

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790789

研究課題名(和文)筋線維芽細胞制御に基づく腸管上皮細胞再生機構の基礎的検討

研究課題名(英文)Fundamental study for intestinal epithelial cell regeneration via regulation of subepithelial myofibroblasts

研究代表者

馬場 重樹 (BAMBA, Shigeki)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40422901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腸管上皮細胞直下の筋線維芽細胞の制御を行い、腸管上皮細胞の再生を促すこと研究目的とした。具体的には筋線維芽細胞に発現するDectin-1依存性にSchizophyllan (SPG)という α -1,3-D-galcanを担体としたFoxl1に対するアンチセンスDNA塩基配列を細胞内に導入することにより筋線維芽細胞の制御を行った。Dextran sulfate sodium (DSS)腸炎モデルにてFoxl1の阻害により体重減少を抑制し、腸管長・陰窩長の延長を認めた。以上より、Foxl1の阻害により著名な腸管上皮細胞の増殖が得られることが分かった。今後、短腸症候群への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed the regulation of subepithelial myofibroblasts to promote regeneration of intestinal epithelial cells. The regulation of subepithelial myofibroblasts is done by introducing an antisense oligonucleotide of Foxl1, which is known as mesenchymal transcription factor, via Dectin-1 using schizophyllan (SPG) as an antisense carrier. Inhibition of Foxl1 ameliorate body weight loss and significant increase in length of the colon and crypts in dextran sulfate sodium (DSS) colitis model. Clinical application of antisense Foxl1 coupled with SPG to short bowel syndrome is expected.

研究分野：内科学臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：腸管上皮再生 筋線維芽細胞 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮細胞と間葉系細胞との相互作用 (epithelial-mesenchymal interaction) について

以前は不可能であったマウス正常腸管上皮幹細胞の単独培養が近年可能となった (Nature. 2009 14; 459(7244): 262)。具体的には Matrigel を培養に用い、EGF, R-spondin1, Noggin を添加することにより、マウス腸管上皮細胞の長期単独培養系が確立された。しかし、極性を持った腸管上皮細胞の分化・増殖には、その足場となる間葉系細胞、特に筋線維芽細胞と上皮細胞との細胞間情報伝達 (epithelial-mesenchymal interaction) が重要であり、筋線維芽細胞が上皮幹細胞の分化・増殖に必要な環境 (niche) を提供していると考えられる。近年、Hedgehog シグナルが epithelial-mesenchymal interaction に重要であるとの報告がなされた (Gastroenterology. 2010 139(3): 893)。我々は Hedgehog シグナルの中でも Foxl1 という転写因子に着目している。Foxl1 は筋線維芽細胞などの間葉系細胞に特異的に発現し、Foxl1 ノックアウトマウスにおいて筋線維芽細胞の Wnt 発現亢進と上皮細胞の増殖亢進が報告されている (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 29(1): G163)。しかし、Foxl1 の *in vivo* における制御の報告はない。

Epithelial-mesenchymal interaction の解析について

我々は real time PCR と laser capture microdissection を組み合わせる手法を用い、epithelial-mesenchymal interaction の解析を行った。結果、Wnt2 は陰窩底部の筋線維芽細胞から、Wnt3 は陰窩底部の上皮細胞から、Wnt4 は頂部の筋線維芽細胞からの発現であることを確認した。この結果は *in situ* hybridization を用いた報告と合致する (Gastroenterology. 2005 129:626)。このように同じ筋線維芽細胞でも生理的には陰窩の基底側と頂部で異なる特性を有している。

間葉系細胞、特に筋線維芽細胞の制御に発現する Dectin-1 と Schizophyllan (SPG) を単体として Drug delivery system (DDS) について

自然免疫におけるパターン認識受容体として Toll 様受容体 (TLR) や C-type lectin の一種である Dectin-1 (別名 CLEC7A) が存在する。Dectin-1 は -1,3-D-gulcan の受容体であり、樹状細胞に発現が見られることが報告されているが、我々は筋線維芽細胞に Dectin-1 の発現が見られることを免疫染色で確認した。また、小腸筋線維芽細胞は大腸由来の筋線維芽細胞に比較しより多くの Dectin-1 の

発現が見られることを real time PCR で確認している。-1,3-D-gulcan は Dectin-1 を介して細胞内に取り込まれるが、我々は *in vivo* における塩基配列の細胞内導入に Schizophyllan (SPG) という -1,3-D-gulcan が有用と考えている。SPG はスエヒロダケから抽出される -1,3-D-gulcan で、日本では既に子宮頸癌の放射線療法の増感作用目的で薬価収載されている医薬品である。Sakurai らのグループから報告があるように、この -1,3-D-gulcan は三重らせん構造をとっており、その三本鎖のうち一本に DNA 塩基配列を組み込むことが可能である (Bioconjugate Chem. 2007 18:1280-76)。組み込ませる DNA 配列には 40mer 以上の poly A を付加し、設計段階で phosphodiester (PO) から phosphorothioate (PS) 化することにより DNA 配列自体の半減期を数分から 2 日間に延長でき、また、SPG との会合率が PS 化することによりほぼ 100% になることが分かっている。

2. 研究の目的

以下の三つを研究の目的とし、実施した。

Dectin-1 陽性細胞における免疫応答の網羅的解析

Wnt 遺伝子強制発現細胞株の樹立後にマウスへの Wnt 遺伝子強制発現株の移入

Foxl1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列と SPG とを会合させることにより複合体を作成。マウスへ投与を行う。

以上の実験を行うことにより、Wnt 関連分子や Hedgehog 関連分子の腸管上皮細胞の分化・増殖能に与える影響について検討を試みた。

3. 研究の方法

Dectin-1 陽性細胞における免疫応答の網羅的解析

雌性 C57/BL6 マウスの脾臓、腸間膜リンパ節より血球成分を抽出し、白血球分画を採取。その後、Dectin-1 陽性細胞を MACS[®] を用いた細胞ソーティング法にて選択的に分離した。分離細胞を培養。コントロール群と IL-1 刺激群、SPG 刺激群の 3 群を作成し、刺激後 6 時間後に RNA を抽出しマイクロアレイ法にて解析を行った。

Wnt 遺伝子強制発現細胞株の樹立後にマウスへの Wnt 遺伝子強制発現株の移入

筋線維芽細胞に強く発現する Wnt 関連分子として、Wnt2 と Wnt4 に着目し、クローニングを行った。その後、リポフェクション法を用い、筋線維芽細胞株へ遺伝子導入を行った。しかし、安定した遺伝子導入株の樹立が不可能であった。よって、Wnt 遺伝子強制発現株

の移入実験は行えていない。

Fox11 に対するアンチセンス DNA 塩基配列と SPG とを会合させることにより複合体を作成。マウスへ投与を行う。

(1) アンチセンス・SPG 複合体の作成

SPG を 0.25N の NaOH に溶かし(1 本鎖にするため) 2 日ほど放置

DNA 溶液(water)と 1 M Tris buffer (pH=7.6)を混和後、攪拌

SPG/NaOH 溶液を添加し攪拌する vortex し、完全に混合後、4°C で静置

(2) Fox11 に対するアンチセンス DNA 塩基配列を以下に示す。塩基配列は全て

phosphorothioate 化しており、さらに poly A tail を 40mer 負荷することにより SPG との会合高率が 100%になる。

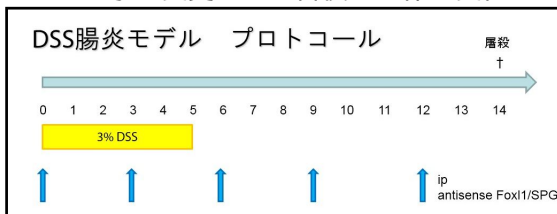
Fox11 アンチセンス

TGGAAAGTGTGAGTGGAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(3) 急性腸炎モデルの作成

DSS 腸炎モデル

以下に示すとおり、雌性 C57/BL6 マウスに 3% dextran sodium sulfate を自由飲水にて投与。5 日後に蒸留水に変更し 14 日後まで体重変化を



記録。14 日後に屠殺し、腸管重量や長さなどを検討した。

検討は以下の 3 群に対して行った。

一群は n=5 で施行している。

(I) DSS 単独投与群(以下、DSS 群)

(II) DSS 投与下に Fox11 アンチセンス DNA 塩基配列と SPG を会合させずに腹腔内投与を行った群(以下、非会合群)

(III) DSS 投与下に Fox11 アンチセンス DNA 塩基配列と SPG の複合体を腹腔内投与を行った群(以下、会合群)

4. 研究成果

Dectin-1 陽性細胞における免疫応答の網羅的解析

コントロール群と SPG 刺激、コントロール群と IL-1 刺激群との比較を行い、発現比率の増減幅が大きかったものをそれぞれ以下に示す。

SPG刺激にてDectin-1陽性細胞で発現が増強した遺伝子群

Description	Gene Symbol	Log2 Ratio
Apolipoprotein A-1	Apoa1	6.57
Olfactory receptor 533	Olfir533	6.35
lincRNA:chr3:125561319-125562132 forward strand		6.08
lincRNA:chr3:78982395-79094345 forward strand		5.69
3-oxoacid CoA transferase 2B	Oxct2b	5.68
lincRNA:chrX:34360500-34388500 forward strand		5.55
NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, clone: F630038K07	B930036N10Rik	5.49
lincRNA:chr6:99472981-99484210 forward strand		5.49
Keratin associated protein 903	Krtap9-3	5.47
RIKEN cDNA 4933428M09 gene		5.42

SPG刺激にてDectin-1陽性細胞で発現が減弱した遺伝子群

Description	Gene Symbol	Log2 Ratio
Olfactory receptor 1308	Olfir1308	-7.01
lincRNA:chr9:118060025-118085050 forward strand		-7.01
RIKEN cDNA 4933412O06 gene	4933412O06Rik	-6.78
lincRNA:chr7:137486825-137498500 forward strand		-6.65
Q4KXE0_WHEAT (Q4KXE0) Cold acclimation induced protein 2-1	Oxct2b	-6.63
lincRNA:chr5:118919606-118925333 reverse strand		-6.40
lincRNA:chr17:64063362-64066067 reverse strand		-6.38
lincRNA:chr1:44915250-44944125 reverse strand		-6.19
Nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2	Nmnat2	-5.99
lincRNA:chr8:60132300-60146830 forward strand		-5.92

IL-1β刺激にてDectin-1陽性細胞で発現が増強した遺伝子群

Description	Gene Symbol	Log2 Ratio
lincRNA:chr8:26343277-26352902 reverse strand		7.48
Transforming growth factor, beta receptor I	Tgfbri	7.04
MAS-related GPR, member A7	Mrgpra7	6.99
Interleukin 17F	Il17f	6.95
RIKEN cDNA 4930520K10 gene		6.75
0 day neonate eyeball cDNA,	Ntnng1	6.70
PDZ domain containing 7	Pdzd7	6.69
Adult retina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A930009L07	A930009L07Rik	6.54
F-box and WD-40 domain protein 14	Fbxw14	6.43
lincRNA:chr6:57560819-57569928 forward strand		6.32

IL-1β刺激にてDectin-1陽性細胞で発現が減弱した遺伝子群

Description	Gene Symbol	Log2 Ratio
lincRNA:chr9:118060025-118085050 forward strand		-7.42
RIKEN cDNA 4933412O06 gene	4933412O06Rik	-7.17
lincRNA:chr7:137486825-137498500 forward strand		-7.06
Q4KXE0_WHEAT (Q4KXE0) Cold acclimation induced protein 2-1	Oxct2b	-7.02
lincRNA:chr17:64063362-64066067 reverse strand		-6.84
lincRNA:chr1:44915250-44944125 reverse strand		-6.64
lincRNA:chr8:60132300-60146830 forward strand		-6.37
RIKEN cDNA 4931409K22 gene	4931409K22Rik	-6.28
Olfactory receptor 1308	Olfir1308	-6.10
Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	Arnt	-6.09

SPG 刺激において炎症惹起性の因子の大きな変動は認めなかった。また、IL-1 刺激にて、炎症性腸疾患などで近年着目を浴びている IL-17 発現の増強を認めた。

以上の結果は以前、我々が SPG 単独を健常マウスや DSS 腸炎マウスモデルへ投与することによる影響を特に認めていなかったことを裏付けるデータが得られ、SPG を担体として用いることによる免疫応答への影響は最小限と考えられた。

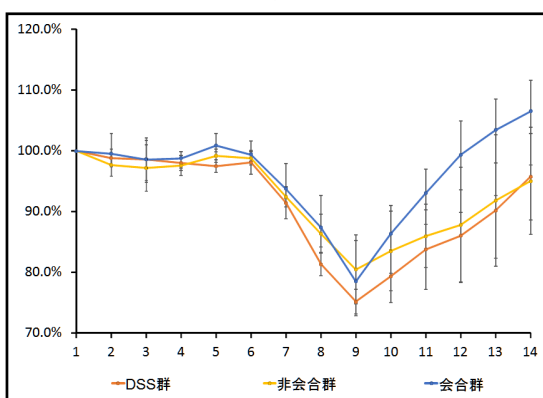
また、IL-17F については、炎症性腸疾患などの病態で Dectin-1 陽性細胞に強く発現して

いることが推察されるため、制御することにより病態に与える影響を検討する必要があると考えられた。

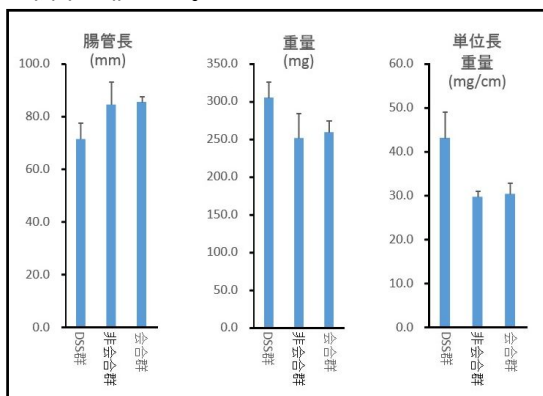
FoxI1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列と SPG とを会合させることにより複合体を作成。マウスへ投与を行う。

FoxI1 に対するアンチセンス DNA 塩基配列は SPG と会合させた群と会合させない群の 2 群を作り検討を行っている。

体重変化を以下に示す。DSS 投与により 3 群とも 9 日目をピークに体重減少を示している。しかし、その後の体重増加率が会合群において有意に高い結果が得られた。非会合群では会合群と当量の FoxI1 アンチセンス塩基配列が投与されているが、体重の回復率で良好な結果が得られなかった。

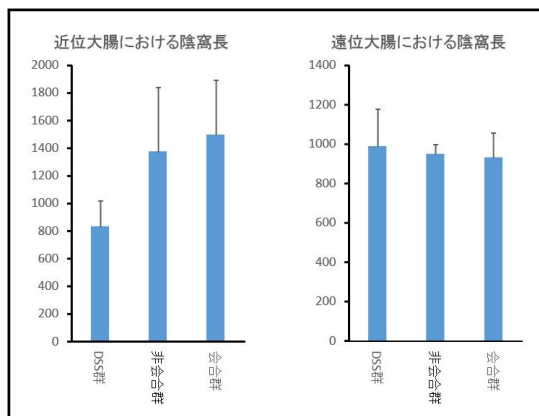


腸管長や湿重量についても検討を加えた。以下に示すように、非会合群と会合群において、DSS 群と比較し有意に腸管長の延長と湿重量の低下を認めた。



陰窩長については近位大腸の遠位大腸において計測を行った。以下に示すように、遠位大腸は 3 群間で大きな差は認めなかったが、近位大腸において、非会合群と会合群において DSS 群と比較し有意に陰窩長の延長を認めた。

以上より、FoxI1 を阻害することにより、腸管長の延長と陰窩長の延長が認められることが分かった。短腸症候群に対する治療選択としての臨床応用の可能性が期待されるため、今後、安全性の検討に加え、glucagon-like peptide-2 (GLP2) などとの比較実験を行いたい。



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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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]

特期すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 重樹 (BAMBA SHIGEKI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40422901