

平成21年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590717
 研究課題名（和文） HATH1 標的遺伝子の網羅的検索における腸管上皮分化調節機構解析
 研究課題名（英文） The analysis of the regulation in intestinal differentiation by the comprehensive search of Hath1 target genes.
 研究代表者
 土屋 輝一郎（TSUCHIYA KIICHIROU）
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：40376786

研究成果の概要：

本研究は申請者が独自に見いだした腸管上皮細胞分化マスター遺伝子である bHLH 型転写因子 Hath1 の機能に着目し、Hath1 標的遺伝子の網羅的検索から特定の細胞種への分化機構の解明を目的とし、粘膜再生誘導を主眼とした難治性慢性腸炎の新規治療法開発への基盤とするものである。本研究では当初の研究計画に示した項目につき、下記に示すごとく大きな研究成果が得られた。1) Notch, Wnt シグナル下での Hath1 標的遺伝子の網羅的検索においては、腸管上皮由来細胞株にテトラサイクリン誘導 Hath1 発現系を確立し、Hath1 発現による遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて網羅的に検索したところ、複数の候補遺伝子の抽出できた。中でも杯細胞形質、パネート細胞形質に関与する遺伝子の検出を確認した。2) Hath1 標的遺伝子による特定細胞種への分化誘導解析においては、レンチウイルスベクターを用い腸管上皮細胞由来株に遺伝子導入する系を構築した。3) ヒト炎症性腸疾患患者の腸管上皮細胞異常分布による Hath1 標的遺伝子の発現解析においては、ダブルバルーン内視鏡により全小腸を観察出来た患者の生検検体を用い、小腸の部位別に遺伝子発現解析を行った。Hath1 遺伝子は口側から肛門側へより強い発現を認め、それに伴い腸管上皮細胞の中で杯細胞だけ増加を認めた。Hath1 遺伝子増加は杯細胞形質発現を標的とすることが示唆された。以上より Hath1 発現系を構築し Hath1 標的遺伝子の候補遺伝子を抽出するとともに、実際の小腸粘膜における発現検討により腸管粘膜構築との関連性を明らかにするなど多大な成果を挙げた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学、消化器学（食道、胃、小腸、大腸）

キーワード：Atoh1, Hath1, 小腸, 分化制御, 標的遺伝子

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は慢性の難治性の腸炎であり、近年罹患者の増大と共に難治化、重症化する患者が多くなり、新規治療法の開発が急務となっている疾患である。その治療法としては免疫調節機構破綻からの免疫抑制をターゲットとした治療が主要となっているが、新たな視点、標的とした新規治療法の開発が望まれている。以前より我々は免疫調節機能として腸管上皮細胞、中でも杯細胞の機能に着目し、1) 杯細胞がサイトカイン IL-7 を産生し、粘膜局所のリンパ球産生、パイエル板構築に必須であること (J Clin Invest. 1995)、2) IL-7 産生は IFN- γ を介した転写因子 IRF-1, IRF-2 の競合により、厳密な転写制御をされていること (Mol Cell Biol. 2004)、3) 炎症性腸疾患患者における大腸粘膜では杯細胞が減少し、IL-7 産生が低下すること (J Clin Invest. 1995)、4) IL-7 産生異常により慢性腸炎を惹起すること (J Exp Med. 1998, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005)、を見だし、上皮細胞分化障害と免疫制御破綻の関連性を示してきた。また近年腸管上皮細胞の機能として、抗原提示能 (FEBS Lett. 2005)、管腔内異物からのバリア制御、抗菌作用など上皮細胞機能と粘膜局所免疫制御が密接に関わっている事が判明し、上皮再生による局所免疫制御の可能性が示唆された。

そこで腸管上皮細胞分化・再生機構解明の発端として骨髄由来細胞に着目し、1) 骨髄移植後の患者の腸管上皮細胞にはドナー骨髄細胞由来の細胞が存在し、吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞の4種類すべてに分化しうること、2) 移植後の GVHD 腸炎再生期においては骨髄由来細胞がより多く腸管上皮細胞へ分化すること (Nature Med. 2002)、3) その中でも4種類の腸管上皮細胞のうち杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞の分泌型細胞、特に杯細胞への分化が多くなること (Gastroenterology. 2005)、を示し、炎症からの粘膜再生においては骨髄由来細胞が積極的に腸管上皮へと動員され、さらに杯細胞を中心とした分泌型の細胞に分化し、サイトカイン、粘膜防御因子、増殖因子、抗菌物質を分泌することで粘膜再生に寄与することが示唆された。

我々は、以上の解析より分泌型細胞の構築が腸管のホメオスターシスに重要であると考えたが、近年分泌型細胞への分化に b-HLH 型転写因子である

Math1 が必須であることが報告され (Science. 2002)、そのヒト遺伝子である Hath1 を中心に解析を行い、1) Hath1 遺伝子がヒトにおいても小腸及び大腸にのみ多く発現していること、2) Hath1 遺伝子発現は Notch シグナルによって負に制御されていること (投稿準備中)、3) Hath1 タンパクがユビキチン-プロテアソーム系タンパク分解経路にて安定性においても制御されていること、4) Hath1 タンパクは Wnt シグナル下の GSK3 のターゲットとなり、 β -catenin と同様のタンパク分解制御機構を用いて、 β -catenin とは相反する分解制御をうけることから、腸管上皮の「 β -catenin-増殖」と「Hath1-分化」をタンパク分解スイッチングにより制御すること (Gastroenterology. 2006 in press)、を示した。これは Hath1 遺伝子が Notch シグナルを介した遺伝子発現調節と Wnt シグナルの新規経路を介したタンパク発現調節を受けることから、一つの「分化」遺伝子が二つの主要な「増殖」シグナルのクロストークにより腸管上皮細胞の分化調節が規定されるという画期的知見を世界に先駆けて示した。

2. 研究の目的

腸管上皮組織は、幹細胞を由来とする細胞群の秩序正しい「増殖」と「分化」の調和のもと、生涯を通じ絶えず短い細胞回転で再生を繰り返す特殊な組織機構を有する。また一方、この制御システムの破綻が、重篤な増殖・分化障害による組織再生不全、あるいは異常増殖能獲得による癌化機構と密接に関わることは明らかである。特に炎症性腸疾患などの慢性、難治性炎症疾患においては腸管の免疫調節機構破綻による持続炎症だけでなく杯細胞減少、パネート細胞過形成など腸管上皮分化異常も病態の一因とされているが、その分子基盤は全く確立されていない。本研究では我々が基盤を築いた「腸管上皮細胞機能と慢性炎症との関連機構」、「Wnt, Notch シグナルクロストークを介した腸管上皮細胞増殖・分化調節機構」をさらに発展させ、申請者が独自に見いだした腸管上皮細胞分化マスター遺伝子である bHLH 型転写因子 Hath1 の機能に着目し、Hath1 標的遺伝子の網羅的検索から特定の細胞種への分化機構の解明を目的とし、粘膜再生誘導を主眼とした難治性慢性腸炎の新規治療法開発への基盤とするものである。

そこで申請者らは Notch, Wnt シグナルにおける Hath1 発現調節機構が Hath1 標的遺伝子群を制御することで細胞種決定機構

となる可能性を考え、さらに粘膜再生誘導治療標的にまで発展すると着想した。最近の我々の得た知見では興味深いことにHath1陽性の分泌型上皮細胞種によりNotch, Wntシグナル刺激に違いがあることが判明し、特にパネート細胞は分化細胞にもかかわらずWntシグナルが亢進している知見を得ている。本研究ではこれらの知見をさらに発展させ、1)Notch,Wntシグナル下でのHath1標的遺伝子の網羅的検索、2)Hath1標的遺伝子による特定細胞種への分化誘導解析、3)ヒト炎症性腸疾患患者の腸管上皮細胞異常分布によるHath1標的遺伝子の発現解析を中心課題に据えた。

3. 研究の方法

1)Notch,Wntシグナル下でのHath1標的遺伝子の網羅的検索

i)大腸細胞株のWntシグナルにおけるHath1発現解析

APC変異を持つ大腸癌細胞株にTet-systemにて誘導性にHath1遺伝子を発現させる細胞、およびHath1遺伝子の下流にIRES-正常APC遺伝子を組み込みHath1と正常APCを同時に誘導性に発現させる細胞を構築する。それぞれの細胞においてHath1タンパク発現量を解析し、さらにHath1結合配列であるE-box配列にluciferaseを組み込んだベクターを構築し、Hath1転写活性を解析する。Wntシグナル活性に関してはb-catenin蛋白量およびTCF4結合配列luciferaseベクターであるTOP-Flashを用いて計測する。またそれぞれの条件にて細胞形質発現解析を以下の遺伝子およびタンパクレベルで解析する。

幹細胞形質 (Musashi-1)、杯細胞(Mucin2, TFF3, IL-7, アルシアンブルー染色)、内分泌細胞 (CgA, CCK, NeuroD, Ngn3)、パネート細胞(Defensin5, Defensin6, SOX9)、吸収上皮細胞 (Lactase, Isomaltase, CD10)。

ii)小腸由来細胞株のNotchシグナルにおけるHath1発現解析

カナダSherbrooke大学のBeaulieu教授との共同研究にてヒト正常小腸上皮由来細胞株(HIEC)(Exp Cell Res. 1996)の供与を受けている。これはヒト腸管由来としては唯一の非癌由来細胞株である。この細胞株を用いてNotchシグナル阻害によるHath1発現、細胞形質変化を解析する。また申請者らは企業との共同研究にて既存の1000倍力価のあるγセクレターゼインヒビターの供与を受けている。つまりNotchレセプターの細胞内ドメイン切断酵素阻害により、より強いNotch

シグナル阻害効果を期待できる。評価方法は上記に準ずる。Notch阻害効果に関してはNotch標的遺伝子であるHES1の発現及びNotch細胞内ドメインのDNA結合配列を用いたluciferaseベクターを用いシグナル活性を評価する。

iii)Hath1発現変化におけるHath1標的遺伝子解析

上記のそれぞれの条件によるHath1標的遺伝子の網羅的解析を行う。各条件下によるRNAを材料としたマイクロアレイ解析ではHath1タンパク発現変化だけでなく、各シグナル動揺の影響を排除できないため標的遺伝子解析は困難である。そのためHath1結合プロモーター領域を直接網羅的に解析する事で下流の発現遺伝子検索をすることとした。近年確立したChIP法により細胞固定し、超音波破碎後、独自に作成したHath1抗体にて免疫沈降し、Hath1タンパク-genome DNA複合体を抽出する。タンパク分解処理にてHath1結合DNAを精製し、DNAマイクロアレイ (ヒト全染色体の24,134遺伝子のプロモーター領域1500塩基が含まれている100塩基のDNA chip plateを使用)にてHath1結合プロモーターを明らかとする。さらにその下流の標的遺伝子のRT-PCRにて実際の発現を確認する。

平成20年度は、平成19年度の研究により得られた標的遺伝子群に関して正常腸管粘膜の発現解析を行い、細胞種および各シグナルとの関連を明らかとする。平成19年度計画2)と同様の解析にて評価を行い、細胞レベルでの細胞形質、シグナル状況と実際の粘膜発現と整合性のとれる標的遺伝子を選択する。

2)Hath1標的遺伝子による特定細胞種への分化誘導解析

i)Wnt,Notchシグナルの細胞種類による腸管発現解析

当施設で得られる正常の小腸及び大腸の生検検体を用い、免疫染色にてHath1標的遺伝子と細胞形質との関連を明らかとする。評価項目としては粘膜形態 (HE染色)、細胞増殖解析 (Ki-67染色)、分化マスター遺伝子 (Hath1染色)、

細胞種類解析

杯細胞 (アルシアンブルー染色、Mucin2染色)、内分泌細胞 (クロモグラニン染色等の各内分泌タンパクの染色)、パネート細胞 (HE染色、difensin染色)、吸収上皮細胞 (CD10染色、ラクターゼ染色)、Wntシグナル解析(Wnt染色、APC染色、GSK-3染色、Axin染色、β-catenin染色、c-myc染色)、Notchシグナル解析(Notch細胞内

ドメイン(NICD)染色、HES1 染色、Musashi-1 染色)とし、各細胞種とWnt,Notch シグナルの関連を明らかとする。

平成20年度はi)上記計画1)で選択された標的遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸癌由来細胞株および小腸由来細胞株に発現させ、特定の細胞種への形質獲得を平成19年度計画1)と同様の評価項目にて確認する。

ii) 個体レベルによる標的遺伝子の機能解析

上記で得られた形質変化獲得能のある標的遺伝子をvillinプロモーター下に組み込み腸管特異的発現標的遺伝子トランスジェニックマウスを作成し、腸管粘膜内の特定の細胞種へのシフトが起こるかを解析する。

3) ヒト炎症性腸疾患患者の腸管上皮細胞異常分布によるHath1標的遺伝子の発現解析

i) 炎症性腸疾患患者における細胞種およびWnt, Notch シグナル発現解析

計画2)と同様に炎症性腸疾患患者検体に関しても解析し、正常とのシグナル、細胞種異常を明らかとする。

上記選択された標的遺伝子群の発現を炎症性腸疾患患者検体を用い、発現解析を行い、正常人と発現量、発現部位についても同様の手法を用いて評価する。

ii) 上記で作成されたトランスジェニックマウスを用いてDSS 飲水による腸炎モデルマウスを構築し、正常マウスでの腸炎炎症状態を比較することで、特定の細胞種の抗炎症効果、粘膜再生効果を評価する。

解析項目は炎症状態評価として臨床的評価(体重減少、便性状、血便の有無)、組織学的評価(細胞浸潤部位、細胞浸潤数、組織障害度)に加えて細胞表面マーカーによる浸潤リンパ球性状解析(T:B細胞比率、メモリー細胞比、CD4/8比)、粘膜再生評価として平成19年度計画2)と同様に粘膜形態、増殖解析、分化遺伝子発現解析、細胞種類解析、Wnt, Notch シグナル解析を行い評価する。

4. 研究成果

1)Notch,Wnt シグナル下でのHath1 標的遺伝子の網羅的検索

本研究においてまず、腸管上皮細胞におけるNotch, Wnt シグナルの影響を解析を行い、両シグナルとも未分化維持維持機構と密接に関わることを証明した。Notch シグナルに関してはNotch 細胞内ドメインを薬剤誘導性にて発現するシステムを構築し、Notch シグナル亢進系を確立した。その時に細胞形質を解析すると、杯細胞形質は減少し、逆に一

部のパネート形質の発現増加を認めた。これは潰瘍性大腸炎の腸管形質と同じであり、実際の潰瘍性大腸炎患者の腸管組織を解析するとNotch シグナルが亢進していることを発見した。さらにNotch シグナルの亢進はHath1 遺伝子をNotch シグナルの標的遺伝子の一つであるHES1 が直接Hath1 RNA複製を抑制していることを証明した。腸管上皮細胞にHES1 発現誘導系を構築し、Hath1 プロモーター解析、ChIP解析により、HES1 が直接Hath1 プロモーター上に結合し、転写を抑制することを明らかとした。

Wnt シグナルに関しては、Wnt シグナルがシグナル下流のGSK3 をスイッチとしてHath1 蛋白をb-catenin 蛋白と相補的にプロテアソーム系を用いて安定性を制御する事を明らかとした。GSK3 によるスイッチング機構をさらに発展させ、Hath1 蛋白の分解認識配列を同定し、安定化Hath1 蛋白を作成した。大腸癌細胞株にこの変異Hath1 蛋白を導入すると、Wnt-GSK3 シグナルに認識されず安定化して発現することを発見した。さらにその形質をみると杯細胞形質の発現が上昇していることが明らかとなった。つまりWnt シグナル亢進状態は変わらない状態でb-catenin 蛋白も安定しているにもかかわらずHath1 蛋白の安定化は分化形質を獲得する能力を持つことを証明した。このことはこれまでb-catenin の安定化のみが、細胞増殖、未分化維持に寄与し発癌となることが定説であったが、本研究においてWnt シグナルはHath1 とb-catenin にそれぞれ「分化」と「増殖」を独立して役割分担させ、蛋白分解という同一の手段で制御を行うことが明らかになった。

以上のようにHath1 はNotch,Wnt 両シグナルによってそれぞれの機構により制御されており、標的遺伝子発現抑制によるそれぞれの形質変化を解析することができた。

さらに潰瘍性大腸炎、大腸癌などの疾患においてもHath1 の制御破綻による形質変化を実証しえた。

2) Hath1標的遺伝子による特定細胞種への分化誘導解析

Hath1 標的遺伝子の検索のため、Hath1 強制発現細胞を用いて、ChIP on chip を行った。Hath1 蛋白の抽出のためHath1 抗体をウサギに免疫し、ポリクローナル抗体の作成に成功した。抽出したHath1 蛋白に結合しているDNA断片をプロモーター領域chipにて網羅的に検索を行い、50以上の遺伝子の同定に成功した。それぞれの遺伝子に関して、プロモーター解析を行い、Hath1 による転写活性の解析および、結合領域の同定を行った。さらに各遺伝子における上皮細胞形質発現との関連を解析中である。

3) ヒト炎症性腸疾患患者の腸管上皮細胞異常分布によるHath1標的遺伝子の発現解析

潰瘍性大腸炎、クローン病におけるHath1蛋白の発現を解析したところ、粘膜表層のみに発現しており、そのほとんどはHath1陰性の増殖細胞によって構成されていた。

現在Hath1局在におけるHath1標的遺伝子の局在との関連を解析中であり、これらの制御破綻が疾患の病態を表すものと考えられる。

以上より2年間の本研究において、Hath1を介した分化機構および、Hath1のシグナル伝達における制御破綻による疾患病態発現を説明できるだけの結果を得ることができた。またHath1標的遺伝子も多数同定出来、現在分化制御および疾患関連性について解析中であり、さらなる制御機構の解明が期待されることから、本研究の目的は十分達成できたと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. **Am J Physiol GI & Liver**. 296: 23-35, 2009. 査読有
2. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. **Biochem Biophys Res Commun**. 368: 923-929, 2008. 査読有
3. Hino K, Tsuchiya K, Taro Fukao, Kotaro Kiga, Ryuichi Okamoto, Tkanori Kanai, Watanabe M: Inducible expression of microRNA-194 is regulated by HNF-1 during intestinal epithelial cell differentiation. **RNA**. 14: 1433-1442, 2008. 査読有
4. Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Fukuda T, Miura O, Yagita H, Watanabe M: Negative feedback regulation of colitogenic CD4+ T cells by increased granulopoiesis. **Inflamm Bowel Dis**. 14:1491-1503, 2008. 査読有
5. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N,

Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. **J Immunol**. 180: 383-390, 2008. 査読有

6. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion and survival of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. **J Immunol**. 180: 5291-5299, 2008. 査読有

7. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Watanabe M: Colitogenic CD4+ effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. **Inflamm Bowel Dis**. 14:1630-1640, 2008. 査読有

8. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. **J Immunol**. 178: 4937-4946, 2007. 査読有

9. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. **Gastroenterology**. 132: 176-189, 2007. 査読有

10. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. **J Immunol**. 178: 4737-4748, 2007. 査読有

11. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and β -catenin by Wnt-glycogen synthase kinase 3 β in human colon cancer. **Gastroenterology**. 132: 208-220, 2007. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Dysregulated differentiation of intestinal epithelia in UC. 3rd Japan - Korea IBD Symposium. Korea (Seoul), 2008年9月20日
2. Tsuchiya K, Inoue K, Aragaki M, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Notch signaling suppresses the transcriptional activity of Hath1 Gene,

resulting in the undifferentiated form of human intestinal epithelial cells. DDW 2008. San Diego., 2008年5月20日

3. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and persistence of chronic colitis. DDW 2007. Washington, D.C. , 2007年5月22日

4. Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Stabilization of Atoh1 protein induces Mucin2 gene expression in human colon cancer cells. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月23日

5. Okamoto R, Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Activated notch signaling suppresses generation of goblet cells in the human intestinal mucosa. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月20日

6. Onizawa M, Kanai T, Nemoto Y, Oshima S, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Yagita H, Watanabe M: Blockade of TNF- α inhibits tumor progression in colitis-associated cancer. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 輝一郎 (TSUCHIYA KIICHIROU)
東京医科歯科大学医学部附属病院・講師
研究者番号：40376786

(2) 研究分担者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・消化器病態学・教授 (H19)
研究者番号：10175127

岡田 英理子 (OKADA ERIKO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員 (H19)
研究者番号：20376784

深尾 太郎 (FUKAO TARO)
慶應義塾大学・医学部・助教 (H19)
研究者番号：20401127

(3) 連携研究者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・消化器病態学・教授 (H20)
研究者番号：10175127