of hippocampal dentate gyrus in APC1638T mice with impaired learning and memory was thicker, and the granule cells were denser. Co-localization and molecular binding of APC and AMPA receptors and APC and PSD-95 were confirmed in the hippocampus of wild-type (APC+/+) mice.

研究分野：発生学

キーワード：APC APC1638T 腸上皮 M細胞 アポトーシス 海馬 AMPA受容体 PSD-95

1. 研究開始当初の背景

(1) *Adenomatous polyposis coli* (APC) 遺伝子は、家族性腺腫性ポリポーシス症 (FAP) の原因遺伝子として発見された。その後、非遺伝性も含めて大部分の大腸癌の発生初期に変異を起こしていることがわかり、大腸癌抑制遺伝子として知られるようになった。

APC 遺伝子は 2,843 個のアミノ酸からなる APC 蛋白質をコードする。APC 蛋白質は細胞増殖シグナルを伝える Wnt シグナル系を負に制御することで、癌化を抑制する。APC の変異によって Wnt シグナル系の構成因子である β -カテニンとの結合能を失い、Wnt シグナルが異常に促進すると、発癌に至る。研究代表者の千田は、マウスの正常 APC 発現腸上皮細胞と変異 APC (APC^{Min}) 発現細胞における APC と β -カテニンの分布・局在を明らかにした。その後、 β -カテニン以外に APC に結合する蛋白質が次々に同定され、それらの結合タンパク質との相互作用を通じて、APC 蛋白質が細胞の増殖、分化、接着、極性形成、遊走等に関与することが明らかになってきた。

(2) 大腸癌抑制因子として発見された APC の脳での発現は顕著である。しかし、APC の変異と脳腫瘍の関連性は否定的である。脳で発現している大量の APC が何をしているのか、大きな謎である。Apc ノックアウトマウス (Apc^{-/-}) の胚は発生早期に死滅するので、Apc は初期発生において極めて重要であるが、このマウスではその後の組織臓器発生を調べられない。また Apc^{Min/+} マウスは生まれて来るが、若年で大腸癌が発生するために生体機能解析が困難である。このような理由で、APC 蛋白質の個体レベルでの機能解析は進んでいない。

(3) APC 蛋白質の C 末端には PSD-95、DLG、微小管、EB1 (微小管結合因子) 等が結合する。私たちは APC が PSD-95 を介して、グルタミン酸受容体の 1 つである AMPA 受容体を後シナプス膜に集積させることを明らかにした。APC の広範な脳神経機能への関与が示唆された。ニューロンの分化に対する APC の機能も明らかにした。APC とその C 末端に結合する蛋白質との相互作用による、数多くの興味深い現象がわかってきた。

(4) APC1638T ノックインマウスは、1639 アミノ酸以降の C 末端側が欠損した変異 APC 蛋白質を発現するマウスであり、 β -catenin 結合ドメインがあるので癌は発生せず、APC の機能解析には大変好都合である。私たちは APC1638T マウスに対して行動学はじめ多角的な解析を行い、様々な“異常”を発見した。その中に本研究の課題とした 3 つの異常 (腸絨毛の伸長、統合失調症様行動異常、歩行異常) が含まれていた。

2. 研究の目的

(1) 腸絨毛の伸長に寄与するメカニズムの解析

腸上皮は陰窩底近くにある幹細胞が分裂増殖して未分化細胞となり、それが陰窩・絨毛の上方に移動しつつ、吸収上皮細胞、杯細胞、腸内分泌細胞に分化する。一方、陰窩底に向かう細胞は Paneth 細胞に分化する。陰窩・絨毛の頂上に到達した細胞はアポトーシスを起こして剥離する。私たちのこれまでの解析で、APC1638T マウスの腸絨毛は野生型 APC マウスの絨毛よりも長いことがわかった。本研究課題では、APC の腸絨毛の伸長に関与するメカニズムを探索する。

(2) 統合失調症様行動異常の分子基盤の解析

私たちは、APC1638T マウスが統合失調症に似た行動異常を示し、海馬の神経細胞に形態異常が見られることを明らかにした (Onouchi et al., Mol Brain 2014)。また、

近年、皮質のインターニューロンでのみ APC をノックアウトすると、インターニューロンの移動が阻害されることが示されている。私どもの見出した APC1638T の示す統合失調症様行動異常の分子基盤を解析する。

(3) 歩行異常の分子基盤の解析

私たちは DigiGait 小動物用歩行解析システムを用いて、APC1638T マウスの歩行において後肢の左右協調性が障害されていることを明らかにした（未発表）。本研究課題では、APC1638T マウスの示す歩行異常の分子基盤を解明する。

(4) APC の細胞内局在の制御機構の解明

1991 年の APC の発見以来、APC の細胞内局在に関しては混沌としていて、いまだに決着がついていない。私たちは、腸上皮細胞、ニューロン・グリア、培養上皮細胞での APC の分布・局在を報告してきた。しかし、同じ細胞で同じ染色法を用いても、使用する APC 抗体によって結果が一致しないことをよく経験した。APC の多彩な細胞機能を考えるときに、APC の細胞内局在に関する信頼できる情報は決定的に必要である。したがって、本研究課題では、APC の細胞内局在とその制御機構の解明にも取り組む。

3. 研究の方法

(1) 腸絨毛の伸長に寄与するメカニズムの解析

体重および小腸の長さ(十二指腸~回腸)を測定し、小腸組織のヘマトキシレン・エオジン染色切片を顕微鏡で観察した。

24 時間で食べた餌の量と体重増加率を算出した。

血中アミラーゼ、リパーゼ、グルコース、総コレステロールの量を検査した。

腸幹細胞系(Lgr5 陽性幹細胞、Bmi1 陽性幹細胞、CD133/prom1 陽性前駆細胞)を、それぞれのマーカーにより免疫染色した。細胞増殖マーカーである Ki-67 の免疫染色によって、増殖細胞を検出した。腸幹細胞恒常性に関連しているシグナルである、Wnt/ β -catenin シグナル、BMP シグナル、MAPK シグナル、hippo-YAP-TAZ シグナル、Notch シグナル、Hedgehog シグナルの状態を、イムノプロットティング法と RT-PCR 法で調べた。

Glycoprotein 2(GP2)免疫染色により、空腸と回腸の microfold cells(M 細胞)を検出した。RT-PCR 法を用いて、M 細胞のマーカーである *Gp2* および M 細胞の分化に関連する *Marcks11* と *Spib* の空腸における mRNA の発現レベルを調べた。

Cleaved caspase-3 を用いてアポトーシス細胞を精査し、RT-PCR 法でアポトーシス制御に関与する *Bcl2*、*Bax* 遺伝子の mRNA 発現レベルを確認した。

免疫染色により E-cadherin の局在を、イムノプロットティング法を用いて E-cadherin タンパク質の発現量を調べた。さらに、Cleaved caspase-3 と E-cadherin を二重免疫染色し、アポトーシス細胞と E-cadherin 発現との関連を追及した。

(2) 統合失調症様行動異常の分子基盤の解析

in situ ハイブリダイゼーション法によって APC1638T マウスの海馬における APC mRNA の発現を、免疫蛍光染色法によって海馬における APC タンパク質の発現を検証した。

マウス脳パラフィン切片(HE 染色)を観察し、海馬全体の形状および海馬各領域(歯状回、CA1、CA3)の神経細胞層の厚さと神経細胞の密度を測定した。

二重免疫蛍光抗体法と二重免疫電子顕微鏡法によって、APC と AMPA 受容体の共局

なお、APC と PSD-95 の共局在の有無を調べた。

免疫沈降法によって、マウス脳における APC と AMPA 受容体および APC と PSD-95 の結合の有無を検証した。

マウスの足に電気ショックを与えた後、海馬の CA1 領域における c-Fos の発現を免疫染色法で調べた。

(3) 歩行異常の分子基盤の解析

歩行の基本リズムを調節している CPG(Central Pattern Generator)と呼ばれる介在ニューロン群で形成される回路網を形態学的に検索するために、クリューバー・バレラ髄鞘染色を行った。

APC1638T マウスの脊髄 CPG におけるアセチルコリン作動性ニューロンの分布をコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 抗体による免疫染色法で検索した。

APC1638T マウスの脊髄 CPG におけるアストロサイト、稀突起膠細胞の数と形態を、抗 GFAP 抗体と抗 Olig2 抗体を用いた免疫組織化学法によって検索した。

(4) APC の細胞内局在の制御機構の解明

APC の各部位 (N 末端、分子中央、C 末端) に対するウサギポリクローナル抗体を作成した。

APC は細胞の密度によって核と細胞質を移行することがわかっている。細胞の contact inhibition に伴う APC の細胞内局在の変化を検索した。

- ・イムノプロットティング: 内因性 APC を発現する細胞を低密度および高密度で培養したとき、どの細胞分画に APC が検出されるか。
- ・免疫細胞化学: 内因性 APC を発現する細胞を低密度および高密度で培養し、APC の細胞内局在を複数の APC 抗体で検出する。

4. 研究成果

(1) 腸絨毛の伸長に寄与するメカニズムの解析

APC1638T マウスの体重は有意に少なく、小腸の長さ(十二指腸~回腸)は有意に短く、空腸の陰窩-絨毛長が有意に伸長していた。十二指腸と回腸の陰窩-絨毛長には有意差はなかった。

APC1638T マウスの食物摂取量と体重増加率は、WT マウスと比べて差がなかった。

APC1638T マウスの血中アミラーゼ、リパーゼ、グルコース、総コレステロール値は WT マウスと比べて有意差を認めなかった。

APC1638T マウスの腸幹細胞系である、Lgr5 陽性幹細胞、Bmi1 陽性幹細胞、CD133/prom1 陽性前駆細胞の数は WT マウスと比べて有意差がなかった。APC1638T マウスの空腸における Ki-67 陽性細胞の数は、WT マウスと比べて有意差がなかった。さらに、APC1638T マウス空腸では、Wnt/ β -catenin シグナル、BMP シグナル、MAPK シグナル、hippo-YAP-TAZ シグナル、Notch シグナル、Hedgehog シグナルの変化は認められなかった。

APC1638T マウス空腸では、WT マウスと比べて絨毛 M 細胞の数は有意に多かった。*Gp2* と *Spib* の mRNA 発現レベルは有意に高かったが、*Marcks11* の mRNA 発現レベルは WT マウスと比べて差がなかった。WT マウスと APC1638T マウスの回腸に絨毛 M 細胞は存在しなかったが、パイエル板 M 細胞が観察された。APC1638T マウス回腸のパイエル板 M 細胞は、WT マウスと比べて有意に少なかった。

APC1638T マウス空腸では、絨毛先端の Cleaved caspase-3 陽性細胞は WT マウスと比べて有意に多いが、*Bcl2* と *Bax* の mRNA 発現レベルに有意差はなかった。

APC1638T マウス空腸では、E-cadherin の発現と局在は WT マウスと比べて差はなかったが、絨毛先端の脱落しかかっているアポトーシス細胞の側面の E-cadherin の染色性は WT マウスと比べて強かった。

(2) 統合失調症様行動異常の分子基盤の解析

APC1638T マウスの海馬における APC の mRNA とタンパク質の発現量とパターンは、WT マウスと比較して有意差がなかった。

APC1638T マウスの海馬では、WT マウスと比較して、歯状回の顆粒細胞層が厚く、顆粒細胞がより密集していたが、CA1 と CA3 では有意差がなかった。

WT マウスの海馬では、APC と AMPA 受容体および APC と PSD-95 の共局在が電顕レベルで確認されたが、APC1638T マウスの海馬ではこれらの共局在は確認されなかった。免疫沈降法によって、WT マウスの脳ではこれらの分子結合は確認できなかった。

APC1638T マウスでは、足への電気ショックに伴う海馬 CA1 領域の錐体細胞の活性化 (c-Fos の発現) が減弱した。

(3) 歩行異常の分子基盤の解析

クリューバー・バレラ髄鞘染色による比較では、APC1638T マウスの脊髄の交連線維束の発達は WT マウスと差がなかった。

抗 ChAT 抗体による免疫染色法によると、APC1638T マウスの脊髄のコリン作動性ニューロンの数は WT マウスと差がなかった。

APC1638T マウスにおける GFAP 陽性アストロサイトの形態 (樹状突起の分岐パターン) に有意差がありそうだ (未検定)。

(4) APC の細胞内局在の制御機構の解明

抗体の作製

ヒト APC 蛋白質 C 末端の合成ペプチドを用いて、ウサギ由来の APC-C 抗体を作成した。

抗体の検証

1) Western blotting : 全長 APC を発現する細胞株 (HCT116、253J-BV) では、市販の APC の N 末端認識抗体 (APC-N 抗体) と APC-C 抗体が APC を検出した。C 末端欠失 APC を発現する細胞株 (DLD-1) では、APC-N 抗体のみが APC を検出した。

2) Immunoprecipitation : 全長 APC を APC-C 抗体で IP し、APC-N 抗体による Western blotting で検出した。

3) Immunocytochemistry : APC をノックダウンした細胞株において、APC-C 抗体による免疫染色を行った。HCT116、253J-BV ではコントロールと比較して蛍光の減弱が認められた。両細胞において APC は細胞質と核、および細胞伸長部の微小管遠位端に局在を認めた。

4) Immunohistochemistry : マウス空腸における APC の局在を、APC-C 抗体で描出した。APC の発現は絨毛頂部が最も高く、絨毛基部及び陰窩に下るにつれて発現が低下した。C 末端欠失 APC のみ発現する APC^{1638T/1638T} マウス空腸では APC は検出されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 0件）

1. 著者名 Yamada N-O, Wenduerma, Matsuda S, Senda T	4. 巻 51
2. 論文標題 Validation and application of a novel APC antibody in western blotting, immunoprecipitation, and immunohistochemistry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 227-236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0196-9	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 Matsuda S, Senda T	4. 巻 52
2. 論文標題 BRI2 is an anti-Alzheimer gene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0191-1	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 Senda T	4. 巻 March
2. 論文標題 As easy as APC, amysterious protein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 www.impact.pub	6. 最初と最後の頁 58-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Li C, Onouchi T, Hirayama M, Sakai K, Matsuda S, Yamada N-O, Senda T	4. 巻 54
2. 論文標題 Morphological and functional abnormalities of hippocampus in APC1638T/1638T mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00257-3	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 Wenduerma, Yamada N-O, Wang T, Senda T	4. 巻 -
2. 論文標題 A further study on a disturbance of intestinal epithelial cell population and kinetics in APC1638T mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	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) 10.1007/s00795-016-0152-5	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 Rannikmae H, Peel S, Barry S, Senda T, de la Roche M	4. 巻 -
2. 論文標題 Mutational inactivation of Apc in the intestinal epithelial compromises cellular organization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	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) 10.1242/jcs.250019	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 千田隆夫
2. 発表標題 細胞、組織、個体に及ぼすAPCの多彩な機能
3. 学会等名 日本組織細胞学会第91回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千田隆夫、オントルマ、松田修二、山田名美
2. 発表標題 特異性と汎用性の高い新規APC抗体の作製
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田裕保、李晨光、小川名美、松田修二、千田隆夫
2. 発表標題 APC1638Tマウスにおける腰部脊髄灰白質の形態学的異常
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田裕保、千田隆夫
2. 発表標題 APC1638Tマウスの脊髄CPG領域の解析
3. 学会等名 日本解剖学会第79回中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田名美、オントルマ、千田隆夫
2. 発表標題 APCのC末端欠損がアウエルバッハ神経叢と腸内細菌叢に与える影響
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田裕保、李晨光、オントルマ、山田名美、松田修二、千田隆夫
2. 発表標題 後肢の肢間位相の異常を呈するAPC1638Tマウスの脊髄介在ニューロンの局在
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田名美、オントルマ、千田隆夫
2. 発表標題 APC1638Tマウス腸内細菌叢のバランス変化-その要因と影響について
3. 学会等名 日本解剖学会第80回中部支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 オントルマ、李晨光、王凶雅、尾之内高慶、小川名美、千田隆夫
2. 発表標題 APC1638Tマウス腸上皮の細胞動態解析
3. 学会等名 日本解剖学会第80回中部支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千田隆夫、オントルマ、王凶雅、尾之内高慶、李晨光、山田名美
2. 発表標題 APC1638Tマウス腸上皮の細胞動態解析
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李晨光、尾之内高慶、平山将也、酒井一由、松田修二、山田名美、千田隆夫
2. 発表標題 APC1638Tマウスの海馬における形態学的・機能的異常
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020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	山田 名美 (Yamada Nami) (40727319)	岐阜大学・大学院医学系研究科・助教 (13701)	
研究分担者	松田 修二 (Matsuda Shuji) (70296721)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	

	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
研究協力者	李 晨光 (Li Chenguang)		
研究協力者	王 図雅 (Wang Tuya)		
研究協力者	オントルマ (Wenduerma)		
研究協力者	石田 裕保 (Hiroyasu Ishida)		

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			
英国	ケンブリッジ大学			