

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 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790688

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における病勢マーカーとしての Wnt-5a とその分子生物学的役割

研究課題名（英文） The role of Wnt-5a as the pathological marker of inflammatory bowel disease.

研究代表者

内山 和彦（UCHIYAMA KAZUHIKO）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50298428

研究成果の概要（和文）：

大腸のmyofibroblastからのWnt-5a発現に関しては大腸上皮細胞のHeat Shock Protein 25を抑制することが分かった。これは上皮細胞におけるbeta-cateninの核内移行を促進することが機序であることも明らかとなった。また、この抑制によって上皮細胞の増殖が促進された。この増殖促進はWnt-5aそのものの作用ではなく、上皮細胞内におけるHeat Shock Protein 25抑制によってもたらされることも証明された。大腸粘膜におけるWnt-5a発現に関して、正常および寛解期の潰瘍性大腸炎患者から得た大腸粘膜組織ではWnt-5a mRNA発現は低値であったが、活動期の潰瘍性大腸炎患者における大腸粘膜組織では有意にWnt-5a mRNA発現が増加していた。

研究成果の概要（英文）：

Colonic myofibroblast cells (VUPF) conditioned medium inhibited butyrate-induced Hsp25 expression and promoted butyrate induced cell proliferation. Mass spectroscopy of the active CM fraction implicated members of the Wnt-5a. Wnt5a expression was silenced *in vivo* by intramural injection with Wnt5a siRNA. At the site of injection, Hsp25 expression was increased along the entire length of the crypt in contrast to being only expressed by surface colonocytes in mice injected with scrambled siRNA. These findings were associated with decreased pericrypt MF Wnt-5a expression and decreased epithelial Ki-67 staining. When colonic crypt Hsp25 expression was increased through luminal lentiviral infection, Ki-67 staining was nearly absent. Wnt-5a mRNA expression of colonic mucosa from ulcerative colitis patients were significantly increased compared to normal control and remission stage of ulcerative colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	1,100,000	330,000	1,430,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：Wnt-5a、潰瘍性大腸炎、クローン病、myofibroblast、Hsp25

1. 研究開始当初の背景

これまでに発生の過程や、骨形成において Wnt-5a は重要な役割を果たしていることが報告されているが、大腸 crypt 下部領域での発現も確認されている (Holcombe, R.F., Mol Pathol 2002)。しかし Wnt-5a が大腸上皮細胞に及ぼす影響に関しては報告されていない。われわれはこれまでに大腸 myofibroblast による大腸上皮細胞 (YAMC 細胞) の遺伝子発現や増殖への影響について検討してきた。大腸 myofibroblast は大腸 crypt の下部 2/3 の上皮細胞周囲に隣接して存在しており、上皮細胞増殖の調節等様々な役割が報告されている。これまでのわれわれの検討で、大腸 myofibroblast から分泌される Wnt-5a が大腸上皮細胞における heat shock protein (Hsp) 25 の発現を抑制することが明らかになった。

Hsp25 は誘導性の Hsp であり、細胞に対する種々のストレス；熱ショック、pH 低下、フリーラジカル等により細胞内に大量に誘導される。主な役割はアクチンなどの細胞内骨格に結合して種々のストレスから細胞を保護することが知られているが、そのメカニズムやその他の作用など、未だに不明な点も多い。免疫組織染色の検討では、Hsp25 は恒常的に大腸上皮細胞に発現しているが、その発現は crypt 上層の細胞に限られ、crypt 中〜下層には Hsp25 の発現を認めない (Ren, H, Gastroenterology 2001)。これは、crypt 下部 2/3 に多く存在する myofibroblast が Wnt-5a を介して大腸上皮細胞の Hsp25 発現を抑制している、というわれわれの基礎検討の結果とも一致している。Hsp25 は細胞増殖を抑制すると

いう結果も得られており、Wnt-5a が Hsp25 の抑制を介して大腸 crypt 下部における上皮細胞の増殖を促進していることが示唆された。

2. 研究の目的

以上の背景、基礎研究結果を踏まえ、myofibroblast より分泌される Wnt-5a が大腸粘膜上皮細胞の分化・増殖に与える影響の分子機構を詳細に解析し、Wnt-5a 発現の意義を動物モデル、ヒト炎症性腸疾患において検討する本研究を企画した。

本研究では、2年間の研究期間内に以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) myofibroblast 由来の Wnt-5a が大腸上皮細胞の Hsp25 を抑制することで細胞増殖に関与しているのか
- (2) Hsp25 抑制作用以外の Wnt-5a の上皮細胞に対する作用
- (3) 炎症性腸疾患患者の大腸粘膜において、Wnt-5a 発現は増加しているのか、そしてそれは疾患の病勢と関連しているのか

以上の点を明らかにすることで、これまで炎症性腸疾患の大腸上皮細胞レベルでの病勢の把握は、組織学的に炎症細胞浸潤の程度によってなされてきた。しかし、Wnt-5a を上皮細胞レベルでの炎症性腸疾患の病勢マーカーに加えることにより、より正確かつ鋭敏な病態把握が可能となり、臨床における炎症性腸疾患の治療効果の判定、さらに治療方針の決定に大きく役立つと考えられる。

3. 研究の方法

本研究は (1) 細胞を用いた基礎実験、(2) マウスを用いた動物実験、(3) ヒトの臨床検体を用いた臨床検討それぞれについて行う予定である。細胞の基礎実験は YAMC 細胞とマウス myofibroblast を用い、細胞増殖、アポトーシス、そして細胞内シグナルを検討する。動物実験では DSS 腸炎モデルを用いて、腸炎における大腸上皮の Wnt-5a 発現を検討する。臨床検討では潰瘍性大腸炎やクローン病の炎症性腸疾患の患者の大腸粘膜生検組織での Wnt-5a 発現を検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸の myofibroblast からの Wnt-5a 発現に関しては大腸上皮細胞の Heat Shock Protein 25 を抑制することが分かった。これは上皮細胞における beta-catenin の核内移行を促進することが機序であることも明らかとなった。また、この抑制によって上皮細胞の増殖が促進された。この増殖促進は Wnt-5a そのものの作用ではなく、上皮細胞内における Heat Shock Protein 25 抑制によってもたらされることも証明された。

(2) マウス DSS 腸炎モデルにおいて大腸粘膜における Wnt-5a mRNA 発現は腸炎群において有意に上昇した。

(3) ヒト大腸粘膜における検討では正常コントロールと比べて、活動期の潰瘍性大腸炎患者の腸管粘膜における Wnt5a mRNA 発現は有意に上昇していた。また、寛解期の潰瘍性大腸炎患者の粘膜における Wnt-5a 発現は正常コントロールと同等であった。

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 3 件)

- (1) Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, et al., Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis. Am J

Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012 May;302(10):G1163-70.

- (2) Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, et al., FGF19 protects colonic epithelial cells against hydrogen peroxide. Digestion. 2011;83(3):180-3. Epub 2011 Jan 21.
- (3) Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, et al., Carbon monoxide enhance colonic epithelial restitution via FGF15 derived from colonic myofibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 1;391(1):1122-6. Epub 2009 Dec 11.

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Uchiyama K, Naito Y, et al., Myofibroblast-Derived Wnt5a Regulates Epithelial Cell Heat Shock Protein 25 Expression and Proliferation. The 1st JSGE International Topic Conference, 2010 年 9 月 25-26 日、鎌倉パークホテル、神奈川
- (2) Uchiyama K, Naito Y, et al., Myofibroblast-derived FGF15/19 protects colonic mucosa and enhances mucosal repair in IBD. DDW 2010, 5 月 1 日、New Orleans, USA
- (3) 内山和彦、内藤裕二他、大腸上皮細胞の Heat Shock Protein (Hsp) 25 発現抑制の意義に関する検討—大腸 Myofibroblast 由来 Wnt-5a の役割—第 5 回日本消化管学会総会、2009 年 2 月 12-13 日、京王プラザホテル、東京
- (4) 内山和彦、内藤裕二他、大腸上皮細胞の増殖における myofibroblast 由来 Wnt5a の Heat Shock Protein (Hsp)25 抑制効果とその意義、第 46 回日本消化器免疫学会総会、2009 年 7 月 23 日-24 日、松山全日空ホテル、愛媛

6. 研究組織

(1)研究代表者

内山 和彦 (UCHIYAMA KAZUHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50298428