

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21590405  
 研究課題名（和文） 潰瘍性大腸炎特異的新規遺伝子 CITED2 の腸炎発症・発癌機序に果たす役割  
 研究課題名（英文） Role of CITED2, a novel ulcerative colitis specific gene, to colitis and carcinogenesis.  
 研究代表者  
 吉田 功 (YOSHIDA TSUTOMU)  
 北里大学・医学部・講師  
 研究者番号：90316943

研究成果の概要（和文）：潰瘍性大腸炎では腸内細菌 *F. varium* が産生する酪酸が腸上皮細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになっている。我々は、酪酸刺激後の cDNA マイクロアレイ解析によって、CITED2 (CBP/p300-interacting transactivator with glutamic acid/asparagine-rich carboxy-terminal domain 2) が有意に発現誘導されることを見出した。CITED2 は CBP/p300 と結合することにより p53 のアセチル化によって p53 蛋白質を安定化し、その蛋白質量の増多が p53 依存性アポトーシスを誘導することが明らかになった。また、潰瘍性大腸炎の組織学的活動性と CITED2 発現が相関することも明らかになった。このことによって腸内細菌が産生する酪酸の局所的高濃度が CITED2-p53 系を介した腸上皮細胞アポトーシスを誘導し、上皮のびらんと炎症と増多を誘導する可能性が示された。同時に行った潰瘍性大腸炎炎症巣組織による cDNA マイクロアレイ解析からは炎症組織において olfactomedin 4 (OLFM4) の有意な発現誘導が認められ、その発現も潰瘍性大腸炎活動性と相関することが明らかになった。CITED2 と OLFM4 の炎症誘導における相互関連及び発癌機序を引き続き検索していきたい。

研究成果の概要（英文）：In ulcerative colitis, *Fusobacterium varium* is significantly detected in patients' mucosa, and butyric acid, abundantly produced by the bacterium, induces epithelial apoptosis. Here, we identified a gene induced by butyric acid specifically in ulcerative colitis-associated cancer cell lines. cDNA microarray and the validation study revealed CITED2 to be specifically upregulated. CITED2 could be shown to induce p53 acetylation and p53-dependent apoptosis, accompanied by binding of CBP/p300. In inflammatory foci of ulcerative colitis, histologically evident inflammatory activity and CITED2 expression were significantly correlated. On the other hand, we also found olfactomedin 4 (OLFM4) induced in the UC-patients' colonic mucosae, and its expression is correlated to the histological activity of UC. In conclusion, CITED2 was identified as ulcerative colitis-associated protein by cDNA microarray based on the Percellome method under UC-mimicking conditions *in vitro*. CITED2 activation may induce mucosal apoptosis and erosion by activating p53 and thus play a critical role in linking enteric bacteria with mucosal inflammation in ulcerative colitis. Further study of association of CITED2 and OLFM4 is remains to be clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：潰瘍性大腸炎、分子病理

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎発症機序に対するこれまでの知見と我々の関与  
大腸粘膜内では、マクロファージが細菌・ウイルス等の刺激を Toll 様受容体 (TLR) を介して受け、NF- $\kappa$ B 系を活性化することにより IL-6, TNF $\alpha$  等の炎症性サイトカインを発現することで炎症が誘導される自然免疫が働いている。NF- $\kappa$ B 系は cell survive にも寄与しており、腫瘍発生にも関わっていることが明らかになってきた。我々は東京慈恵医科大学・大草敏史と共同で UC 患者粘膜から *F. varium* を有意に検出し、同菌が産生する酪酸が高濃度で腸上皮細胞にアポトーシスを誘導することを示した (Ohkusa *et al. Gut*, **52**, 79, 2003)。研究代表者は酪酸が UC 関連癌由来細胞株 (当研究室樹立) で p53 依存性アポトーシス及び DNA 修復を誘導すること、UC 炎症巣上皮 p53 が活性化状態にあることを明らかにし (Yoshida, *et al. Int. J. Cancer*, 2006、我々が既に報告 (Yoshida, *et al. J. Pathol.* **199**, 166, 2003) した早期の p53 変異が UC 癌発生に極めて優位であることを示した。また、炎症巣陰窩上皮のマイクロダイセクションと細菌 16S rRNA 配列決定法を組み合わせることで UC 発症に関わる細菌同定を試み (Ishibashi, *et al. Kitasato Med. J.*, 2007、細菌叢の変化を明らかにしつつある。

### (2) 前回課題 (平成 18~20 年度科研費 基盤研究 (C)) で明らかにした知見

申請者は前年度までの基盤研究 (C) 課題において、腸上皮細胞が酪酸によって受ける影響を見出すため、酪酸刺激による UC 関連癌細胞株 (UCCA) 遺伝子発現変化を全ゲノム cDNA マイクロアレイで網羅的に解析し、通常型大腸癌細胞株と比較して UC 関連癌細胞株特異的に変化する遺伝子 CITED2 を同定した。哺乳動物発生過程で左右決定等に必須な遺伝子とされている CITED2 (CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail 2; 別名 Mrg1 or p35srj) は UCCA において酪酸処理により短時間で発現誘導され (前頁図 1)、それにより p53 のアセチル化を介した p53 蛋白質蓄積と p53 依存性アポトーシスを誘導を起こすことを初めて明らかにした (右図 2, 図 3)。これは酪酸トランスポーター MCT1 の阻害剤で抑制される、通常大腸腺癌由来細胞株では認められない UCCA 特異的な現象であった。CITED2 の酪酸刺激の如きストレス応答蛋白としての役割は不明であり、hypoxia 条件下で CBP/p300 を介するストレス

応答分子である HIF-1 $\alpha$  を抑制するという最近の報告があるが (Bakker, *et al. Mol. Cell* **28**, 941, 2008, Shin, *et al. Oncogene* **27**, 1939, 2008)、我々が得た酪酸誘導性 CITED2 の機能とは必ずしも一致しない。我々は UC 環境下での CITED2 特異的発現が腸上皮アポトーシスを誘導し、粘膜びらんをおこすことで間質が腸内細菌叢に曝露されてマクロファージの TLR - NF- $\kappa$ B 系を活性化するという、UC 炎症発症機序仮説を導いた。さらに、共同研究者・大草等は、*F. varium* は腸上皮細胞株に対して炎症性サイトカイン分泌を誘導することを明らかにしており、酪酸は (1) 腸上皮に対してアポトーシスを誘導→間質マクロファージ活性化、(2) 腸上皮の炎症性サイトカイン産生という炎症誘導への二相性の役割を有していることが考えられる

### 2. 研究の目的

UC 炎症発症機序を解明すべく、UC 炎症抑制治療法の開発を視野に入れ、以下を明らかにする。

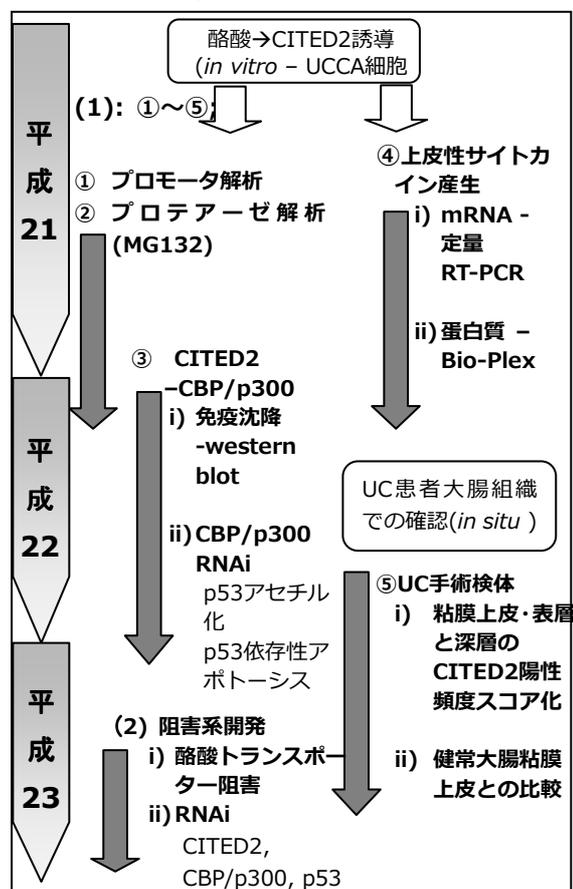


図4: 本研究計画のフローチャート

- (1) 酪酸によるCITED2発現誘導機序の解明とその炎症誘導への二相性役割(腸上皮へのアポトーシス誘導及び上皮性炎症性サイトカイン産生)の解明。
- (2) 酪酸-CITED2 経路阻害による炎症抑制誘導系の開発と UC 炎症・発癌抑制効果の確認。

### 3. 研究の方法

[研究計画要旨]

(1)酪酸による CITED2 発現誘導機序解析のために、①転写レベルでの発現誘導解析のためのプロモーター解析、②転写後蛋白質量調節(プロテアーゼプロセッシング)解析、③CITED2 による p53 アセチル化機序の同定(CBP/p300 との結合解析、CBP/p300 ノックダウンによる p53 アセチル化・アポトーシス動態解析)等を行い、また上皮性炎症誘導機能の解析として④酪酸刺激及び CITED2 誘導による上皮性炎症性サイトカイン産生を mRNA, 蛋白質レベルで証明し、その機序を特に NF- $\kappa$ B 系とのクロストークに着目して解析、⑤UC 患者大腸粘膜上皮における CITED2 発現の免疫組織学的評価、を各々行う。

(2)酪酸 - CITED2 - CBP/p300 - p53 経路に対して特異的な阻害系の同定を試みる。具体的には酪酸トランスポーター MCT1 の阻害、CITED2・CBP/p300・p53 の RNAi ノックダウンを行い、p53 依存性アポトーシス抑制を確認するとともに、炎症性サイトカイン産生抑制起点を見出し、分子標的薬の開発に繋げていく。

以上(1), (2)により、酪酸-CITED2 系の炎症誘導に対する二相性役割のメカニズムと、その阻害による炎症抑制系を見いだしてゆく。

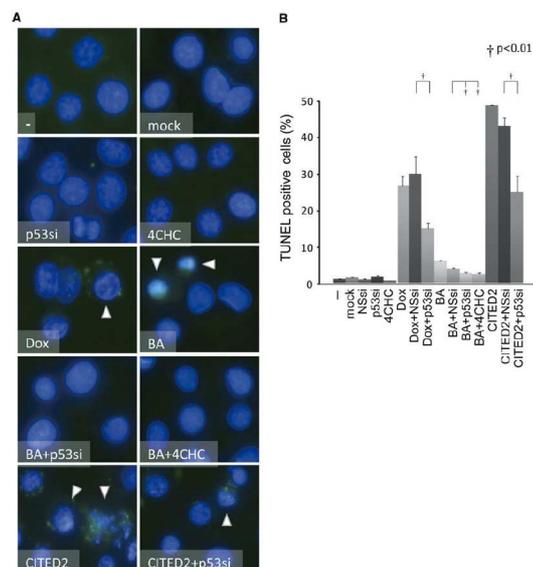
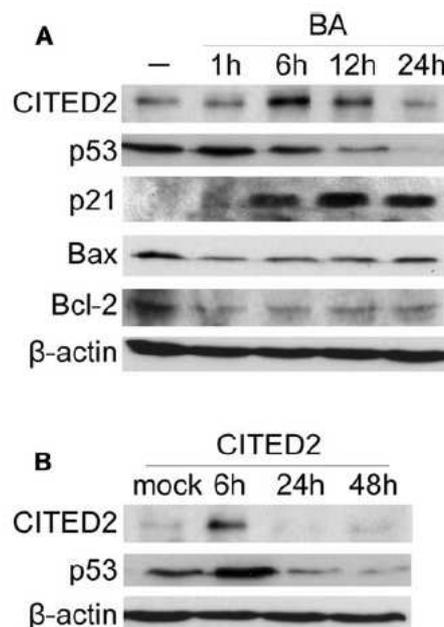
### 4. 研究成果

(1) 酪酸刺激による潰瘍性大腸炎 *in vitro* 疑似環境における上皮細胞の CITED2 誘導を、cDNA マイクロアレイ解析により新たに見出した(右表)。

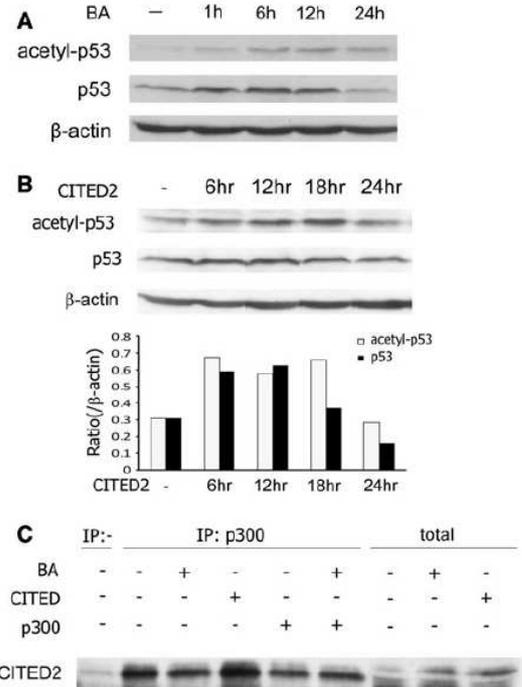
CITED2 発現は定量 RT-PCR によりその発現誘導を確認し、蛋白質レベルでの発現誘導も確認されると共に、p53 関連分子の発現誘導も見られ、p53 系との関連が考えられた(右中図)。

**Table 1** Genes upregulated by BA treatment only in the UCCA series

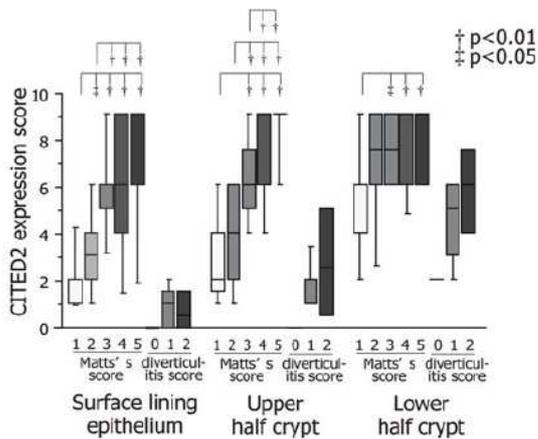
Probe set ID	Gene symbol	GenBank ID
237156_at	-	-
204567_s_at	ABCG1	NM_004915
210431_at	ALPPL2	J04948
200982_s_at	ANXA6	NM_001155
207980_s_at	CITED2	NM_006079
209357_at	CITED2	NM_006079
202806_at	DBN1	NM_004395
215506_s_at	DIRAS3	AK021882
211538_s_at	HSPA2	U56725
203752_s_at	JUND	NM_005354
208581_x_at	MT1X	NM_005952
201599_at	OAT	NM_000274
201364_s_at	OAZ2	AF242521
35666_at	SEMA3F	U38276
204141_at	TUBB2	NM_001069



酪酸及び CITED2 強制発現は有意にアポトーシスを誘導し、それは p53 siRNA によって抑制されることから、p53 依存性であることが明らかになる(前頁右下図)と共に、p53 をアセチル化すること、CBP/p300 と CITED2 の結合を誘導することが示された(下図)。



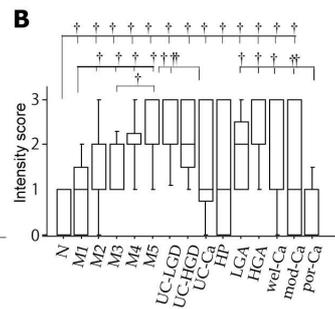
また、潰瘍性大腸炎患者を用いた病理組織学的解析では CITED2 発現と潰瘍性大腸炎の組織学的炎症活動性スコア(Matts' score)に有意な相関があることが示された。(下図)



これらにより、潰瘍性大腸炎上皮における腸内細菌由来酪酸が細胞内で CITED2 を発現誘導し、CBP/p300 と結合することによって p53 をアセチル化して安定化させること、またそれによって、p53 依存性のアポトーシスが誘導されることが示された(右図)。

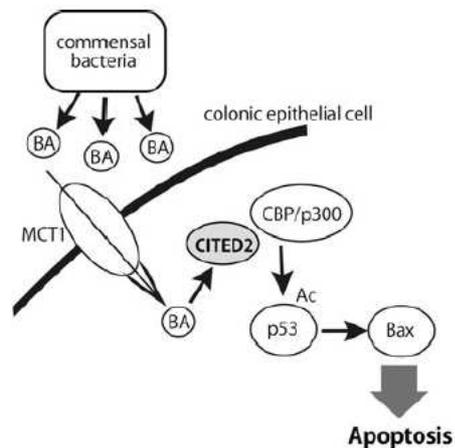
(2)潰瘍性大腸炎生検組織による検索をさらに行い、患者生検組織を健常者組織と比較す

ることにより、cDNA マイクロアレイによって、特異的に発現誘導する遺伝子群を見出し、その中に olfactomedin 4 (OLMF4) を見出した。



OLMF4 も潰瘍性大腸炎組織において発現誘導が認められ、潰瘍性大腸炎の組織学的活動性と相関することが明らかになった(左図)。

CITED2 は酪酸を介した上皮細胞アポトーシスを誘導することにより、UCにおけるびらん増悪機序に関わっていることが示唆される。(下図)



今後は、新規に同定した OLFM4 と CITED2 の関連についても検索をすすめていく。

### 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 Ichinoe, M., Mikami, T., Yoshida, T., Igawa, I., Tsuruta, T., Nakada, N., Anzai, N., Suzuki, Y., Endou, H., Okayasu, I. High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol Int* **61**(5), 281-289, 2011.
- ② Mikami, T., Yoshida, T., Numata, Y., Kikuchi, M., Araki, K., Nakada, N., Okayasu, I. Invasive behavior of ulcerative colitis-associated carcinoma is related to reduced

expression of CD44 extracellular domain: comparison with sporadic colon carcinoma. *Diag Pathol* **6**, 30, 2011.

- ③ Yoshida, T., Sekine, T., Aisaki, K., Mikami, T., Kanno, J., Okayasu I. CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid. *J Gastroenterol* **46**(3): 339-349, 2011.
- ④ Okayasu, I., Mikami, T., Yoshida, T., Hana, K., Yokozawa, M., Sada, M., Fujiwara, M., Kawada, N. Cytoglobin expression of rectal subepithelial myofibroblasts: Significant alterations of cytoglobin<sup>+</sup> stromal cells in long-standing ulcerative colitis. *Hist Histopathol* **26**, 679-688, 2011.
- ⑤ Umeto, H., Yoshida, T., Araki, K., Yagishita, H., Mikami, T., Okayasu, I. Appearance of epithelial and stromal genomic instability in background colorectal mucosa of sporadic colorectal cancer patients - relation to age and gender. *J Gastroenterol* **44**(10), 1036-1045, 2009.
- ⑥ Okayasu I., Yoshida, T., Mikami, T., Hana, K., Yokozawa, M., Araki, K., Mitsuhashi, J., Kikuchi, M., Adachi, E., Sada, M. Mucosal remodeling in long-standing ulcerative colitis with colorectal neoplasia: Significant alterations of NCAM plus or alpha-SMA plus subepithelial myofibroblasts and interstitial cells. *Pathol Int* **59**(10), 701-711, 2009.
- ⑦ Ohkusa, T., Yoshida, T., Sato, N., Watanabe, S., Tajiri, H., Okayasu, I. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol* **58**(5), 535-545, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉田 功、三上哲夫、沼田賀子、三枝信、岡安 勲: 潰瘍性大腸炎炎症関連

蛋白質 OLFM4 の炎症における役割. 第 100 回日本病理学会総会, 2011. 4. 30, 横浜 (日本病理学会会誌, **100**:126, 2011).

- ② 吉田 功、宮前結加、沼田賀子、鶴田智子、三上哲夫、岡安 勲: 網羅的解析によって得られた olfactomedin4 の潰瘍性大腸炎及び関連腫瘍における役割. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27, 東京 (日本病理学会会誌, **99**: 197, 2010).
- ③ 宮前結加、吉田 功、岡安 勲: Significance of gene expression and localization in active and inactive ulcerative colitis by comprehensive analysis. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009. 10. 3, 横浜.
- ④ 吉田 功、関根 司、相崎健一、宮前結加、沼田賀子、三上哲夫、菅野 純、岡安 勲: 潰瘍性大腸炎発症における CITED2-p53 系の役割 - 腸内細菌による新規粘膜上皮細胞 死誘導系の可能性. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都 (日本病理学会会誌, **98**:, 2009).
- ⑤ 丸 善明、吉田 功、田原あづさ、梅沢敦子、大草敏史、岡安 勲: 大腸腸内細菌による粘膜上皮性サイトカイン誘導-潰瘍性大腸炎・炎症機序との関連. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都 (日本病理学会会誌, **98**:, 2009).
- ⑥ 竹之内一政、吉田 功、遠藤 仁、岡安 勲: 大腸癌における L 型アミノ酸トランスポーター発現亢進の証明. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都 (日本病理学会会誌, **98**:, 2009).

[図書] (計 1 件)

- ① Isao Okayasu, Tsutomu Yoshida, Tetuo Mikami, Jun Mitsuhashi, Masaaki Ichinoe, Nobuyuki Yanagisawa, Wataru Tokuyama, Kiyomi Hana and Yuichi Ishibashi. Mucosal Remodeling and Alteration of Stromal Microenvironment in Ulcerative Colitis as Related to Colorectal Tumorigenesis. In *Ulcerative Colitis - Epidemiology, Pathogenesis and Complications*. (Mortimer B. O' Connor eds.) chapter 14, pp242- 256, In-Tech, Rijeka, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 功 (YOSHIDA TSUTOMU)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号 90316943

(3) 連携研究者

岡安 勲 (OKAYASU ISAO)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号 20014342