

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460277

研究課題名(和文) パネート細胞でのタンパク質品質管理機構による腸管幹細胞の維持・分化・増殖への関与

研究課題名(英文) Involvement in maintenance, differentiation and proliferation of intestinal stem cells by protein quality control mechanism in Paneth cells

研究代表者

日野 真一郎 (Hino, Shinichiro)

中村学園大学・栄養科学部・准教授

研究者番号：00372699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチンリガーゼであるHRD1とWWP2の局在を検討した。HRD1は陰窩基底部のパネート細胞、間質の形質細胞、神経細胞に発現を認めた。一方、大腸においては上皮細胞に広く発現を認めた。WWP2の発現は、腸陰窩部の基底部やその周囲の上皮で強く発現し、上皮細胞が上部に移動するにしたがって発現の低下が認められた。大腸では、WWP2は、陰窩基底部から陰窩壁に広く発現が認められ、粘膜表層の上皮で発現が低下していた。ヒト大腸がん上皮細胞株Caco-2を用いてSox9の発現をノックダウンさせるとWWP2の発現が抑制されていたことから、WWP2の発現がSox9により制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the localization of ubiquitin ligases HRD1 and WWP2 in the intestinal tracts. In the small intestine, the expression of HRD1 was observed in the plasma cells, nerve cells, and Paneth cells. On the other hand, HRD1 was strongly expressed in all epithelial cells of the large intestine. The expression of WWP2 was strongly expressed in the basal intestinal crypt and its surrounding epithelium, and the expression decreases as the epithelial cells move to the upper part. In the large intestine, WWP2 was widely expressed from crypt base basal to crypt wall, and its expression was decreased in epithelium of mucosal surface layer. When Sox9 expression was knocked down using human colon cancer epithelial cell line Caco-2, the expression of WWP2 was suppressed. Therefore, it was revealed that expression of WWP2 in the intestinal epithelial cell is regulated by Sox9.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 腸管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管分化細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、腸管上皮内分泌細胞、パネート細胞）は、腸管上皮幹細胞が陰窩で自己複製し、分化・増殖しながら絨毛に移動することにより形成される。この幹細胞は Lgr5 陽性幹細胞とも呼ばれ、陰窩のパネート細胞の間に散在する。以前より腸幹細胞は Wnt により増殖が制御されていることが知られていたが、最近の報告から、パネート細胞が Wnt3 などの増殖因子を発現することで近傍の Lgr5 陽性幹細胞を制御していることが解明された。種々の解析から、Lgr5 陽性幹細胞が分裂後 2 つの幹細胞になり、パネート細胞が構成する微小環境(niche)に残った細胞のみが幹細胞能を保つことが最近明らかとなった。すなわち、抗菌物質の産生というこれまでの機能に加え、パネート細胞が幹細胞の維持・分化・増殖に必須の役割を担うことがわかってきた。パネート細胞の小胞体におけるタンパク質品質管理の重要性から、HRD1 ユビキチンリガーゼに着目した。HRD1 は、小胞体内の不良タンパク質をユビキチン-プロテアソーム分解に導く中心的な役割を果たしており、HRD1 ユビキチンリガーゼの分解制御異常と疾患発症との関連が注目されている。一方、HRD1 ユビキチンリガーゼのノックアウトマウスが比較的早期に胎生致死となることから、消化管の発生や組織分化における HRD1 の詳細な機能は不明である。

パネート細胞は種々の増殖因子の分泌を活発に行う細胞であり、タンパク質品質管理の重要性から HRD1 をはじめとするユビキチンリガーゼ群が腸管幹細胞の維持・分化・増殖に重要な役割を担っている可能性が高い。さらには、細胞を未分化に保つ機能をもつ転写因子 Sox9 が腸では腸陰窩基底細胞で発現し、パネート細胞の分化と幹細胞の維持・分化に関与することが示唆さ

れている。軟骨細胞では Sox9 の標的遺伝子に WWP2 というユビキチンリガーゼが存在し、タンパク質分解に関わるとともに、軟骨細胞で転写因子の共役分子として機能する。しかしながら、HRD1 および WWP2 の消化管での発現ならびにパネート細胞での役割は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、HRD1 および WWP2 の腸管上皮細胞における局在を明らかにし、これら分子のパネート細胞での役割を明らかにすることで、腸管幹細胞の維持・分化・増殖の制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

成熟マウスの腸陰窩基底部分における HRD1、WWP2、Sox9 の局在と発現量を組織形態学的に検討する。

正常マウス (C57BL/6) を用いて、siRNA を *in vivo* エレクトロポレーション法で腸管に直接導入し HRD1 をノックダウンさせ、腸管幹細胞の未分化能の維持・分化・増殖への影響を免疫組織化学的に解析する

酵母 two-hybrid法を用いて WWP2 に結合する因子のスクリーニングを行い、腸管特異的な新規の制御因子の同定を試みる。得られた候補遺伝子群のうち細胞の未分化能の維持・分化・増殖に関わる因子の同定を行う。

腸管陰窩基底部分の幹細胞の維持・分化に関与することが知られる Sox9 を *in vivo* エレクトロポレーション法によりノックダウンし、WWP2 と WWP2 分解基質の発現変動を解析する。腸管幹細胞の増殖や細胞死、細胞形態学的変化などへの影響を評価するとともに、WWP2 においては細胞質と核内での局在変化を観察し、WWP2 が転写因子の共役分子として働くかを検討する。

4. 研究成果

ユビキチンリガーゼ HRD1 の mRNA の組織内での発現を RT-PCR により解析した。大脳、肺、脾臓、精巣、肝臓、腎臓、大腸に高発現しており、多臓器に比べ発現は低い、小腸においても発現が認められた。免疫組織化学および *in situ hybridization* 法を用いた解析から、HRD1 は陰窩基底部のパネート細胞、間質の形質細胞、神経細胞に発現を認めたが、絨毛の吸収上皮細胞と杯細胞では発現が認められなかった。一方、大腸においては上皮細胞に広く発現を認めた。小胞体のストレスマーカーである GRP78 の腸管上皮細胞における局在は、HRD1 発現細胞と一致しておらず、消化管においては HRD1 の特別な発現制御機構の存在が示唆された。培養細胞に siRNA を導入し HRD1 のノックダウンに成功したが、マウスならびにラットのパネート細胞への *in vivo* エレクトロポレーション法による導入効率が低く評価には至らなかった。

WWP2 の mRNA の発現を RT-PCR により小腸および大腸で確認した。WWP2 の発現は、腸陰窩部の基底部やその周囲の上皮で強く発現し、上皮細胞が上部に移動するにしたがって発現の低下が認められた。大腸では、WWP2 は、陰窩基底部から陰窩壁に広く発現が認められ、粘膜表層の上皮で発現が低下していた。酵母 two-hybrid 法を用いて WWP2 に結合する因子のスクリーニングを行ったが、腸管特異的な新規制御因子の同定には至らなかった。ヒト大腸がん上皮細胞株 Caco-2 を用いて Sox9 の発現をノックダウンさせると WWP2 の発現が抑制されていた。したがって、消化管上皮細胞株において WWP2 の発現が Sox9 により制御されていることが明らかとなった。マウス消化管上皮での WWP2 発現は Sox9 の発現パターンと同一であることから、Sox9 が WWP2 の発現を介して、腸管上皮の分化を制御している可

能性が考えられた。

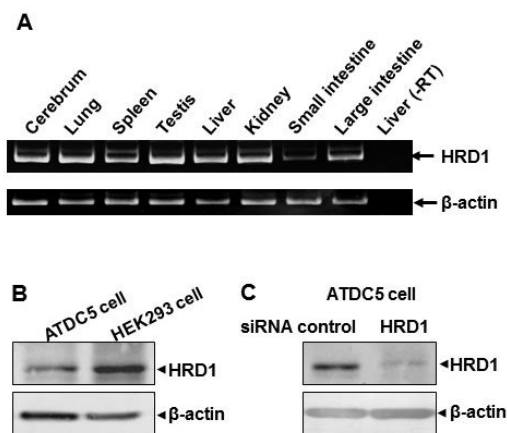


図 1 (A)HRD1 の各臓器における mRNA の発現、(B) ATDC5 細胞と HEK293 細胞での HRD1 タンパク質の発現、(C) ATDC5 細胞を用いた HRD1 のノックダウン

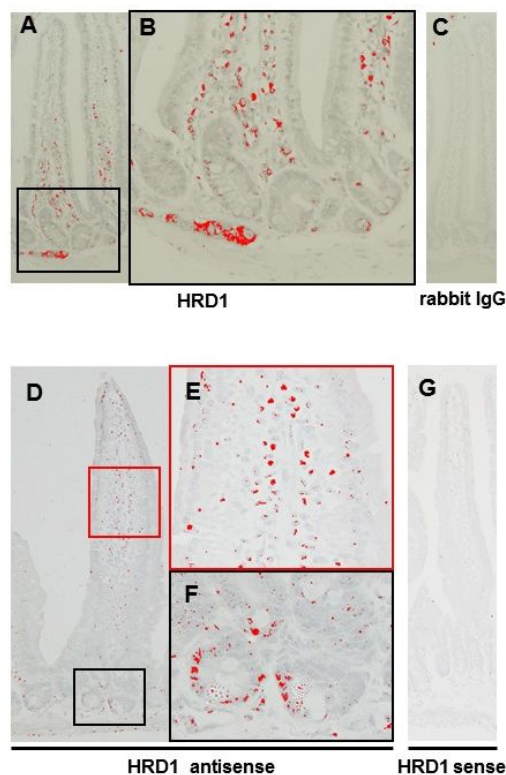


図 2 (A)小腸における HRD1 の免疫染色、(B)A のボックスの拡大像、(C)ネガティブコントロール、(D)小腸における HRD1 の *in situ hybridization*、(E)D の赤色ボックスの拡大像、(F)D の黒色ボックスの拡大像、(G)HRD1 の sense プローブによるネガティブコントロール

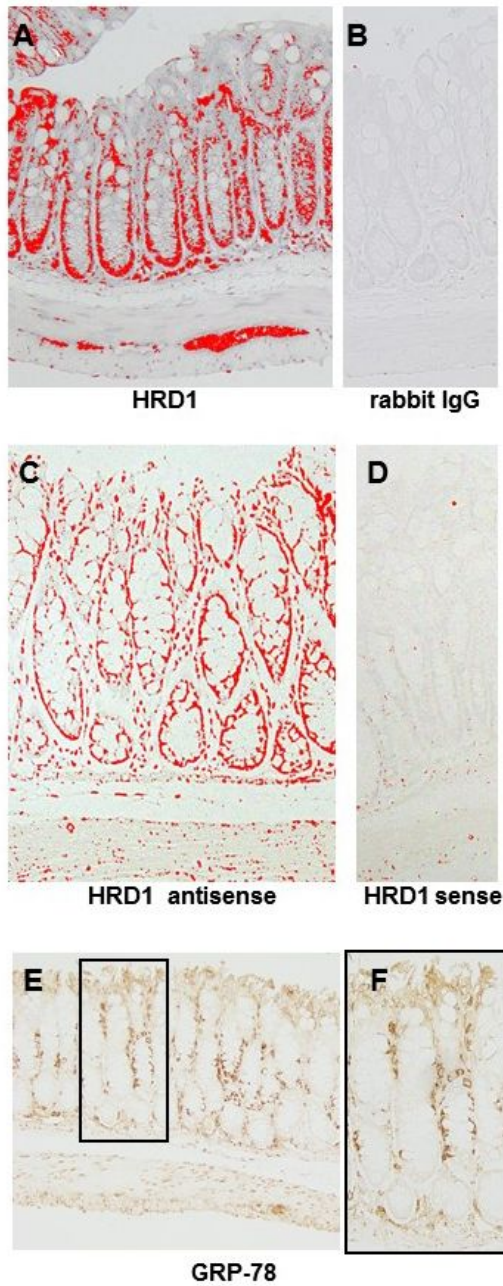


図 3 (A)大腸における HRD1 の免疫染色 (B)ネガティブコントロール、(C)大腸における HRD1 の in situ hybridization、(D) HRD1 の sense プローブによるネガティブコントロール、(E) 小腸における GRP78 の免疫染色 (F) E のボックスの拡大像

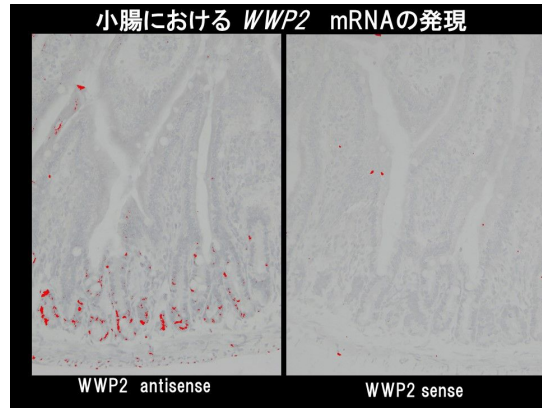


図 4 (左)小腸における WWP2 の免疫染色、(右)ネガティブコントロール

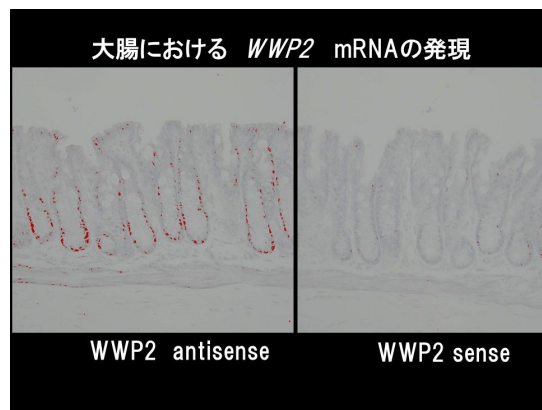
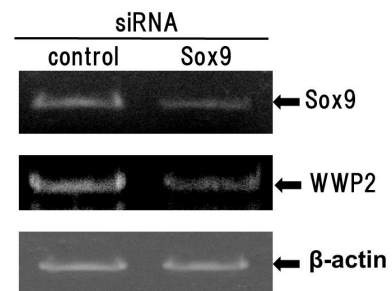


図 5 (左)大腸における WWP2 の免疫染色 (右)ネガティブコントロール

Effect of depletion of Sox9 expression on the WWP2 expression in Caco-2 cell



Caco-2: human epithelial colorectal adenocarcinoma

図 6 Caco-2 での Sox9 のノックダウンによる WWP2 発現低下

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)

Choi jookhuu N, Hino S-I, Oo PS, Batmunkh B, Hishikawa Y.: The role of estrogen receptors in intestinal homeostasis and disease. *Receptors Clin Investig.* 2016 Vol 3, No 1; doi: 10.14800/rci.1109 査読有

Hino S-I, Choi jookhuu N, Hishikawa Y. Gene expression analysis based on morphological science -Focusing on *in situ* hybridization method- *KENBIKYO* 50(1):39-47, 2015

http://microscopy.or.jp/archive/magazine/50_1/pdf/50-1-39.pdf 査読有

Choi jookhuu N, Hino S-I, Oo PS, Batmunkh B, Ali MN, Kyaw MTH, Hishikawa Y. Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor in mouse duodenal epithelium. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 39:499-507, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2015.01.004> 査読有

[学会発表](計10件)

Phyu Synn Oo, 日野真一郎, Choi jookhuu N, 菱川善隆: Estrogen regulates mitochondrial morphology through mitochondrial elongation factor (MIEF1) in human breast cancer cells: (シンポジウム). 「Second Myanmar Japan Symposium」2015.12.5~12.6 in パテイン大学 (ミャンマー)

Choi jookhuu N, 徐岩, 石塚匠, 日野真一郎, 菱川善隆: A new approach: FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization (研究会). 第34回分子病理学研究会, 神戸 ホテル フルーツ・フラワー 兵庫県神戸

市, (2015.7.25~26), 発表日 7/25

Phyu Synn Oo, 日野真一郎, Choi jookhuu N, 菱川善隆: Mitochondrial elongation factor (MIEF1) regulates mitochondrial morphology through estrogen in MCF7 (学会). 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 長崎大学医学部良順会館・ポンペ館 長崎県・長崎市 (2015.9.18-19) 発表日 9/18

Choi jookhuu N, 徐岩, 石塚匠, 日野真一郎, 菱川善隆: A new approach: FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization (学会). 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 長崎大学医学部良順会館・ポンペ館 長崎県・長崎市 (2015.9.18-19) 発表日 9/18

日野真一郎, Choi jookhuu N, Phyu Synn Oo., 菱川善隆: マウス消化管における WWP2 ユビキチンリガーゼの発現検討(学会). 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 長崎大学医学部良順会館・ポンペ館 長崎県・長崎市 (2015.9.18-19) 発表日 9/19

Choi jookhuu N, 徐岩, 石塚匠, 日野真一郎, 菱川善隆: FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization in paraffin embedded section (学会). 第56回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 関西医科大学 枚方キャンパス 大阪府・枚方市 (2015.10.3-4) 発表日 10/4

Choi jookhuu N, 徐岩, 石塚匠, 日野真一郎, 菱川善隆: FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization (学会). 日本解剖学会第71回九州支部学術集会, 熊本大学 本荘キャンパス 熊本県・熊本市 (2015.10.31) 発表日 10/31

Choi jookhuu N, 徐岩, 石塚匠, 日野真一郎, 菱川善隆: A new approach for in situ hybridization by FRET based

fluorescent probes (学会). 第 57 回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会 九州大学筑紫キャンパス 福岡県・春日市 (2015.11.21) 発表日 11/21

Phyu Synn Oo, 日野真一郎, 菱川善隆, : The possible role of MIEF1 in mitochondrial elongation by estrogen in MCF7(学会).第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター 東京市ヶ谷, (2014.10.17~18) 発表日 10/17

Phyu Synn Oo, 日野真一郎, Choi jookhuu Narantsog, 菱川善隆, : Mitochondria localization and morphology may be regulated by mitochondrial elongation factor 1 (MIEF1) through estrogen in MCF7(学会), 日本解剖学会第 70 回九州支部学術集会, 産業医科大学・ラマツィーニホール 福岡北九州市, (2014.10.25) 発表日 10/25
〔図書〕(計 1 件)

日野 真一郎 他、建帛社、人体の構造と機能：解剖生理学、2017 年 2 月 10 日発行

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日野 真一郎 (SHINICHIRO HINO)
中村学園大学・栄養科学科・准教授
研究者番号：00372699

(2)研究分担者

菱川善隆 (YOSHITAKA HISHIKAWA)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：60304276

研究分担者

チョウジョウフ ナランツオツク
(Choi jookhuu Narantsog)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：90640962