

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：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890238

研究課題名（和文） miRNAによる腸管上皮細胞の恒常性維持とその機構の解明

研究課題名（英文） Epithelium-intrinsic microRNAs contribute to the mucosal immune homeostasis through ensuring epithelial cell differentiation

研究代表者

中藤 学 (NAKATO GAKU)

独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・特別研究員

研究者番号：20584535

研究成果の概要（和文）：

腸管上皮細胞の分化や恒常性維持における microRNA (miRNA) の役割を検討するため、ヒト腸管上皮培養細胞株 HT29-MTX 及び腸管上皮特異的 miRNA 欠損マウス (Dicer-KO マウス) を用いて様々な分子の網羅的発現解析およびパスウェイ解析を実施した。その結果、杯細胞や M 細胞の分化に影響を与える可能性のある候補 miRNA をいくつか見出した。また Dicer-KO マウスの腸炎の発症機構の検討を行い、本マウスが潰瘍性大腸炎の新規モデルになりうる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the mechanisms of intestinal epithelial cell differentiation and homeostasis by microRNA (miRNA), we performed microarray analysis of the goblet cell differentiated colon cancer cell line HT29-MTX and intestinal epithelium from control mice or intestinal epithelial cell specific deletion of *Dicer1* (Dicer-KO) mice. The data sets were analyzed by Ingenuity Pathway Analysis software and miRNA target prediction database. We found several microRNAs that might be involved in goblet cell or M cell differentiation. In addition, phenotype analysis of Dicer-KO mice indicated that these mice might be useful as an ulcerative colitis model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：microRNA、杯細胞、M細胞

1. 研究開始当初の背景

非コード RNA のひとつである microRNA

(miRNA) は遺伝子発現調節により様々な器官の発生や細胞の分化に重要な役割を担う。し

かし、免疫系においてmiRNAの研究はリンパ球などの血球系細胞に限局されており、非血球系細胞での機能や発現様式に関しては多くが明らかでない。また、miRNAと免疫関連疾患の発症との因果関係の研究も始まったばかりである。

腸管は体内にあるにも関わらず外界と直接つながっており、飲食などを介し、外来抗原に常に暴露される過酷な環境である。外界と体内の境界が多層から構成される皮膚と異なり、腸管は一層の上皮細胞でのみで区切られている。腸管上皮細胞は細胞同士の強固な接着により物理的バリアとして機能し、腸管関連リンパ組織とともにこの過酷な環境から宿主を守っている。粘膜面に沿って存在する腸管上皮細胞は、強固な細胞間結合により微生物の侵入を妨げ、ムチンと呼ばれる糖タンパク質を分泌して粘液層を形成し細胞を保護する。腸管の粘膜上皮層は、このようなバリアとして機能し粘膜上皮の大部分を占める絨毛上皮層(VE)と、粘膜上の抗原を取り込み免疫誘導組織に受け渡す濾胞上皮層(FAE)とに分けられる。前者には吸収上皮細胞を主体として、ムチンを分泌する杯細胞や、神経内分泌細胞が散在する。一方、後者には抗原の取り込みに特化したM細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が存在している。更に絨毛と絨毛の間に位置し、腸管上皮幹細胞が存在するクリプトの底部には抗菌ペプチドを産生するパネート細胞も存在する。これら腸管上皮細胞の分化機構の解明は腸管免疫系の理解にも重要と考えられるが、その制御メカニズムについては不明な点が多い。これまで、VEとFAEの間において、遺伝子の発現様式が大きく異なることが報告されている(Hase *et al.*, DNA Res. 2005)。

これらの発現様式の相違が腸管上皮細胞の構成の違いに貢献している可能性を考え、

その制御機構としてmiRNAの関与を予想した。実際に、FAEとVEにおけるmiRNAの発現様式の検討を行ったところ、2つの腸管上皮細胞層間でmiRNA発現様式が大きく異なっていた。さらに、腸管上皮細胞の分化におけるmiRNAの役割を調べるために、腸管上皮細胞特異的にmiRNAの成熟化に重要な役割を担う*Dicer1*遺伝子を欠損するマウス(以下Dicer-KOマウス)を作製し、表現型を解析した。その結果、杯細胞、パネート細胞の減少、M細胞の減少が見られ、これらの腸管上皮細胞の減少以外にも、腸管関連リンパ組織の異常も観察された。これらの知見はmiRNAが腸管上皮細胞の分化やその恒常性維持に重要であることを示唆するものであった。

Dicer-KOマウスは週令を重ねるとヒトの潰瘍性大腸炎(UC)に類似した症状の腸炎を起こす。UCなどの炎症性腸疾患は、ムチンなどの上皮バリアの障害による細菌の侵入が病因の一つであると考えられている。本マウスの腸管上皮層においても、杯細胞の顕著な減少に伴うムチンバリアの障害が認められており、この腸炎は杯細胞の分化異常が原因となり引き起こされると考えられた。

2. 研究の目的

microRNA(miRNA)は遺伝子発現を調節することで様々な器官の発生のみならず細胞分化に重要な働きを持つ。先行研究からmiRNAによる遺伝子発現制御が腸管上皮細胞分化やその恒常性維持に重要であることが示唆された。そこで、これらの関係性を明らかにすることを目的とし、以下の3つの課題に取り組んだ。

1. 腸管上皮細胞特異的*Dicer1*欠損マウス(Dicer-KOマウス)の表現型解析を通じて、腸管上皮細胞の分化や恒常性維持に果たす上皮性miRNAの役割を明らかにする。

2. 腸管上皮細胞の分化や恒常性維持関与する責任 miRNA を見出し、それにより制御される転写因子を明らかにする。

3. Dicer-KO マウスの解析から UC 発症機構解明を試み、上皮性 miRNA の発現と病態との関わりについて考察を進める。

3. 研究の方法

Dicer-KO マウスの最も特徴的な表現型は杯細胞と M 細胞の減少及び腸炎を発症することである。始めに、杯細胞の分化に影響を与えている miRNA を見出すため *in vitro*、*in vivo* の双方から検討を行なった。ヒト腸管上皮培養細胞株 HT29-MTX は集密状態で培養すると 1 週間後から杯細胞へ分化する。そこで、集密状態にしてから経時的に RNA をサンプリングし、細胞分化に伴い変動する miRNA をマイクロアレイにて解析した。加えて、野生型マウスから杯細胞の割合が高い大腸上皮細胞、杯細胞があまり多くない回腸上皮細胞を剥離回収し、miRNA マイクロアレイによる網羅的発現解析を実施した。これらのデータを統合し、杯細胞の分化への鍵となる候補 miRNA を絞り込んだ。次に miRNA 発現抑制レンチウイルスベクターを用い、候補 miRNA を欠損する HT29-MTX の作成を行った。杯細胞への分化の指標は杯細胞分化マーカーの発現、分泌されるムチン量の定量もしくは杯細胞染色法であるアルシアンブルー染色にて評価した。

Dicer-KO マウスは対象群マウスと比較して腸管関連リンパ組織の一つであるパイエル板の濾胞の数や大きさに異常が観察され、抗原を取り込む M 細胞の減少が見られた。そこで M 細胞を含む FAE を剥離回収、トランスクリプトーム解析を実施し、分子の発現を定量 PCR、ウェスタンブロット、免疫組織染色により確認した。更にトランスクリプトーム

解析により得られたデータを Ingenuity パスウェイ解析プログラム (IPA) を用いて解析し、どのような経路が影響を受けるかを検討した。次に、M 細胞の減少によるパイエル板への影響を評価するため、リンパ球を回収、染色しフローサイトメーターによる解析を行った。最後に M 細胞の分化へ影響を及ぼす miRNA を見出すため、トランスクリプトーム解析で変動のあった分子群を標的とする miRNA の探索を IPA や miRNA 標的予測データベースを用いて行なった。これらの情報と先行研究から得ていた野生型マウスの FAE に高発現する miRNA の情報を統合し、M 細胞の分化に影響をあたえる可能性のある候補 miRNA を絞り込んだ。

Dicer-KO マウスの腸炎の発症機構の解明に関しては細菌の腸管上皮細胞への侵入を細菌に共通する 16S ribosomal RNA を認識する蛍光プローブを用いた Fluorescence *in situ* hybridization 法により検討した。Dicer-KO マウスにおいて、腸炎を引き起こすまで経時的 (離乳直後から半年程度) に糞便を回収した。得られた糞便サンプルを用い、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法にて腸内細菌叢の変化を検討した。更に、ゲルからバンド切り出し、DNA を抽出後にシーケンス解析を行い、変動する細菌群を検討した。

4. 研究成果

2010 年 (平成 22 年度)

杯細胞の分化に関する miRNA を見出すため、集密状態にて杯細胞へと分化する HT29-MTX を用いて経時的な miRNA の発現の変化を検討した。その結果、杯細胞に分化に伴い発現が変動する miRNA を 41 個見出した。また、*in vivo* における miRNA の発現様式を検討するため、野生型マウスから杯細胞の割合の高い大腸上皮細胞と杯細胞の割合のあまり高くな

い回腸上皮細胞を剥離回収し、マイクロアレイ解析を実施した。双方から得られたデータを統合し、最終的に数個の miRNA が杯細胞の分化もしくは恒常性維持に関与する可能性を見出した。

Dicer-KO マウスではパイエル板を覆う特殊な上皮である濾胞関連上皮層 (FAE) に存在する M 細胞の異常を示唆する結果が得られていた。そこで実際に miRNA が M 細胞の分化や機能に異常を与えているのではないかと考えた。始めに M 細胞を含む FAE でトランスクリプトーム解析を行った。対照群マウスと比較し、Dicer-KO マウスにおいてこれまで報告のある M 細胞マーカーの減少が見られた。この結果は miRNA が M 細胞の分化に関与することを示唆するものであった。

本研究で用いた Dicer-KO マウスは週令を重ねるとヒトの潰瘍性大腸炎様の腸炎を発症する。そこでこの腸炎の発症機構の解明を試みた。始めに腸管上皮細胞への細菌の侵入を検討した。対照群マウスと比較し、Dicer-KO マウスでは陰窩付近にまで細菌の侵入が観察された。また、腸内細菌叢を比較したところ Dicer-KO マウスでは炎症性腸疾患の際に増殖してくるような細菌群が増加していた。

2011 年(平成 23 年度)

平成 22 年度に見出した知見に関してより詳細な解析を試みた。杯細胞の分化への関連が示唆された複数の miRNA の中で実際にどの miRNA が分化に寄与するのか検討した。miRNA 発現抑制レンチウイルスベクターを用いて特定の miRNA を欠損させた HT29-MTX を作成した。これらの HT29-MTX をフローサイトメーターによる細胞ソーティングにより miRNA 欠損安定株を樹立し、杯細胞への分化を検討した。その結果、候補 miRNA の中で 2 つの

miRNA 欠損株にて杯細胞への分化が抑制される傾向が観察された。このうち一つの miRNA はこれまでに報告のある杯細胞の分化に関連する分子を標的とすることが miRNA 標的予測データベースを用いた解析により明らかとなった。その一方で、予想とは異なり miRNA の欠損により、杯細胞の分化が促進するものもあった。

平成 22 年度に得られていた Dicer-KO マウスの FAE における遺伝子発現情報を IPA や miRNA 標的予測データベースで解析し、FAE で機能する miRNA を予測した。また、これらの情報に野生型マウスの FAE に発現する miRNA の情報を統合することで M 細胞の分化に影響をあたえる miRNA の同定を試みた。その結果、複数の転写調節因子を含む経路が miRNA により影響を受けることを示唆する知見が得られた。今後はこの経路をより詳細に検討することで M 細胞の分化に影響をあたえる miRNA を見出せる可能性がある。また、Dicer-KO マウスでは M 細胞の減少に伴う影響として胚中心の形成の異常が観察された。

これらの結果は特定の miRNA が腸管上皮細胞の分化に影響をあたえることを示したものであり、今後更なる研究により新たな粘膜免疫の理解に重要な役割を果たすと考えられる。また、Dicer-KO マウスが新規 UC モデル動物として有効なツールになる可能性を示すものである。

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 1 件)

Expression pattern changes and function of RANKL during mouse lymph node microarchitecture development

Machiko Sugiyama, Gaku Nakato, Toshi Jinnohara, Hisaya Akiba, Ko Okumura, Hiroshi Ohno, and Hisahiro Yoshida
Int Immunol. 2012 Feb 21(査読あり)

[学会発表] (計5件)

1. Gaku Nakato and Hiroshi Ohno
Title: Cellular prion protein on Peyer's patch M cells serves as an invasive receptor for *Bruceella abortus*
3rd Nagasaki Prion mini-symposium Japan; Jan 29 2012

2. Misaho Hanazato, Gaku Nakato, Fumiko Nishikawa, Koji Hase, Satoshi Nishikawa, Hiroshi Ohno.
Title: Identification of RNA aptamers targeting mouse GP2 protein by SELEX.
第34回日本分子生物学学会 横浜; 2011年12月13-16日

3. Gaku Nakato, Koji Hase, Michio Suzuki, Noriyuki Nishida, Motohiro Horiuchi, Manabu Ato and Hiroshi Ohno
Title: Cellular prion protein on Peyer's patch M cells serves as invasive receptor of a zoonotic pathogen *Bruceella abortus*
第40回日本免疫学会総会・学術集会; 2011年11月27-29日

4. 中藤学、長谷耕二、鈴木道雄、木村昌伸、新竜一郎、西田教行、度会雅久、今岡浩一、大野博司

M細胞に発現する内在性プリオンタンパク質は*Bruceella abortus*の取り込み受容体として機能する

第9回感染症沖縄フォーラム; 沖縄; 2011年2月10-12日

5. Gaku Nakato, Koji Hase and Hiroshi Ohno
Title: Distinct miRNA expression profiles of Follicle-associated epithelium (FAE) and villous epithelium (VE)
The 19th CDB Meeting RNA Sciences in Cell and Development Biology Kobe Japan; 10-15 May 2010

[図書] (計3件)

1. M細胞への腸内細菌取り込み機構
大野博司、長谷耕二、中藤学
分子消化器病 2011年6月 Vol. 8 No. 2
pp20-26

2. GPIアンカー型タンパク質を介した、M細胞抗原取り込み機構
長谷耕二、中藤学、大野博司
細胞工学 2011年4月 Vol. 30 No. 4 pp348-352

3. 特殊な腸管上皮細胞、M細胞上の細菌取り込みレセプター
大野博司、長谷耕二、中藤学
臨床免疫・アレルギー科 2010年7月 54巻1号
pp105-112

6. 研究組織
(1) 研究代表者
中藤 学 (NAKATO GAKU)

独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究

チーム・特別研究員

研究者番号：20584535