

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670170

研究課題名(和文)糖ヌクレオチド輸送体による腸管機能制御の分子メカニズム

研究課題名(英文)Essential role of the nucleotide-sugar transporter Slc35d1 in intestinal homeostasis

研究代表者

平岡 秀一 (Shuichi, Hiraoka)

神戸薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：20291156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖ヌクレオチド輸送体Slc35d1は、コンドロイチン硫酸(CS)、ヘパラン硫酸合成の基質を細胞質から小胞体・ゴルジ体内腔へ輸送する。時期特異的にSlc35d1遺伝子を破壊できるマウス系統(Slc35d1-iKO)を作製、成体マウスで遺伝子破壊を行うと、重度の下痢、著しい体重減少により、実験開始から10日後に死亡した。腸管組織を分析したところ、絨毛形態に軽微な異常が生じる段階でCS含量が30%程度減少し、その後、絨毛が急速に縮退することが判明した。以上の観察から、Slc35d1は腸管ホメオスタシスに必要であり、CS合成の減少が腸管絨毛の機能不全を引き起こす可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The nucleotide-sugar transporter Slc35d1 transports the substrates for chondroitin sulfate (CS) and heparan sulfate from cytosol into lumens of Golgi apparatus and ER. To investigate in vivo role of the Slc35d1, we generated Slc35d1flox-Rosa CreERT mice (Slc35d1-iKO mouse), of which Slc35d1 gene could be artificially disrupted by the administration of tamoxifen (TXF). The Slc35d1-iKO mouse was dead within 10 days by the TXF administration, suffering from diarrhea. We observed the intestinal villous atrophy and 30% reduction of CS prior to morphological affection of villi. Based on these observations, we concluded that the Slc35d1 is required for intestinal homeostasis. It is likely that reduction of the CS in the Slc35d1-iKO mouse induced villous atrophy leading to lethal malnutrition.

研究分野：生化学、遺伝学

キーワード：糖ヌクレオチド輸送体 腸管機能 ホメオスタシス コンドロイチン硫酸

## 1. 研究開始当初の背景

糖ヌクレオチド輸送体 *Slc35d1* は、ゴルジ体膜、小胞体膜に局在し、コンドロイチン硫酸(CS)、ヘパラン硫酸(HS)合成の基質を細胞質から、これらのオルガネラ内腔へ運搬するトランスポーターである。この過程はこれらの糖鎖合成速度を規定する極めて重要なプロセスである。本研究の代表者は、*Slc35d1* 遺伝子ノックアウトマウスの作製・解析を起点とした研究から、*Slc35d1* を介した CS 合成が、ヒトおよびマウスの骨格形成に不可欠であり、この遺伝子の欠損がヒト骨系統疾患である蝸牛様骨盤異形成症の原因であることを明らかにした。代表者は、さらに、*Slc35d1* 遺伝子を改変し *flox* アレルマウスを作成、タモキシフェン(TXF)により活性化する Cre 組換え酵素をユビキタスに発現する *RosaCreERT* アレルと組み合わせ、任意の時期に *Slc35d1* 遺伝子を破壊できるモデルシステムを構築した [図 1. *Slc35d1(flox/flox)RosaCreERT* マウス；*Slc35d1-iKO* マウス]。

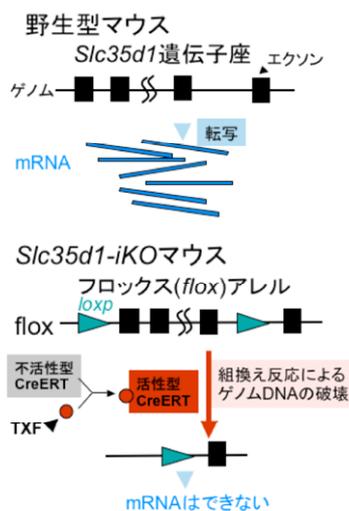


図1 *Slc35d1* 遺伝子の誘導破壊

このマウスの腹腔内へ TXF を投与し *Slc35d1* 遺伝子の破壊を誘導すると、重度の下痢を発症、体重の著しい減少を示し、9~10日後に死亡した。個体死に至るまでの機序を調べるため、死亡予定日の前日に *Slc35d1-iKO* マウスの腸管を採取し、組織化学的に分析したところ、小腸絨毛の構造が殆ど失われてしまう重篤な異常が認められた。この観察から、小腸機能の喪失が致死の原因と推察された。

腸管の機能には、(i)水分・栄養素の消化吸収、(ii)バリア機能(選択的物質透過、異物排除)、(iii)情報伝達機能(管腔からの刺激に対するホルモンやサイトカインの分泌)、等がある。これらの機能の制御機構を理解するためには、標的遺伝子の異なった遺伝子変異マウスを作製し、解析結果を比較検討する必要がある。糖ヌクレオチド輸送体のコンデンシ

ナルノックアウトモデルは、今のところ、*Slc35d1-flox* アレルを用いるこのシステムだけである。従って腸管機能の制御メカニズムの解明において、本研究は新しい分析視点を提供することが可能であり、研究の結果得られる知見は、腸管の機能制御の理解に貢献し、消化器疾患の発症機序の解明、治療法の開発に役立つであろうと考えられた。

## 2. 研究の目的

腸管のホメオスタシス維持には、上皮細胞が適切に分化・増殖することが必用である。Wnt や *Ihh* 等のモルフォゲン、サイトカインが上皮細胞の分化・増殖を制御している。従来の研究では、主にこれら可溶性因子のインパクトについての報告が多い。上皮細胞とストロマ細胞間には基底膜が存在し、CS や HS は基底膜の主要な構成成分である。これらの糖鎖は、上述の可溶性因子との相互作用により、腸管ホメオスタシスの維持に必用な、シグナル伝達を支える“ニッチ”である可能性がある。また、絨毛基底膜の HS が減少すると腸管バリア機能が顕著に低下するとの報告があり、炎症をともなう疾患との関連が考えられている。

*Slc35d1* は消化管に強く発現し、CS や HS 合成の材料供給を担当する分子であるので、*Slc35d1-iKO* マウスを作製し成体マウスの遺伝子破壊を誘導したところ、絨毛構造が殆ど損なわれてしまう劇的な変化が観察された。この結果から、HS や CS などの糖鎖がニッチ機能やバリア機能の発現に必要であり、*Slc35d1* はその合成をサポートする分子であるとの仮説が成立する。本提案は、*Slc35d1-iKO* マウスを利用し、*Slc35d1* 遺伝子破壊により誘導される絨毛構造の崩壊過程を分析することによって、腸管機能の発現における糖鎖機能を理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、TXF の投与で誘導される絨毛異常について、時系列を追って分析した。

8~12週齢の *Slc35d1-iKO* マウス腹腔内へ、体重 1g あたり 0.1mg の TXF を 1日1回、3日間投与し、遺伝子破壊を誘導した。経日的に腸管組織を採取し、組織化学的、生化学的、分子生物学的な分析を行った。

基底膜成分の組成(HS や CS、コラーゲン)、上皮・ストロマ細胞の細胞増殖、遺伝子発現の変化等に焦点を当て解析した。得られた情報を総合し、*Slc35d1* の欠損によって誘導される糖鎖合成の低下が、どの様に絨毛形態変化と機能変化をもたらすのか、異常発生の機序を推定した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 体重減少と絨毛構造異常との相関

TXF 投与による *Slc35d1* 遺伝子の破壊開始から、4 日目に体重が減り始め、その後急激に減少した。腸管組織を採取し、このプロセスにおける絨毛形態を分析した。TXF 投与後、4 日目には構造に若干異常のある絨毛が散見され、7 日目には絨毛形態が著しく縮退していた (図 2)。

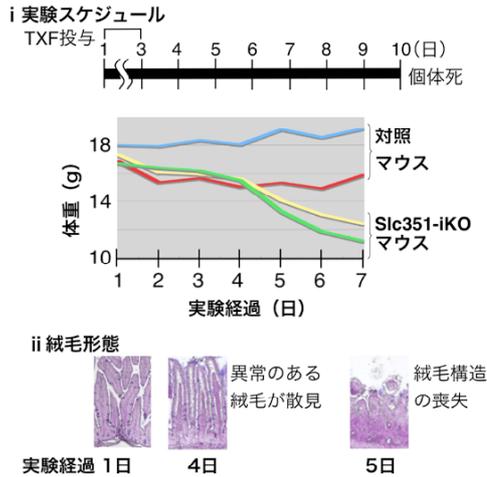


図2 遺伝子破壊後の体重減少と腸管絨毛形態の変化

この観察から、*Slc35d1* 遺伝子の誘導破壊から絨毛形態の喪失、個体死に至る過程を、次の三つのステージに分類し、解析することにした。

- ・ステージ I 遺伝子破壊の誘導からの 4 日間に腸管組織の質的な変化が起こる。
- ・ステージ II ステージ I の変化により絨毛形態の縮退が進行する。
- ・ステージ III 腸管ホメオスタシスが破綻し、個体死に至る。

### 4-2. ステージ I の分析

実験開始から 4 日目の小腸組織を採取し、二糖組成分析法により糖鎖組成を分析した。その結果、*Slc35d1-iKO* マウスでは、対照マウスのものに比べ、CS 含量が約 30%、HS 含量が 10%程度、減少していた (表 1)。

また、小腸標本を作成、免疫染色により、絨毛の主要な基底膜成分である IV 型コラーゲンやラミニン、の分布を調べた。*Slc35d1-iKO* および野生型の間に、顕著な違いは認められなかった。

不飽和二糖組成 (%)		
	<i>Slc35d1-iKO</i>	対照
ADi-CS	0.0	0.6
ADi-4S	81.0	78.8
ADi-6S	19.2	21.2
ADi-49S	0.0	0.0
ADi-diSD	0.0	0.0
ADi-triS	0.0	0.0
Total (pmol/mg)	100 (21.3)	100 (29.8)
AUA-GlcNAc	52.2	66.9
AUA-GalNS	13.5	10.5
AUA-GlcNAc6S	33.6	20.8
AUA-GlcNS6S	0.6	0.0
AUA2S-GlcNS	0.9	1.0
AUA2S-GlcNS6S	0.3	0.7
Total (pmol/mg)	100 (51.2)	100 (55.7)

表1 小腸サンプルの二糖組成分析

### 4-3. ステージ II の分析

腸管における炎症の発生は、下痢を引き起こし、絨毛形態の変化につながる事が知られている。*Slc35d1* 遺伝子破壊後、観察される下痢および絨毛形態の縮退は、腸管内での炎症によるものである可能性も考えられた。この点を明らかにするため、炎症サイトカインについて、遺伝子破壊から 5 日および 6 日目の小腸組織より RNA を抽出、cDNA 化し、定量 PCR により遺伝子発現を解析した。

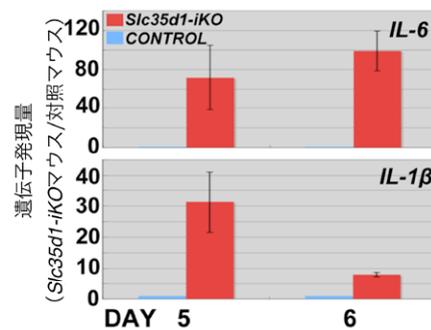


図3 炎症性サイトカインの発現

その結果、*Slc35d1-iKO* マウスでは、対照マウスに比べ、炎症性サイトカインである IL-6、IL- $\beta$  の発現が著しく増加していた (図 3)。

### 4-4. まとめと考察

以上の実験結果より、*Slc35d1-iKO* マウスで観察される個体死の発症機序を次の様に推定した。

ステージ I : *Slc35d1* の機能喪失により、糖鎖の合成が低下、特に CS 合成が低下する。  
 ステージ II : 糖鎖合成の低下により、小腸機能が低下、炎症が発生する。炎症により下痢

が発生、さらに、絨毛形態の縮退がおこる。ステージⅢ：腸管の消化吸収能が低下、個体生存に必用な腸管ホメオスタシスが破綻し、個体死に至る。

*Slc35d1* の欠損が、どのように炎症発生に結びつくのであろうか？

ステージⅠにおける糖鎖合成の低下が、粘膜層のバリア機能低下を引き起こし、炎症が発生した可能性が考えられる。この点については、ステージⅠにおける糞中アルブミンの測定を行い検証したが、対照マウスのもものと顕著な違いは無く、いまのところ、この可能性を支持する有力な証拠は無い。

一方、糖鎖修飾の減少により、細胞表層に分布する種々の受容体の機能が損なわれ、分化シグナルの伝達異常や免疫系細胞の活性化に異常が生じ、炎症につながった可能性も考えられる。前者については、ステージⅠで、腸管組織の遺伝子発現変化を定量PCRにより解析したが、炎症発生につながると考えられる遺伝子発現変化を見いだすことは出来なかった。

腸管組織から採取したサンプルでは、遺伝子破壊により機能異常をおこした細胞と機能が変わらない細胞の区別が出来ない。従って、分析結果は、機能異常をおこした細胞の状態を正確に反映していない可能性がある。この点を明確にする対策の一つとして、現在、腸管上皮細胞からオルガノイドを作製、*in vitro* 培養内で *Slc35d1* の遺伝子を破壊し、構成細胞の異常の有無について分析を行っている。また、糖鎖修飾に異常をきたした蛋白質分子を同定し、その機能がどのように変化したのかについても、今後、明らかにしなければならぬ課題である。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

平岡秀一、古関明彦、北川裕之。The nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is required for intestinal homeostasis 2014年11月25日 第37回日本分子生物学会年会 (横浜)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 秀一 (HIRAOKA, Shuichi)

神戸薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：20291156

(3) 連携研究者

長谷 耕二 (HASE, Koji)

慶応大学・薬学部・教授

研究者番号：20359714