

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590452

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎バイオマーカーと治療標的としてのOLFM4の役割と分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of OLFM4 and the significance as an inflammatory biomarker and therapeutic target for ulcerative colitis

研究代表者

吉田 功 (Yoshida, Tsutomu)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：90316943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎(UC)の発症及び関連腫瘍発生機序解明のための網羅的解析で同定されたUCで発現上昇する分子olfactomedin-4(OLFM4)の解析を行った。今回、UC特異的なバイオマーカーであることを示した。

(1) OLFM4発現はUC及びクローン病に特異的に認められ、炎症性腸疾患特異的なバイオマーカーであると共に、(2)NF- κ Bによる転写誘導、(3) UCとクローン病での異なる発現機序、(4)腸上皮細胞でのOLFM4の向アポトーシス機能が示された。

以上から、炎症性腸疾患では腸内細菌異常に伴ってOLFM4発現による腸上皮細胞のアポトーシスが誘導され、バリア機能喪失が生じると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed olfactomedin-4(OLFM4), a molecule specifically upregulated in ulcerative colitis by the comprehensive analysis of UC and its associated tumorigenesis. We aimed to show that OLFM4 was a specific inflammatory biomarker for inflammatory bowel diseases (IBDs).

(1) OLFM4 was specifically expressed in UC and Crohn disease(CD), which shows that OLFM4 is a specific biomarker for IBDs. (2) OLFM4 is transcriptionally induced by NF- κ B, (3) with the different mechanism in UC and CD. (4) We also showed the possibility of pro-apoptotic function of OLFM4 in the enterocytes.

In IBDs, apoptosis of enterocytes would be induced by the expression of OLFM4, with the abnormality of enterobacterial flora, which might be the cause of dysfunction of barrier effects of enterocytes.

研究分野：人体病理学

キーワード：潰瘍性大腸 炎症性腸疾患 発現 炎症 OLFM4 olfactomedin-4 アポトーシス

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

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC)の炎症発症機序については、炎症性腸疾患(IBD)における Th17 細胞の関与(Duerr *et al. Science*, **314**, 1461, 2006)と、その産生する IL-17, IL-22 を介した炎症・防御機構が関与することが明らかになった(Kobayashi, *et al. Gut*, **57**, 1682, 2008)。また、Toll 様受容体(TLR) - NF-κB 系の活性化による IL-6, TNFα等による炎症誘導の役割も大きい。NF-κB 系は cell survive にも寄与しており、炎症誘導と腫瘍発生の 2 相性に関わっている。このことから、腸内細菌叢の異常や細菌腸管粘膜内免疫系の異常が UC 発症のみならず関連腫瘍発生に深く関わっていると考えられる(図 1)。

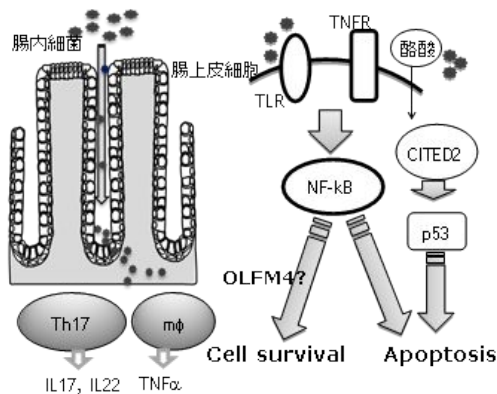


図 1 UC 腸上皮における知見. OLFM4 は UC で cell survival と NF-κB のリンク となる可能性がある。

我々は腸内細菌叢に着目し、UC 患者粘膜から *F. varium* を有意に検出し(Ohkusa *et al. Gut*, **52**, 79, 2003)、その産生する酪酸が UC 関連癌由来細胞株(UCCA)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た(Yoshida, *et al. Int. J. Cancer*, 2006)。また、UC 活動期と抗菌剤多剤併用療法後の腸内細菌叢の変化を炎症巣陰窩上皮の細菌同定により明らかにしてきた(Ishibashi, *et al. Kitasato Med J*, **37**, 76, 2007)。

(2) 前回課題(平成 21 ~ 23 年度基盤研究(C))で明らかにした知見

網羅的遺伝子解析により酪酸刺激した UCCA で特異的発現上昇を同定した CITED2 が、炎症活動性と相関して発現することと p53 依存性アポトーシスを誘導することを明らかにした(Yoshida, *et al. J Gastroenterol* **46**, 339, 2011)。腸上皮のアポトーシスが腸内細菌の粘膜内侵入を容易にして、炎症誘導に寄与すると考えられる。また、既に報告した早期の p53 変異が UC 癌発生に極めて優位に働くこと(Yoshida, *et al. J. Pathol.* 199, 166, 2003)を鑑みると、UC 炎症巣の腸上皮細胞で CITED2 を介した p53 の発現上昇が認められることは、UC では p53 変異が腫瘍発生に大きく寄与することが示唆される。これらの研究に基づき、我々は UC の炎症を継続的に抑制し続けるこ

とが、UC 患者の病態を安定させるにとどまらず、長期罹患に伴って発症する異形成-腺癌の発生を抑制することができるのではないかと考えている。

(3) 本研究に至る知見

代表者が UC 患者大腸粘膜組織における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析したところ、活動性 UC では非活動性 UC 患者及び健康者粘膜に比して有意に発現上昇する遺伝子が同定された。(Yoshida, *et al.* 投稿中)。その中で olfactomedin4(OLFM4)はこれまで腫瘍組織での発現が知られている蛋白質であり(Koshida, *et al. Cancer Sci*, **98**, 315, 2007, Oue, *et al. Int J Cancer*, 125, 2383, 2009)、炎症との関連は指摘されていない。今回、OLFM4 は UC 炎症巣で炎症活動性と相関した発現を示し(図 2)、炎症との関連が初めて明らかになると共に、UC における炎症活動性のバイオマーカーとしての可能性が示された。これまでに、OLFM4 は NF-κB によって発現誘導され、JAK-STAT 系によって発現誘導される GRIM-19 依存性アポトーシスを抑制することが腫瘍との関連において指摘されている(図 3)。UC の炎症機序で明らかになっている TLR - NF-κB 系や IL-6/STAT 系とも密接な関係があることは興味深く、UC 炎症の key molecule として NF-κB - OLFM4 が UC の抗炎症治療起点となる可能性や、cell survival との関連からは UC 関連発癌の予防起点となる可能性がある。

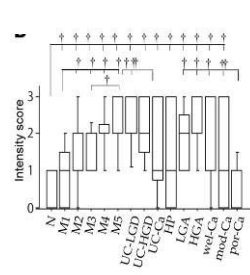


図 2 OLFM4 蛋白質発現は UC で炎症活動性 (M1 - M5) と相関する

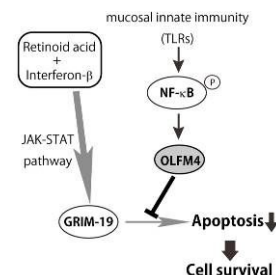


図 3 OLFM4 は UC で炎症活動性 (M1 - M5) と相関する発現を示す

2. 研究の目的

UC 炎症発症機序を解明とその抗炎症治療応用、関連腫瘍発症機序の解明と抗腫瘍化に寄与すべく、OLFM4 の UC における役割について、以下を明らかにする。

- (1) OLFM4 発現の UC 特異性とバイオマーカーとしての可能性 - IBD や他の炎症、腫瘍性病変との比較
- (2) UC における OLFM4 発現誘導・アポトーシス抑制分子機序の解明
- (3) UC 抗炎症・抗腫瘍化の治療標的としての可能性

3. 研究の方法

- (1) OLFM4 発現解析-1: OLFM4 発現の UC 特異性
- OLFM4 は通常の孤発性大腸癌を含めた諸臓

器由来の悪性腫瘍での発現上昇が報告されている。我々の予備的検索では、潰瘍性大腸炎炎症巣において、Matts' histological score(1~5)で評価した炎症活動性とOLFM4発現が相関することが明らかになっている。この炎症活動性との発現相関をUC炎症組織の免疫組織化学的検索で評価する。また、クローン病、虚血性腸炎、アメーバ腸炎、過敏性大腸炎(各20例)、健常人(10例)の腸粘膜におけるOLFM4発現をUCと比較し、OLFM4発現が各種の炎症で共通して誘導されるのか、UC特異的現象であるのかを検索する。予備的検索で、IBDの中でUCに特異的な発現の可能性を得ている。

●免疫組織化学、免疫蛍光染色等

(2) OLFM4発現機序解析 (担当: 吉田)

OLFM4はNF-κBによって発現誘導されるが、これをUC関連癌由来細胞株(UCCA)で証明する。具体的には、TNFα刺激によるTNF受容体を介したNF-κB活性化や lipopolysaccharide 刺激によるTLRを介したNF-κB活性化によるOLFM4発現誘導を定量RT-PCRやwestern blotで確認し、NF-κB inhibitorによる発現誘導効果の抑制を証明する。OLFM4遺伝子上流域を用いたレポーターアッセイ系を構築して確認する。

●定量RT-PCR, western blot, レポーターアッセイ等

(3) OLFM4発現解析-2: OLFM4のバイオマーカーとしての可能性

広島大学の安井・大上らは胃癌患者血清中のOLFM4発現と腸型胃癌における予後の相関を報告している(Oue, et al. Int J Cancer 125, 2383, 2009)。UC患者血清中のOLFM4をELISAで測定することにより、OLFM4のUC炎症活動性に対するバイオマーカーとしての可能性を検討する。臨床的な活動性及び非活動性UC患者各10例の血清中OLFM4をELISAで測定すると共に、その生検組織にて組織学的炎症活動性をMatts' histological scoreで評価し、OLFM4発現を免疫組織化学的及び新鮮生検組織からのmRNA定量(定量RT-PCR)で検討する。これにより、血清OLFM4値とUCの組織学的活動性の相関を見出し、OLFM4のバイオマーカーとしての可能性を明らかにする。UC患者血清は、北里大学東病院消化器内科の協力を得られる予定。良好な結果が得られた場合、UC患者血清を追加して解析する。

ELISA, 免疫組織化学, 定量RT-PCR等

(4) OLFM4機能解析: OLFM4のアポトーシス抑制機能

OLFM4はGRIM-19を抑制することにより、アポトーシスを阻害すると考えられる。GRIM-19はミトコンドリアに局在することから、UCCA細胞株を用いて、NF-κB刺激下でOLFM4とGRIM-19のco-localizationを免疫蛍光染色で確認する。またGRIM-19はレチノイン酸/interferon-γによって誘導されることから、GRIM-19誘導によるアポトーシス

をTUNEL法で評価し、これをNF-κB刺激が抑制するかどうかを検証する。良好な結果が得られれば、さらにこの抑制効果をsiRNAによるOLFM4 knock-downが打ち消すかどうかを検討し、OLFM4によるGRIM-19依存性アポトーシス抑制を証明する。また、我々が報告した酪酸刺激によるアポトーシス誘導をOLFM4が抑制するかどうかも検討する。OLFM4のアポトーシス抑制機能が明らかにならなかった場合、そのsiRNA knock-downによる細胞増殖能も評価し、その機能を明らかにする。また、免疫沈降-プロテオーム解析によりOLFM4と協働する分子の特定を試みる。免疫蛍光染色、TUNEL法、RNAi、免疫沈降-プロテオーム解析等

western blot, 定量RT-PCR, CBA/Jマウス, siRNAデリバリーシステム

4. 研究成果

(1) IBDの炎症活動性と関連したOLFM4発現

UCにおける炎症活動性をMatts'による組織活動性分類(M1~M5, Matts, Q J Med, 30, 393, 1961)、CDにおける炎症活動性を今回独自に上皮との関連を見出すために粘膜内を評価してCD1~CD4に分類し、OLFM4の発現と比較したところ、炎症活動性に関連したOLFM4発現を確認し、IBD特異的な炎症性バイオマーカーと確認された。

その際、OLFM4はUC, CDで共通して発現するものの、リン酸化NF-κB/p65及びその上流分子であるリン酸化IKKα/βはUCのみで発現上昇が見られた。

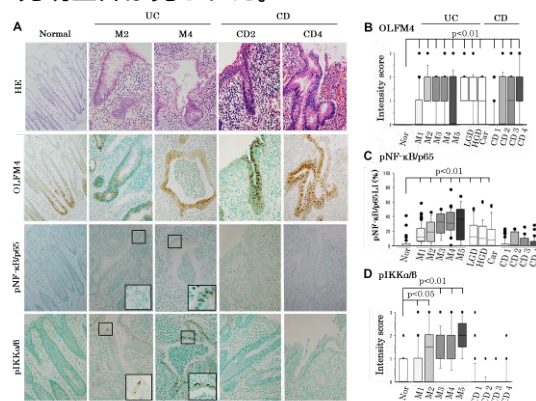


図4

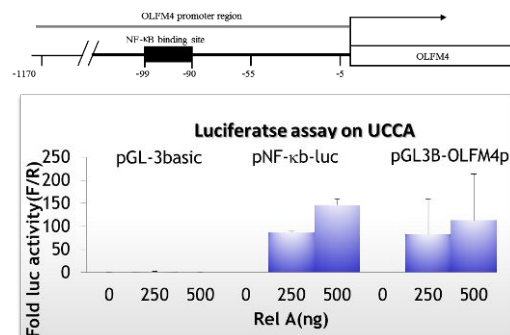


図5

(2) NF-κBによるOLFM4転写誘導

OLFM4は顆粒球系においてNF-κBによる

発現誘導が知られているが、腸上皮細胞においても NF-κB による OLFM4 の発現誘導をレポーターアッセイで確認した。

(3) UC と CD での異なる OLFM4 発現機序

(1)の結果から、IBD では共通の OLFM4 発現が認められるものの、UC と CD では異なる発現機序が見られる可能性が示唆された。そこで、OLFM4 プロモーター領域の NF-κB 結合領域の上流に AP-1 結合領域が存在することを鑑み、CD での AP-1 による発現誘導の可能性を検索した。その結果、CD ではリン酸化 c-Jun、リン酸化 JNK と炎症活動性及び OLFM4 発現との相関が認められる一方、UC

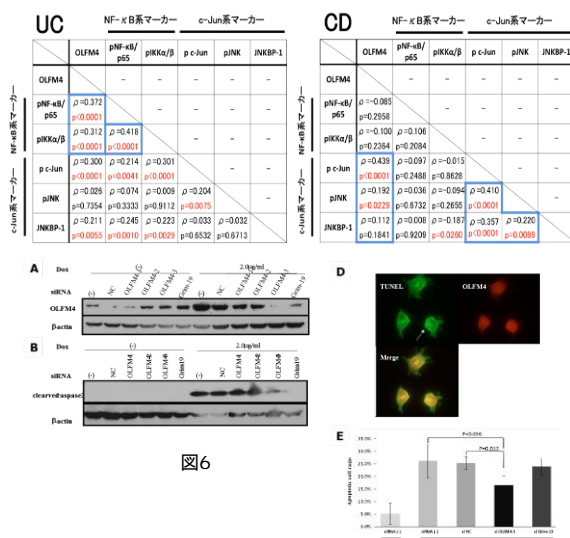


図6

ではそのような相関は認められなかった。

(4) 腸上皮での OLFM4 の向アポトーシス機能

OLFM4 は Grim-19 を介したアポトーシスを抑制することが報告されているが、腸上皮における機能を解析すると、UC 関連大腸癌由来細胞株に対して doxorubicin で誘導したアポトーシスに対して、siRNA による OLFM4 抑制によってアポトーシス及び cleaved caspase-3 が抑制された。これは OLFM4 発現による OLFM4 のアポトーシス誘導作用を示唆している。同時に、OLFM4 は LPS による刺激による発現誘導も示された。

このように、OLFM4 は UC と CD で異なる発現機序が考えられるものの、IBD 共通の炎症性バイオマーカーとしての有効性が示された。その機能は腸上皮では向アポトーシス作用が示唆され、腸内細菌以上による OLFM4 発現が腸上皮細胞のアポトーシスを誘導し、腸粘膜のバリア機能を破綻させ、炎症を更新する可能性が考えられた。

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 4 件)

Takahashi, H., Yoshida, T., Matsumoto, T., Kameda, Y., Takano, Y., Tazo, Y., Inoue, H., Saegusa, M. Frequent β -catenin gene mutations in atypical polypoid adenomyoma of the uterus. *Hum Pathol*, 査読あり, **45**(1), 33-40, 2014. doi: 10.1016/j.humpath.2013.06.020.

Nakada, N., Mikami, T., Hana, K., Ichinoe, M., Yanagisawa, N., Yoshida, T., Endou, H., Okayasu, I. Unique and selective expression of L-amino acid transporter 1 in human tissue as well as being an aspect of oncofetal protein. *Histol Histopathol*, 査読あり, **29**(2), 217-27, 2014.

http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_29/29_2/29_2_217.htm

Yoshida, T., Hashimura, M., Matsumoto, T., Tazo, Y., Inoue, H., Kuwata, T., Saegusa, M.

Transcriptional upregulation of HIF-1 α by NF- κ B/p65 and its associations with β -catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells. *Lab Invest*, 査読あり, **93**(11), 1184-1193, 2013. doi: 10.1038/labinvest.2013.111

Yoshida, T., Hashimura, M., Kuwata, T., Matsumoto, T., Suzuki, E., Tazo, Y., Nakajima, H., Inukai, M., Saegusa, M. Transcriptional regulation of the alpha-1 type II collagen gene by nuclear factor B/p65 and Sox9 in the chondrocytic phenotype of uterine carcinosarcomas. *Hum Pathol*, 査読あり, **44**(9), 1780-1788, 2013. doi: 10.1016/j.humpath.2012.12.019.

〔学会発表〕(計 6 件)

吉田 功、山本 渚、横田 章、大熊拓也、岡安 勲、三枝 信: 潰瘍性大腸炎腫瘍発生における炎症性バイオマーカー OLFM4 の役割. 第 103 回日本病理学会総会, 2014.4.26, 広島国際会議場(広島県・広島市)(日本病理学会会誌, **103(1)**:275, 2014)

横田 章、吉田 功、山本 渚、岡安 勲、三枝 信: 炎症性腸疾患バイオマーカー OLFM4 発現調節と潰瘍性大腸炎・クローン病の疾患特異性. 第 103 回日本病理学会総会, 2014.4.26, 広島国際会議場(広島県・広島市)(日本病理学会会誌, **103(1)**:275, 2014).

橋村美紀、吉田 功、三枝 信: 子宮内膜癌における HIF-1 α 遺伝子の転写制御機構: NF- κ B と β -カテニン系との相関について. 第 103 回日本病理学会総会, 2014.4.26, 広島国際会議場(広島県・広島市)(日本病理学会会誌, **103(1)**:373, 2014).

西 達也、高橋博之、橋村美紀、吉田 功、太田安隆、三枝 信: 悪性リンパ腫における細胞運動制御因子 FilGAP 発現の解析とその意義. 第 103 回日本病理学会総会, 2014.4.26, 広島国際会議場(広島県・広島市)(日本病理学会会誌, **103(1)**:358, 2014).

山本 渚、吉田 功、横田 章、岡安 勲、三枝 信: 潰瘍性大腸炎における OLFM4 発現誘導機序の解明とその意義. 第 102 回日本病理学会総会, 2013.6.7, ロイトン札幌(北海道・札幌市)(日本病理学会会誌, **102(1)**:440, 2013).

橋村美紀、田雑有紀、中島裕康、原 敦子、吉田 功、三枝 信: NF- κ B/Sox9 に

よる Col2A1 遺伝子発現制御を介した子宮癌肉腫細胞の軟骨分化誘導機構. 第 102 回日本病理学会総会, 2013.6.7, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/byouri-s.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 功 (YOSHIDA, Tsutomu)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 90316943

(2)連携研究者

三枝 信 (SAEGUSA, Makoto)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 00265711

岡安 勲 (OKAYASU, Isao)

北里大学・医学部・名誉教授

研究者番号: 20014342