

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08318

研究課題名(和文) 創傷の治癒過程に異所性発現するAIDの新規「細胞外マトリクス構築制御」機能の解明

研究課題名(英文) Novel function "regulation of extracellular matrix construction" of ectopic AID expression in wound healing process.

研究代表者

岡田 季之 (Okada, Toshiyuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10607328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症によって大腸上皮細胞に異所性発現するAIDの役割を明らかにするために、DSS誘発大腸炎モデルを野生型およびAID欠損マウスに用いて検討した。大腸炎の誘導に伴い減少した体重の回復がAID欠損マウスにおいて遅延すること。そして回復期に移行した野生型とAID欠損型マウスの大腸上皮細胞において、細胞外マトリクス関連分子の発現が有意に変化するだけでなく、大腸組織の疾患スコアが野生型と比してAID欠損マウスにおいて有意に高いことが分かった。またAIDを安定発現させた細胞株を用いた実験では、AIDが標的遺伝子に結合することでDNAの脱メチル化を誘導し、その遺伝子の発現を調節する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果より、炎症に伴って大腸上皮細胞に異所性発現するAIDの役割を理解することは、大腸粘膜を治癒(創傷治癒過程)させるためのメカニズムを理解するための一助になることが期待できると考えられる。さらに先行研究では異所性AIDの発現は、上皮細胞の悪性転換に関与する可能性が報告がされていることから、慢性炎症による発がん機構の解明にも貢献できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)： To evaluate the role of AID, which is ectopically expressed in colonic epithelial cells (CECs) under inflammatory conditions, wild-type (WT) and AID-deficient mice were evaluated using the DSS-induced colitis model. Restoration of body weight loss after colitis induction is delayed in AID-deficient mice compared to WT mice. In addition, the expression of extracellular matrix-associated molecules in CECs of WT and AID-deficient mice transitioned to the recovery phase was not only significantly altered, but also the disease score of colon tissue was significantly higher in AID-deficient mice compared to WT mice. Additionally, we found that AID, which is ectopically expressed under inflammation conditions, binds to target genes and induces DNA demethylation, possibly regulating the expression of those genes using colorectal cancer cell lines stably expressing AID.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：炎症性腸疾患 AID 異所性発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再燃・寛解を繰り返す難治性の慢性炎症疾患である潰瘍性大腸炎とクローン病患者の寛解状態を長く維持するためには『粘膜治癒することが非常に重要』であるが、粘膜の創傷治癒過程に関する理解が不十分であることが挙げられる。これまで申請者は、炎症条件下に大腸上皮細胞で異所性発現する Activation-Induced cytidine Deaminase(AID)の役割に着目し研究を行ってきた。その研究成果より、異所性な AID の発現依存的にその発現が変化する遺伝子の単離を行い、細胞外マトリックス(ECM)に関連する遺伝子等の発現が変化することを明らかにしている。

これまでの他のグループの先行研究では腸管上皮組織が傷害を受けた際、自己修復する再生の過程において ECM の構成因子の 1 つであるコラーゲン繊維により線維化が形成されることが、大腸上皮組織の修復や再生に必要なことが報告されている(Yui S et al, Cell stem cell 2018)。また慢性炎症による ECM の分泌と分解のバランスの破綻が、瘻孔形成や線維性狭窄の原因となること(Ding S et al, PLOS ONE 2012)や慢性炎症はがんの進展に対するリスク因子であり、抗体遺伝子改変酵素である AID の発現を誘導する事が知られている(Endo Y et al, Gastroenterology 2008, Takai A et al, Oncogene 2012, Shimizu T et al, Can Sci 2012)。しかしながら、通常 AID は B 細胞にのみ発現し、免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異(SHM)やクラススイッチ組換えに必須の酵素だけでなく(Muramatsu M et al, Cell 2000)、DNA の脱メチル化酵素として作用することも知られている(Bhutani et al, Nature 2010)。そこで、本研究では炎症に伴い大腸上皮細胞に異所性に発現する AID の有無が ECM 関連遺伝子の発現を変化させることより、大腸粘膜の治癒過程に関与している可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究は、DSS 大腸炎モデルマウスおよび AID を安定発現させた大腸がん細胞株を用いて、大腸上皮細胞に異所性発現する AID がどのように標的遺伝子の発現を調節し、大腸粘膜に与える影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 急性 DSS 誘導性大腸炎モデル

野生型マウスと AID 欠損型マウスに 4% Dextran sulfate sodium(DSS)を 4 日間自由飲水させて大腸炎を誘発し、その後通常飲用水に交換して 10 日間毎日経過観察を行った(体重測定、血便と下痢など観察)。また大腸炎を誘導した野生型および AID 欠損型のマウスの大腸クリプトを 6 日目、8 日目および 14 日目の時点でそれぞれ精製した。そして精製した大腸クリプトから genomic DNA および total RNA の抽出を行い解析に用いた。

(2) 全ゲノムシーケンス解析による変異部位の同定

3-(1)で精製した野生型および AID 欠損型マウスの genomic DNA(14 日目)を使用して whole genome sequence 解析を行い、AID 依存的に変異が認められる遺伝子座の同定を試みた。また、大腸炎に影響を受けない組織(耳・尻尾)を陰性コントロールとして用いる。

(3) HE 染色と組織評価

大腸炎によって誘導される AID の異所性発現の有無が、急性期から回復期に移行した(8 日目)マウスの大腸組織の評価することでその影響を検討した。具体的には、野生型および AID 欠損マウスに 4 日間 DSS を自由飲水させることで大腸炎を誘導し、その後の 4 日間は通常飲用水を自由飲水させた。そして、マウスの大腸組織を摘出しホルマリン固定した後、パラフィン標本の作成および HE 染色を行い、野生型および AID 欠損マウスを大腸組織について評価を行った。

(4) AID 安定発現細胞株を用いた標的遺伝子の実証と発現制御メカニズムの解明

CHIP-seq 解析による AID が結合する標的遺伝子の確認

Mock(空ベクター)と AID-FLAG を安定発現する細胞株を用いて、AID 安定発現細胞において優位に発現が変化する遺伝子に対して AID が結合しているか確認を行うために CHIP-qPCR 解析を行った。具体的には 2%PFA で固定した細胞株(2×10^7 Cells)をセルスクレイパーで回収後、BIORUPTOR にて sonication を行い DNA 断片が 200bp から 500bp 前後になっているかあらかじめ確認した。その後、そのクロマチン DNA を用いて FLAG 抗体による免疫沈降を行うことで CHIP-DNA を回収した。そして、その CHIP-DNA を用いて qPCR を行うことで標的遺伝子に対して AID が結合しているか確認を行った。

標的遺伝子の DNA のメチル化状態の評価

AID 依存的に発現が変化する遺伝子のプロモーター領域の DNA の脱メチル化を明らかにするために、DNA のメチル化解析を COBRA 法および Bisulfite sequence 解析により行った。Mock と AID を安定発現させた細胞株から抽出・精製した 1 μ g から 2 μ g 分のゲノム DNA を用いて、プロメガ社の EZ DNA Methylation キットを使用してバイサルファイト処理を行った。バイサ

ルファイト処理済み DNA を鋳型として PCR を行うことで、AID 安定発現大腸がん細胞において優位に発現が変化した遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を検証した。

AID の発現抑制が標的遺伝子に与える影響の検証

5×10^4 cells の Mock (空ベクター) と AID を安定発現する細胞株に Lipofectamine RNAiMAX を使用して 10nM Negative control, 10nM Positive control (Eg5) および AID に対する siRNA (10nM) をそれぞれ導入し、48 時間から 72 時間の時点で細胞を回収して total RNA の抽出を行った。その後、total RNA を逆転写した cDNA を用いて、AID 依存的に発現が変化する遺伝子に与える影響について qPCR によって確認を行った。

4. 研究成果

野生型および AID 欠損マウスに対して DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて大腸炎を誘導し、異所性発現する AID の役割をこれまで研究を行ってきた。その結果、AID 依存的に細胞外マトリックス関連分子の発現が変化することや野生型マウスに比して AID 欠損マウスにおいて大腸炎に伴い減少した体重の回復が遅延し、下痢が長期間持続することを見出している。また、AID はゲノム DNA に結合することから大腸上皮細胞において発現する AID も B 細胞で発現する AID と共通の標的遺伝子を認識している可能性を考え、Yamane らによって同定された AID の標的遺伝子 5514 個 (accession number GSE24178) と申請者が同定した ECM 関連分子を比較することで、AID の標的候補遺伝子として 5 遺伝子を同定した。

(2) 全ゲノムシーケンス解析による変異部位の同定

活性化誘導型シチジンデアミナーゼである AID の機能として、免疫グロブリンの抗原認識部位 (CDR) に点突然変異を導入することがよく知られている。そこで AID 依存的に発現が変化する遺伝子の発現調節メカニズムを明らかにするために、AID 特異的に変異が導入された遺伝子座を同定するために全ゲノムシーケンス解析を行った。具体的には、Dextran sulfate sodium (DSS) により大腸を誘導後、回復期に移行したマウスの大腸クリプト (AID 陽性) とそのマウスの耳 (AID 陰性) からゲノム DNA を抽出し、その両者の配列を比較検討することで異所性発現する AID によって誘導された変異部位の同定を行った。その結果、AID の標的候補遺伝子として単離した 5 遺伝子のうち 3 遺伝子で変異が導入されている可能性を見出した。しかしながら、単離した変異箇所がその近傍の遺伝子発現に影響を及ぼすか不明なままであるため、さらに解析を進めていく必要があると考えられる。

(3) HE 染色と組織評価

DSS による大腸炎を野生型および AID 欠損マウスに誘導し、回復期に移行したマウス (8 日目) の大腸組織を摘出後、ホルマリン固定した組織を用いてパラフィン標本を作成した。その後、HE 染色を行った野生型および AID 欠損マウスの大腸組織の評価することで、AID の発現の有無が組織に与える影響を検討した。その結果、AID を異所性発現する野生型マウスと比して AID 欠損マウスにおいて、疾患スコアが統計学的に有意に高いことが明らかとなった。このことから炎症によって異所性発現する AID は、急性期から回復期にかけて何らかの形で関与している可能性が示唆された。

(4)- CHIP-seq 解析による AID が結合する標的遺伝子の確認

令和元年の研究成果報告書にて、AID を安定発現する細胞株を使用する事で AID 依存的に発現が 2 倍以上に変化する 16 遺伝子を同定し、野生型マウスにおいて大腸炎の有無に関わらず、標的遺伝子の発現量のバラツキが大きいことで有意差は認められなかったことを報告していた。この結果より、申請者は DSS により誘導される大腸炎は大腸粘膜において正常と炎症部位が混在 (AID の発現の有無も混在) する事がその原因であると考え、CHIP-qPCR 解析を行った。まず単離した 6 遺伝子のうち AID 欠損型マウスにおいて大腸炎の誘導前と後において、その発現が低値のままだった 3 遺伝子に着目し、その 3 遺伝子と AID が実際に結合しているか CHIP-qPCR 解析を行った結果、AID の標的遺伝子のプロモーター領域に AID が結合している可能性が示唆された。

(4)- 標的遺伝子の DNA のメチル化状態の評価

(4)- の結果を踏まえ、次に AID が結合することが明らかとなった標的遺伝子のプロモーター領域においてメチル化状態に変化が認められるか COBRA 法により検証したところ、Mock では高度にメチル化状態 (高メチル化) のままだったのに対して、AID を安定発現する細胞株における標的遺伝子のプロモーター領域では脱メチル化 (低メチル化) 状態になっていることが明らかとなった。実際に標的遺伝子のプロモーター領域で脱メチル化されているか Bisulfite sequence 解析を行うことでプロモーターの配列を確認した。その際、最低 10 クローンの解析を行い確認した。

(4)- AID の発現抑制が標的遺伝子に与える影響の検証

(4)- および (4)- の結果より、異所性な AID の発現は標的遺伝子に結合しすることで脱メチ

ル化を誘導している可能性が示唆されたことから、次に大腸がん細胞株に安定発現させた AID を 10nM siRNA によって抑制することで、標的遺伝子の発現に与える影響を検証した。その結果、AID に対する siRNA を導入することで AID の発現を抑制したところ、siRNA による AID の発現低下 (80%減少) と共に標的遺伝子の発現が統計的に優位に低下することが明らかとなった。この時、AID 安定発現細胞株に対して 10nM Negative control の siRNA を導入しても標的遺伝子の発現に影響は認められないことを確認している。以上のことから、炎症によって異所性発現する AID は、標的遺伝子に結合することで脱メチル化を誘導することで、標的遺伝子の発現を調節している可能性が明らかとなった。

今後は、炎症により異所性発現する AID によって、その発現が調節されている標的遺伝子が大腸上皮細胞に与える影響とその役割について明らかにするために、さらに解析を進めていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Low Daren, Swarup Nidhi, Okada Toshiyuki, Mizoguchi Emiko	4. 巻 2021.00089.
2. 論文標題 Landscape of inflammatory bowel disease in Singapore	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5217/ir.2021.00089	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 該当する

1. 著者名 Mizoguchi Emiko, Sadanaga Takayuki, Okada Toshiyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Biological Analyses-Derived Translational Findings in the T Cell Receptor Alpha Chain Knockout Mouse as an Experimental Model for Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 187 ~ 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijtm1030014	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 Emiko Mizoguchi, Renuka Subramaniam, Toshiyuki Okada, and Atsushi Mizoguchi	4. 巻 11
2. 論文標題 A Review of Selected IBD Biomarkers: From Animal Models to Bedside	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11020207	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 該当する

1. 著者名 Emiko Mizoguchi, Daren Low, Yui Ezaki, and Toshiyuki Okada	4. 巻 18
2. 論文標題 Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 151-167.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5217/ir.2019.09154	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Emiko Mizoguchi, Toshiyuki Okada, Takanori Minagawa, Chun-Geun Lee, Jack A. Elia, Atsushi Mizoguchi.
2. 発表標題 Role of a putative cyclin-binding domain in one of the nuclear localization sequences of Chitinase 3-like 1 in colonic epithelial cells
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺谷由唯、楠川仁悟、岡田季之、溝口充志、溝口恵美子
2. 発表標題 口腔扁平上皮発癌におけるChitinase 3-like 1 の関与
3. 学会等名 第57回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田季之、溝口充志、溝口恵美子、齋藤成昭
2. 発表標題 大腸炎によって異所性発現するAIDの役割
3. 学会等名 第57回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田季之、皆川貴範、溝口恵美子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 消化器病学サイエンス 5(2) 初心者でもわかるゲノム編集技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

エピゲノム免疫学
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/immun/>
久留米大学 医学部医学科 免疫学
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/immun/>

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