

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82718

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07990

研究課題名(和文) 腸管上皮細胞接着分子のEpCAMおよび相同分子TROP2の機能解明

研究課題名(英文) How EpCAM and TROP2 function in the gastrointestinal tract

研究代表者

中藤 学 (Nakato, Gaku)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・「腸内細菌叢」プロジェクト・サブリーダー

研究者番号：20584535

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)：上皮細胞接着分子であるEpithelial cell adhesion molecule (EpCAM)とTROP2は高い相同性を持ち、単体もしくは両者が様々な上皮細胞に発現する。恒常的に発現するEpCAMやTROP2の機能については未だ研究途上である。そこで、独自に構築した遺伝子改変マウスの解析により、正常細胞に発現するEpCAMおよびTROP2が細胞内において果たす役割を検討した。腸管上皮細胞に発現するEpCAMが粘膜免疫の構築もしくは恒常性の維持に関与し、TROP2ではその機能を補完できないことを明らかにした。また、腸管粘膜固有層にEpCAM陽性CD45陽性細胞が存在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では腸管上皮細胞に恒常的に発現するEpCAMが粘膜免疫の構築や維持に重要な役割を果たす可能性および、消化管粘膜固有層において、EpCAM陽性CD45陽性細胞が存在することを新たに見出した。また、腸内細菌叢解析により、腸炎を増悪させることが示唆される腸内細菌を同定した。今後、より詳細な解析を続けることで、EpCAMによる粘膜免疫系の調整もしくは制御機構が明らかにでき、新たな腸内細菌による腸炎誘導機構の解明も期待される。本成果は基礎生物学の理解を深めるのみならずEpCAMやTROP2が素因となる疾患治療法の開発への応用にも利用でき、医療の発展に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cell adhesion molecules (EpCAM) and TROP2 are homologous cell surface proteins that are widely expressed, and often co-expressed, in developing and adult epithelia. EpCAM and TROP2 have various reported functions and we aim to elucidate responsible mechanisms by characterizing and investigating if they have similar or different functions. To clarify this, we studied the roles of EpCAM and TROP2 expressed in normal cells by analyzing transgenic EpCAM null mice with TROP2 expressed in the intestinal epithelial cells. Comprehensive RNA-seq analysis of the transgenic mice showed that EpCAM expressed in intestinal epithelium is involved in mucosal immunity regulation or homeostasis maintenance in both small intestine and colon, but not TROP2. We also found that EpCAM-positive CD45-positive cells are present in the gut lamina propria through mice phenotype analysis.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：TROP2 EpCAM 腸管上皮細胞 免疫細胞 粘膜免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM、TROP1) と TROP2 は組織侵襲性胎盤トロポブラストから同定された一型膜タンパク質で高い相同性を有している(参考文献1)。これらのタンパク質は多くの組織の上皮細胞、胎生期の幹細胞に単体もしくは双方が恒常的に発現している。一方で、腫瘍細胞では異常な EpCAM および TROP2 の発現上昇が見られるため癌の指標の一つとして用いられるだけでなく、治療の標的として着目されている。実際に EpCAM や TROP2 を標的とした抗体による癌治療や治験が日々進められており、特定の癌に効果があることが示されている(参考文献2、3)。これら二つの分子の変異は疾患とも深い関わりがある。EpCAM の変異は腸管疾患の一つである Congenital Tufting Enteropathy (CTE) の要因となり、腸組織の破綻により死に至る。また、TROP2 の変異は膠様滴状角膜変性症を引き起こし、失明に繋がることもある。冒頭で述べたように両分子は相同性が高く、特に N 末端側に存在するタンパク質ドメインのアミノ酸配列は高く保存され、この領域が EpCAM と TROP2 に共通する生理学的機能に重要であることが示唆されている。一方で、細胞内側になる C 末側のタンパク質ドメインは大きく異なっており、下流のシグナル経路にも違いがあるため、異なる生理学的機能を示す要因とされている(参考文献4)。しかしながら、EpCAM と TROP2 に重複する機能、異なる機能の解析はどちらか一方の分子解析をもとに議論されており、多くはアミノ酸配列が同一であるという理由から他方も同様の機能を有していると推測されている。そのため実際の検証を培養細胞株や実験動物などを用いた解析により示す必要がある。EpCAM、TROP2 の疾患誘発の機構の解明や癌との関連性に焦点を絞った研究は世界各地で盛んに実施されている。その一方で、近年報告数が増えてきたものの EpCAM 欠損マウスは出生後二週間以内で死に至るため成体における役割の解析が不可能である。また、TROP2 欠損マウスでは特徴的な表現型が現れないことから「正常細胞や幹細胞に恒常的に発現する EpCAM や TROP2 が細胞内において果たす役割は何か」という基礎生物学の根本的な問いに対する答えは研究途上である。

2. 研究の目的

上述した問いに対する答えを得るため、本研究では構築した全身の EpCAM を欠損したマウスにマウス TROP2 を腸管上皮細胞特異的に発現させたマウス (T2R マウス) の表現型解析を実施する。これらの解析から、EpCAM および TROP2 の両分子に共通する機能および異なる機能を見出すことにより、「恒常的に発現する EpCAM および TROP2 が成体において果たす役割」および「腸管における EpCAM が粘膜免疫に与える影響」を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸管上皮細胞発現分子の網羅的解析

野生型マウス、コントロールマウス (EpCAM^{+/+} TROP2^{Tg})、T2R マウス (EpCAM^{-/-} TROP2^{Tg}) から回腸および大腸を採取し、30mM EDTA/ Hank's balanced salt solution で処理したのちに実体顕微鏡下にて 26G ニードルを使用して腸管上皮細胞層を剥離・回収した(参考文献5)。回収したサンプルより Total RNA を抽出した。BioAnalyzer にて RNA の品質を確認したのちに、シーケンズライブラリーを作製、Illumina NovaSeq 6000 にて配列情報を取得した。得られたデータは iDEP.93 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep93/>) にて解析を行なった。

(2) 腸内細菌叢の解析

野生型マウス、コントロールマウス、T2R マウスから 3-5 個の自然排泄された糞便を採取し、凍結乾燥を行なった。凍結乾燥した糞便にジルコニアビーズを添加し、震盪機により破碎した。一定量の糞便粉末を量りとり、フェノール・クロロホルム法、RNaseA 処理を行い、細菌のゲノム DNA を精製した。精製した DNA サンプルを使用し、Miseq シーケンサーにより、16S rRNA 遺伝子の解析を実施した。得られたデータは QIIME2 (<https://qiime2.org/>) および LefSe (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>) にて解析を行なった。

(3) 粘膜固有層に存在する EpCAM 陽性免疫細胞の解析

野生型マウス、コントロールマウス、T2R マウスから小腸、パイエル板、大腸を採取し、酵素処理、密度勾配遠心法を用いて免疫細胞を取得した(参考文献6)。取得した免疫細胞を Anti-mouse EpCAM (G8.8)、Anti-mouse CD45 (30F-11)、B 細胞、T 細胞、樹状細胞の表面マーカー抗体にて染色し、フローサイトメーターにより測定し、FlowJo を用いて解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 腸管上皮細胞発現分子の網羅的解析

これまで腸管組織全体を使用した発現分子の網羅的解析を実施してきたが、上皮細胞以外の細胞の影響も予想以上に大きかった。そこで本研究では、腸管上皮細胞を単離し、発現分子の網羅的解析を実施することにより、EpCAM や TROP2 が腸管上皮細胞に与える影響を検討した。T2R マウスでは野生型マウス、コントロールマウスと比較して、免疫応答、細菌・外来抗原に対する応答性が低下していた（図1）。本結果は、腸管上皮細胞に発現する EpCAM は粘膜免疫の発達や外来抗原の排除に重要であり、TROP2 ではその機能を補完できないことを示唆するものであった。このような違いは組織全体で比較した際には認められなかったが、腸管上皮細胞層を用いた解析により新たに見出された経路であった。また、細胞接着因子の一つであるクローデインの安定化を制御する Matrilysin と TROP2 の相互作用することを明らかにした。T2R マウスではクローデインの発現が完全に補完されておらず、これらの分子の発現量の変化が腸内上皮細胞同士の接着を脆弱にしている可能性が示唆された。

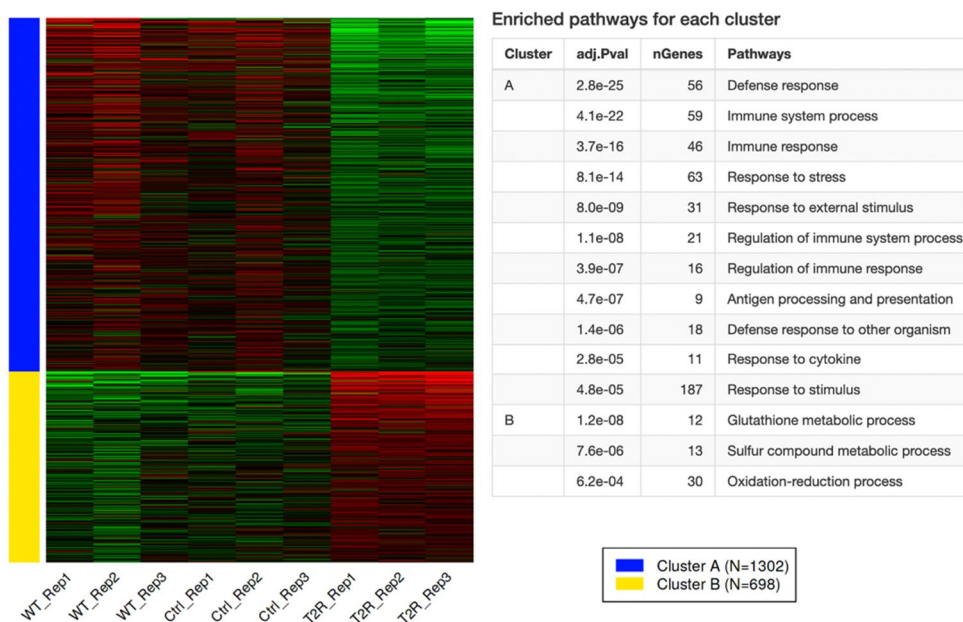


図1 小腸上皮細胞層で特徴的に変化していたパスウェイ

(2) 腸管上皮細胞に発現する EpCAM、TROP2 が腸内細菌叢に与える影響の評価および長期飼育による腸炎発症、腫瘍形成の検討

マウス腸管上皮細胞における発現分子の網羅的解析より、T2R マウスにおいて腸内細菌接着受容体や腸内細菌由来シグナル分子の消失、粘膜免疫応答の変化により腸内細菌叢の構成や代謝物質に影響を及ぼすことが示唆された。そこで野生型マウス、コントロールマウス、T2R マウスの腸内細菌叢の違いを検討した。T2R マウスでは、*Dubosiella* 属の割合が減少し、Bacteria X を含む複数の腸内細菌が増加していた（図2）。T2R マウスの腸内において増加していた腸内細菌の多くは、既にデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発大腸炎マウスで増加することが報告されている腸内細菌であった。一方で、BacteriaX については DSS 誘発大腸炎との関連性は報告されていない。今後は、BacteriaX が DSS 誘発大腸炎の増悪や腸炎の発症に影響を及ぼすかどうか検討を続けていく。

T2R マウスは定常状態において免疫応答が低く、さらに DSS 誘発大腸炎で増加が認められる腸内細菌が増加しており、加齢に伴い腸炎を自然発症する可能性が示唆された。また、EpCAM および TROP2 は腫瘍とも関わりが深い。そこで加齢に伴う大腸がんの発生について検証を行なった。長期飼育した野生型マウス、コントロールマウス、T2R マウスの小腸、大腸組織切片においてマウス間での変化は認められなかった。また、長期飼育した T2R 粘膜固有層の免疫細胞の構成についても若齢と変わらなかった。

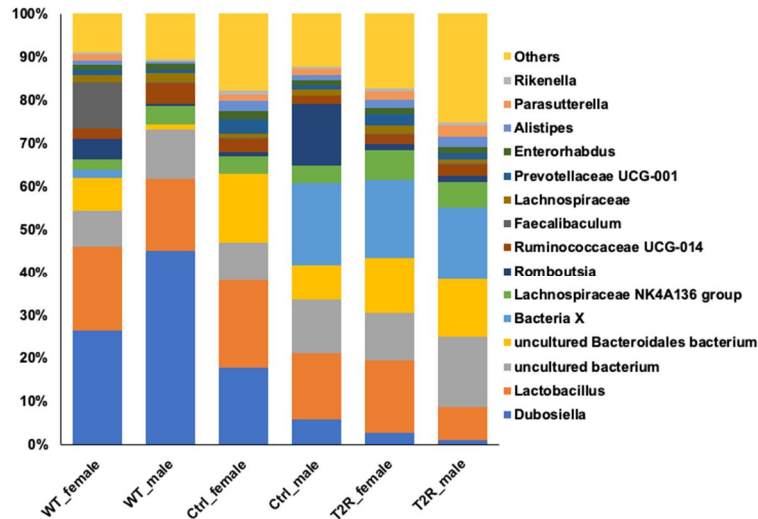


図2 野生型、コントロールマウスおよびT2Rマウスの腸内細菌叢の違い

(3) 腸管上皮細胞層に発現する EpCAM および TROP2 が粘膜免疫および免疫細胞に与える影響の評価

各マウスの腸管組織から免疫細胞を調整し、総細胞数および細胞構成の変化を検討した。その結果、T2R マウスは野生型やコントロールマウスに比べ、総細胞数が増加していたが、T 細胞、B 細胞、樹状細胞の構成には大きな変化がなかった。さらに詳細に解析を実施したところ、EpCAM 陽性 CD45 陽性細胞が腸管粘膜固有層に存在することを新たに見出した(図3)。この EpCAM 陽性 CD45 陽性細胞を特定するために様々な免疫細胞マーカーを用いて検討を行った、特徴として大部分の細胞が MHC クラス II 分子を高発現することは明らかとなったが、免疫細胞種の特定には至らなかった。次に、消化管における局在をより詳細に検討するために様々な消化管部位からリンパ球を採取し検証を行った。その結果、EpCAM 陽性 CD45 陽性細胞は大腸粘膜固有層では小腸粘膜固有層と同程度の割合で存在していた。パイエル板内では EpCAM 陽性 CD45 陽性細胞集団は存在せず、代わりに EpCAM^{int}CD45 陽性細胞が存在することが明らかとなった。一方で、腸管上皮細胞間リンパ球や脾臓において EpCAM 陽性 CD45 陽性細胞はほとんど存在していなかった。

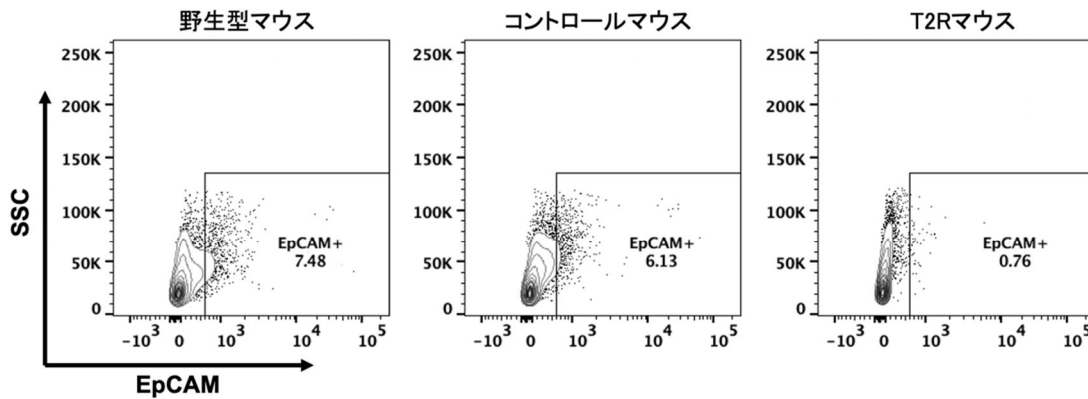


図3 各マウスの小腸粘膜固有層内に存在するCD45陽性細胞中に存在するEpCAM陽性細胞の割合

<参考文献>

- 1 Lipinski, M *et al.* Proc natl Acad Sci U S A, 1981 Aug;78(8):5147-50.
- 2 Shvartsur, A. *et al.* 2015 *Genes Cancer*, 2015 Mar;6(3-4):84-105.
- 3 Patriarca, C. *et al.* 2012 *Cancer Treat Rev*, 2012 Feb;38(1):68-75.
- 4 McDougall, A. *et al.* 2015 *Dev Dyn*, 2015 Feb;244(2):99-109.
- 5 Hase, K. *et al.* 2005 *DNA Res*, 2005;12(2):127-37.
- 6 Goto, Y. *et al.* 2014 *Immunity*, 2014 Apr 17;40(4):594-607.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Gaku Nakato, Sohshi Morimura, Micheal Lu, Xu Feng, Chuanjin Wu, Mark C. Udey	4. 巻 9(8)
2. 論文標題 Amelioration of Congenital Tufting Enteropathy in EpCAM (TROP1)-Deficient Mice via Heterotopic Expression of TROP2 in Intestinal Epithelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 cells	6. 最初と最後の頁 1847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9081847	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 Chuanjin Wu, Micheal Lu, Xu Feng, Gaku Nakato, Mark C. Udey	4. 巻 9(4)
2. 論文標題 Matriptase Cleaves EpCAM and TROP2 in Keratinocytes, Destabilizing Both Proteins and Associated Claudins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 cells	6. 最初と最後の頁 1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9041027	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 -

〔学会発表〕 計0件

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

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
---------	---------