

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 1 月 25 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390092

研究課題名（和文） 消化管上皮細胞の Id2 依存的な増殖分化制御の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis for the Id2-dependent growth and differentiation controls of gastrointestinal epithelial cells.

研究代表者

横田 義史 (YOKOTA YOSHIFUMI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：50222386

研究成果の概要（和文）：Id2 の遺伝子欠損マウスでは小腸に腫瘍を形成する。本来は野生型マウス胎仔腸管では発現がみられないが Id2 欠損マウス胎仔腸管で発現が亢進する特定の転写因子に関連する遺伝子改変マウスの病態解析から、Id2 は形態形成期にある消化管組織の胃、小腸といった領域特異的な上皮-間充織相互作用を支える遺伝子発現制御ネットワークの重要な因子の 1 つであることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Mice deficient for Id2, a transcription regulator, develop intestinal tumors. By utilizing genetically engineered mice, we have disclosed that Id2 is an important factor in the gene network that determines the regional specificity of the gastrointestinal tract during development.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,700,000 | 2,010,000 | 8,710,000 |
| 2010年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 2011年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,900,000 | 4,170,000 | 18,070,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：消化管、上皮細胞、運命決定、転写調節因子、転写因子、遺伝子ネットワーク、Id2

1. 研究開始当初の背景

消化管上皮細胞の分化・成熟と増殖は、上皮細胞とそれに隣接した間充織との間の相互作用により精緻に制御されている。Wnt などの液性因子と細胞接着因子を介したこの上皮-間充織相互作用は、消化管の形態形成だけでなく、常に新しい細胞に入れ替わる成体の上皮組織の構造と機能の維持にも重要な役割を担うものであり、その破綻は消化管腫瘍の発症機序とも密接に関連している。上皮-間充織相互作用に関わる遺伝子発現制御の

ネットワークは未だ不明な点が多く、また、胃や小腸といった消化管の領域特異性を規定する上皮-間充織相互作用の分子基盤もよくわかっていない。一方、Barrett 上皮（食道に形成される円柱上皮）や胃上皮組織の小腸化生などの異所性上皮組織は腫瘍発症の重要な危険因子であることは古くから知られているが、異所性上皮組織形成機序は確定しておらず、また、異所性上皮組織から腫瘍がどのような過程を経て発生するのかもよくわかっていない。

helix-loop-helix (HLH) モチーフを機能ドメインとする Id2 は、basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子の機能抑制因子の 1 つであり、増殖と分化の変換点において増殖促進作用と分化調節作用を発揮して形態形成や生体の維持に深く関与している。c-myc と同様に早期応答遺伝子である Id2 は、ヒト大腸癌を始め多様な癌組織での過剰発現のレベルが悪性度と相関することなども知られている。

申請者らは生体における増殖分化制御機構を理解することを目的に Id2 の機能解析を行ってきた。この研究過程で、増殖促進活性を持つ Id2 の欠損マウスが小腸腺腫を発症するという奇妙な病態を見いだした。丹念な病態解析から、この腫瘍全体が胎生期に異所性に形成された胃組織であり、それが腫瘍化していること、さらに、胃間質細胞で発現し胃の形成に必須の転写因子 Barx1 が Id2 欠損マウスの胎仔小腸間質細胞で異所性に高発現していることを見いだした。また、Id2 欠損胎仔マウスの小腸腫瘍において腸上皮特異的転写因子である Cdx2 の発現が欠落し、逆に前胃特異的転写因子 Sox2 が Id2 欠損胎仔小腸上皮細胞で異所性に発現していることも見出した。野生型胎仔消化管組織では胃予定域での Id2 の発現は無く、小腸上皮細胞で高発現しているが、レトロウイルスを用いて Id2 を過剰発現させた胎生 13 日目の胃予定領域を腎被膜下に移植し発生させると、間質細胞での Barx1 の本来の発現が消失し小腸組織が誘導されることも確認している。以上の結果から、Id2 は消化管組織の領域特異的な上皮-間充織相互作用を支える遺伝子発現制御ネットワークの重要な因子の 1 つであると考えられる。

一方、Adenomatous polyposis coli (Apc) 遺伝子変異マウスは多くのヒト大腸癌で認められる Wnt シグナル活性化による消化管腫瘍発生モデルであるが、このマウスの小腸に多発する腫瘍の数と径が、Id2 の欠損により減弱傾向にあることも見いだしている。

2. 研究の目的

Id2 が関与する消化管の上皮-間充織相互作用とそれを制御する遺伝子発現制御ネットワークを明らかにし、新たな見地から消化管上皮細胞の分化と増殖の制御機構を分子レベルで理解することにある。さらに、消化管腫瘍の形成過程で大きな役割を果たす Wnt シグナルと Id2 との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 胎生 13 日目の小腸の遺伝子発現プロファイリングを行って、Id2 依存的に上皮-間充織相互作用に関わる胎仔小腸上皮細胞、および、間質細胞の因子（転写因子、液性因子、接着因子など）の同定と機能解析を行い、消化管上皮細胞の運

命決定機構を明らかにする。

(2) 正常胃組織と Id2 欠損マウス異所性胃組織の間の上皮-間充織相互作用因子の相違点を検討し、異所性組織の腫瘍化に関与する因子、および、上皮-間充織相互作用を明らかにする。

(3) Apc/Id2 複合欠損マウスを用いて Apc、および、Id2 の単独欠損マウスで認められる小腸腺腫が Apc/Id2 複合欠損マウスでどのような影響を受けるかを主に検討し、Wnt シグナルと Id2 の機能関係を明らかにする。

4. 研究成果

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現プロファイリングにより Id2 欠損マウス胎仔腸管で発現レベルが 3 倍以上増減している遺伝子を同定した。この中で 2 つの転写因子（ここでは転写因子 A、転写因子 B とする）について、胎生 13 日目のマウス胎仔腸管での whole mount in situ hybridization (WMISH) 法による遺伝子発現解析を行ったところ、両転写因子とも Id2 欠損マウス胎仔で胃などの本来の発現部位に加え、小腸上皮細胞でも発現が認められた（転写因子 A は転写因子 B より誘導率は高かった。）。転写因子 A の遺伝子欠損マウスを入手し、転写因子 A と Id2 の重複遺伝子欠損マウスを作成し腸管の表現型を解析したが、Id2 遺伝子欠損マウスにみられる小腸腫瘍は転写因子 A の欠損でも消失しなかった。一方、villin プロモーターを用いて小腸上皮細胞で胎生期から転写因子 A を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを樹立し、小腸上皮組織について組織学的な検討を行った。その結果、生後 1 年を超える Tg マウスの一部が、Id2 遺伝子欠損マウスにみられる小腸腫瘍の組織学的性質を部分的に持つ小腸腫瘍を発症する事が明らかになった。網羅的遺伝子発現プロファイリングによるスクリーニングで得たその他の候補遺伝子についても WMISH 法による胎仔消化管における発現解析を行い、広範囲に発現パターンが変化しているもの、局所的に発現パターンが変化している物などがあることが明らかになった。これらのことから、Id2 遺伝子欠損マウスの小腸は小腸としての性質が部分的に減弱しており、逆に、胃としての性質を部分的に帯びようになっている事が明らかになった。

正常の形態形成過程にある消化管組織において領域特異的な発現様式を示す幾つかの転写因子について in situ hybridization 法を用いて野生型マウスと Id2 欠損マウスで発現様式の比較を行った。食道と胃に発現する Pax9 の Id2 欠損マウスでの異所性発現亢進は認めなかった。一方、食道と胃の上皮で発現する Sox2 および Foxa2 は、Id2 欠損マウスで胎仔空腸肛門側において斑状の発

現陽性領域を認めた。以上より、消化管の領域特異的な運命決定過程において、Sox2 と Foxa2 が Id2 の下流で機能している可能性が示唆された。

また、腸管腫瘍形成のモデルマウスの代表例である *Apc* 遺伝子変異マウス (*Apc*^{d716}) は Wnt シグナルが恒常的に活性化することによって腸管に多数の良性腫瘍を発症する。*Apc*^{d716} マウスにおいてさらに転写調節因子 Id2 を欠損させると、形成される腫瘍の数が 1/5 に減少することを見出した。この現象は領域特異性があり、小腸の回腸でのみ認められる。また *Apc:Id2* 複合変異マウスと *Apc*^{d716} マウスの腸管において、十二指腸・空腸・回腸・大腸の領域特異的なマーカー遺伝子群の発現に変化は認められず、回腸での腫瘍数の減少が発生期の Id2 欠損による影響ではなく成体期の回腸特異的な影響であることを確認している。*Apc* 遺伝子変異マウスの腫瘍形成を抑制する因子は複数報告があるが、領域特異的に腫瘍形成に寄与する因子の報告は全くなく、この知見は腸管の腫瘍学分野において非常に新規性が高い。腫瘍形成には initiation の段階と expansion の段階があることが知られているが、Id2 の欠損は *Apc*^{d716} マウスの回腸腫瘍形成の initiation と expansion のいずれに寄与するのかを検討する目的で、腫瘍のサイズごとの割合を比較したところ、*Apc:Id2* 複合変異マウスは *Apc*^{d716} マウスと比較して 0.5mm 以下の microadenoma の割合が 45%から 58%に増加し、逆に 0.5mm 以上 1mm 以下の腫瘍の割合が 46%から 34%に減少したが、その変化は腫瘍数の 80%の減少に比べると僅かであった。また、*Apc*^{d716} マウスの腫瘍上皮細胞における増殖能とアポトーシスの割合には Id2 欠損による影響は認められなかった。以上のことから、Id2 は *Apc*^{d716} マウスの回腸の腫瘍の expansion の過程よりもむしろ、腫瘍形成の initiation の段階に重要であることが示唆された。

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 7 件)

- ① Kim, D. Y., et al. (著者12名中10番目) : The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J. Immunol.*, 186: 4253-4262, 2011. 査読有り. doi: 10.4049/jimmunol.0903794
- ② Egusa, H., et al. (著者8名中6番目) : The small-molecule harmine

regulates NFATc1 and Id2 expression in osteoclast progenitor cells. *Bone*, 49: 264-274, 2011. 査読有り. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.003

- ③ Jongbloed, M. R. M., Vicente-Steijn, R., Douglas, Y. L., Wisse, L. J., Mori, K., Yokota, Y., Bartelings, M. M., Schalijs, M. J., Mahtab, E. A., Poelmann, R. E., Gittenberger-De Groot, A. C. : Expression of Id2 in the second heart field and cardiac defects in Id2 knock-out mice. *Dev. Dyn.*, 240: 2561-2577, 2011. 査読有り. doi: 10.1002/dvdy.22762
- ④ Hosono, N., Kishi, S., Iho, S., Urasaki, Y., Yoshida, A., Kurooka, H., Yokota, Y. and Ueda, T. : Glutathione S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line. *Cancer Sci.*, 101: 767-773, 2010. 査読有り. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01432.x
- ⑤ Nakahiro, T., Kurooka, H., Mori, K., Sano, K. and Yokota, Y. : Identification of BMP responsive elements in the mouse Id2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 399: 416-421, 2010. 査読有り. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.090
- ⑥ Nagatake, T., et al. (著者16名中8番目) : Id2-, RORyt-, and LTβR-independent lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.*, 206: 2351-2364, 2009. 査読有り. doi: 10.1084/jem.20091436
- ⑦ Tokuriki, A., Iyoda, T., Inaba, K., Ikuta, K., Fujimoto, S., Kumakiri, M. and Yokota, Y. : Dual role for Id2 in chemical carcinogen-induced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 30: 1645-1650, 2009. 査読有り. doi: 10.1093/carcin/bgp172

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森 健太郎、中村ハルミ、宮地 均、玉田紘太、Chi-Chung Hui、内匠 透、横田義史：転写調節因子 Id2 による消化管上皮細胞の運命決定機構。第 33 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月。
- ② Mori, K., Nakamura, H., Kurooka, H., Tamada, K., Takumi, T. and Yokota, Y.： Lineage specification of gastrointestinal cells by helix-loop-helix transcription factor Id2. 第 44 回日本発生物学会年会、沖縄県宜野湾市、2011 年 5 月。
- ③ 黒岡尚徳、横田義史：酸化ストレスにより形成される HLH タンパク質の分子間ジスルフィド結合。第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://seika1.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 義史 (YOKOTA YOSHIFUMI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：50222386

(2) 研究分担者

黒岡 尚徳 (KUROOKA HISANORI)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：00293879

(H21→H23)

森 健太郎 (MORI KENTARO)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：50397296

(H21→H23)

美谷島 杏子 (BIYAJIMA KYOKO)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号：30552020

(H23)