

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460953

研究課題名(和文) 消化管粘膜の恒常性維持における Reg 蛋白の役割

研究課題名(英文) Role of Reg protein on the maintenance of mucosal homeostasis in the gastrointestinal tract

研究代表者

福井 広一 (Fukui, Hirokazu)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60378742

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)：Reg 蛋白は粘膜上皮細胞と血管内皮細胞の増殖と抗アポトーシス作用に役割を果たし、非ステロイド性抗炎症薬起因性の消化管傷害において粘膜保護作用を有することが示唆された。さらには、Reg 蛋白が Sp1, Akt, ERK シグナルの活性化を介して消化管上皮細胞におけるタイト結合蛋白発現を増強すること、加えてその結果、細胞間バリア機能が増強することを見出した。腸内細菌叢が Reg 蛋白発現に重要な役割を果たし、その発現誘導された Reg 蛋白は免疫担当細胞のサイトカイン産生や分化に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reg protein plays a protective roles against NSAIDs-induced gastrointestinal injury by promoting cell proliferation and anti-apoptosis in the epithelium and endothelium in the gastrointestinal tissues. In addition, Reg protein stimulation increases the expression of tight junction proteins in the epithelial cells by activating Sp1, Akt and ERK signaling, resulting in the enhancement of intercellular barrier function. Gut microbiota plays a pivotal role in the expression of Reg protein, and the induced Reg protein may be involved in the cytokine production and differentiation in immune cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子 再生医学 臨床 感染症 免疫学

1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜の恒常性維持には、上皮細胞の増殖・再生のみならず病原体の侵入を防止するための粘膜バリア機能や免疫機能が重要である。我々はこれまで、Reg 蛋白が消化管組織の再生に役割を果たすことを報告し、他方で近年、Reg 蛋白に抗菌ペプチドとして消化管免疫に関与する可能性が示されている。これらの事より、Reg 蛋白が消化管粘膜の恒常性維持において多角的な役割を果たしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 消化管組織傷害における Reg 蛋白の粘膜上皮細胞および間質細胞に対する保護作用を明らかにすること。
- (2) 消化管粘膜透過性に関する Reg 蛋白の役割を明らかにすること。
- (3) 消化管免疫機構における Reg 蛋白発現の意義を明らかにすること。

3. 研究の方法

- (1) 消化管組織傷害における Reg 蛋白の粘膜保護作用

Reg 遺伝子改変マウスに非ステロイド性抗炎症薬を皮下投与し、消化管粘膜傷害モデルを作成した。胃から大腸までの消化管組織を摘出し、Reg ファミリー遺伝子の発現変化と病理組織学的因子(粘膜上皮細胞の増殖能・アポトーシスおよび組織傷害)の評価を行い、それらの関連を統計学的に解析した。

HUVEC 細胞を Reg 蛋白で刺激し、血管内皮細胞に対する細胞増殖作用と抗アポトーシス作用を検討した。さらには胃癌組織を用い、Reg 蛋白発現と血管内皮細胞の増殖の関連を検討した。

- (2) 消化管粘膜透過性に関する Reg 蛋白の役割

Reg 遺伝子改変マウスに FITC 標識デキストランを経口投与し、消化管粘膜透過性に及ぼす Reg 遺伝子の作用を評価した。消化管上皮細胞株を Reg 蛋白で刺激し、タイト結合蛋白発現とその細胞内シグナル伝達経路の活性化を Western 法で確認した。さらには、それぞれの経路で抗 Reg 蛋白抗体を用いて阻害実験を行った。加えて、Reg 蛋白の細胞間バリア機能に果たす役割を検討した。

- (3) 消化管免疫機構における Reg 蛋白発現の意義

Germ free マウスに SPF マウスからの便を移植したモデルと SPF マウスに抗生剤を投与したモデルを作成し、腸内細菌が Reg 遺伝子発現に及ぼす影響を観察した。マクロファージを Reg 蛋白で刺激し、サイトカイン産生能の変化を検討した。

4. 研究成果

- (1) 消化管組織傷害における Reg 蛋白の粘膜保護作用

Reg 遺伝子改変マウスでは、上部消化管における粘膜上皮細胞の細胞増殖能が野生型マウスに較べ減弱していた。また、非ステロイド性抗炎症薬を投与した場合、野生型マウスに比して Reg 遺伝子改変マウスでは、上部消化管における粘膜上皮細胞のアポトーシスが亢進し、著しく強い粘膜傷害が生じた。これらのことから、Reg 遺伝子は薬剤起因性粘膜傷害に対して粘膜保護作用を有する可能性が示唆された。Reg 蛋白は HUVEC 血管内皮細胞に対して細胞増殖作用と抗アポトーシス作用を

示し、胃癌組織では、腫瘍内血管の増生に関与する可能性が示された。Reg 蛋白発現と血管内皮細胞の増殖密度に相関を認めた。これらの所見から、Reg 蛋白が消化管粘膜保護において必要な血管内皮細胞の増殖・生存に役割を果たすことが示された。

(2) 消化管粘膜透過性に関する Reg 蛋白の役割

野生型マウスに比し *Reg* 遺伝子改変マウスでは経口投与された FITC 標識デキストランの消化管粘膜透過性が亢進していること、さらには、粘膜上皮細胞においてタイト結合蛋白である claudin 3 の発現が減弱していることが確認された。

Reg 蛋白刺激により消化管上皮細胞株における claudin 3 および claudin 4 発現が増強し、細胞間バリア機能も増強することを見出した。加えて、その発現誘導には、Sp1, Akt, ERK シグナルの活性化が関与することを明らかにした。それらの増強反応は抗 Reg 蛋白抗体を用いた阻害実験で抑制されたことから、Reg 蛋白が実際にタイト結合蛋白発現誘導を介して細胞間バリア機能を増強することが示された。

(3) 消化管免疫機構における Reg 蛋白発現の意義

通常の SPF マウスでは Reg 蛋白は小腸を中心に粘膜上皮細胞に発現するが、germ free マウスではその発現は減弱していた。しかしながら、SPF マウスの便を germ free マウスに移植したところ、消化管粘膜における Reg 蛋白発現は増強した。他方、PF マウスに抗生物質を投与して dysbiosis を惹起したモデルでは、Reg 蛋白発現は減弱した。これらのことから、腸

内細菌の中で Reg 発現に關与する特異的なスペクトラムが存在する可能性が考えられた。

マクロファージを Reg 蛋白で刺激したところ、IL-6 と IL-12 の産生が亢進し、Reg 蛋白が Naïve T 細胞の Th1 と Th17 細胞への分化に關与する可能性を見出した。

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 14 件)

Yang M, Fukui H, Eda H, Xu X, Kitayama Y, Hara K, Kodani M, Tomita T, Oshima T, Watari J, Miwa H. Involvement of gut microbiota in the association between GLP-1/GLP-1 receptor expression and gastrointestinal motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017, 312: G367-373. (査読有) DOI: 10.1152/ajpgi.00232.2016.

Sekikawa A, Fukui H, Sada R, Fukuhara M, Marui S, Tanke G, Endo M, Ohara Y, Matsuda F, Nakajima J, Henmi S, Saito S, Tsumura T, Maruo T, Kimura T, Osaki Y. Gastric atrophy and xanthelasma are markers for predicting the development of early gastric cancer. *J Gastroenterol* 2016, 51: 35-42. (査読有) DOI: 10.1007/s00535-015-1081-0.

Kitayama Y, Fukui H, Hara K, Eda H, Kodani M, Yang M, Sun C, Yamagishi H, Tomita T, Oshima T, Watari J, Takasawa S, Miwa H. Role of regenerating gene I in claudin expression and barrier function in the small intestine. *Transl Res* 2016, 173: 92-100. (査読有) DOI: 10.1016/j.trsl.2016.03.007.

Kawanaka M, Watari J, Kamiya N,

Yamasaki T, Kondo T, Toyoshima F, Ikehara H, Tomita T, [Oshima T](#), [Fukui H](#), Daimon T, Das KM, [Miwa H](#). Effects of *Helicobacter pylori* eradication on the development of metachronous gastric cancer after endoscopic treatment: analysis of molecular alterations by a randomised controlled trial. *Br J Cancer* 2016; 114: 21-29. (査読有) DOI: 10.1038/bjc.2015.418.

Sun C, [Fukui H](#), Hara K, Kitayama Y, Eda H, Yang M, Yamagishi H, Tomita T, [Oshima T](#), [Watari J](#), Takasawa S, Chiba T, [Miwa H](#). Expression of *Reg* family genes in the gastrointestinal tract of mice treated with indomethacin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015, 308: G736-744. (査読有) DOI: 10.1152/ajpgi.00362.2014.

Sun C, [Fukui H](#), Hara K, Zhang X, Kitayama Y, Eda H, Tomita T, [Oshima T](#), Kikuchi S, [Watari J](#), Sasako M, [Miwa H](#). FGF9 from cancer-associated fibroblasts is a possible mediator of invasion and anti-apoptosis of gastric cancer cells. *BMC Cancer* 2015; 15: 333. (査読有) DOI: 10.1186/s12885-015-1353-3.

[Oshima T](#), [Fukui H](#), [Watari J](#), [Miwa H](#). Childhood abuse history is associated with the development of dyspepsia: a population-based survey in Japan. *J Gastroenterol* 2015; 50: 744-750. (査読有) DOI: 10.1007/s00535-014-1014-3.

Hara K, [Fukui H](#), Sun C, Kitayama Y, Eda H, Yamasaki T, Kondo T, Tomita T, [Oshima T](#), [Watari J](#), Fujimori T, [Miwa H](#). Effect of REG I α protein on angiogenesis in gastric cancer tissues. *Oncol Rep* 2015, 33: 2183-2189. (査読有) DOI: 10.3892/or.2015.3878.

Kondo T, [Oshima T](#), Tomita T, [Fukui H](#), Okada H, [Watari J](#), [Miwa H](#). The

non-steroidal anti-inflammatory drug Diclofenac reduces acid-induced heartburn symptoms in healthy volunteers. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 1249-1255. (査読有) DOI: 10.1016/j.cgh.2015.01.014.

[Fukui H](#), Zhang X, Sun C, Hara K, Kikuchi S, Yamasaki T, Takashi Kondo T, Tomita T, [Oshima T](#), [Watari J](#), Imura J, Fujimori T, Sasako M, [Miwa H](#). IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. *Br J Cancer* 2014; 111: 763-771. (査読有) DOI: 10.1038/bjc.2014.336.

Sekikawa A, [Fukui H](#), Maruo T, Tsumura T, Okabe Y, Osaki Y. Diabetes mellitus increases the risk of early gastric cancer development. *Eur J Cancer* 2014; 50: 2065-2071. (査読有) DOI: 10.1016/j.ejca.2014.05.020.

Sekikawa A, [Fukui H](#), Maruo T, Tsumura T, Kanesaka T, Okabe Y, Osaki Y. Gastric xanthelasma may be a warning sign for the presence of early gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29: 951-956. (査読有) DOI: 10.1111/jgh.12512.

Shan J, [Oshima T](#), Farre R, [Fukui H](#), [Watari J](#), [Miwa H](#). IL-4 induces columnar like differentiation of esophageal squamous epithelium through JAK/PI3K pathway: possible role in pathogenesis of Barrett's esophagus. *Am J Physiol* 2014; 306: G641-649. (査読有) DOI: 10.1152/ajpgi.00386.2013.

Tozawa K, [Oshima T](#), Okugawa T, Ogawa T, Ohda Y, Tomita T, Hida N, [Fukui H](#), Hori K, [Watari J](#), Nakamura S, [Miwa H](#). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of Rebamipide for gastric mucosal injury taking aspirin with or

without Clopidogrel. Dig Dis Sci 2014; 59: 1885-1890. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

Xin Xu, Fukui H. Effect of gut microbiota on Reg III γ expression in relation to intestinal immunity. 5th Biennial Congress of Asian Neurogastroenterology and Motility Association. Mar 24, 2017. 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市)

福井広一. *H. pylori* 感染の GLP-1 発現と消化管運動に及ぼす影響について. 第 18 回日本神経消化器病学会 2016 年 9 月 10 日 北海道大学(北海道, 札幌市)

Kodani M, Fukui H. Alteration of gastrointestinal motility and mast cell behavior in mice after DSS-induced colitis. 2nd Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting. Aug 26, 2016. San Francisco, USA.

Fukui H. Effect of REG protein on the link between claudin expression and mucosal permeability in the small intestine. Digestive Disease Week 2016. May 24, 2016. San Diego, USA.

Yang M, Fukui H. Involvement of gut microbiota in the association between macrophage and gastrointestinal motility. Digestive Disease Week 2016. May 22, 2016. San Diego, USA.

福井広一. 潰瘍性大腸炎における REG 蛋白のバイオマーカーとしての可能性について. 第 102 回日本消化器病学会総会 2016 年 4 月 21 日 京王プラザホテル (東京都, 新宿区)

福井広一. 潰瘍性大腸炎における REG 蛋白の臨床応用に関する可能性について. 第 103 回日本消化器病学会近畿地方会 2015 年 9 月 26 日 大阪国際交流セン

ター(大阪府, 大阪市)

Tozawa K, Fukui H. Serum Reg I α is a marker to predict histological and clinical activity in ulcerative colitis. Digestive Disease Week 2015. May 17, 2015. Washington, USA.

Kitayama Y, Fukui H. Effect of REG protein on mucosal permeability and adhesion molecule expression in the small intestine. Digestive Disease Week 2015. May 17, 2015. Washington, USA.

Sakamoto H, Fukui H. Involvement of STAT3 activation in the development of early gastric cancers. The Asian Pacific Digestive Week 2014. Nov 25, 2014. Bali, Indonesia.

福井広一. NSAID 起因性消化管粘膜傷害における Reg 蛋白の役割. 第 56 回日本消化器病学会大会 2014 年 10 月 23 日 神戸国際展示場 (兵庫県, 神戸市)

福井広一. 胃炎—胃癌相関における STAT3 シグナル活性の意義について. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 24 日 東京フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 広一 (FUKUI, HIROKAZU)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60378742

(2) 研究分担者

三輪 洋人 (MIWA, HIROTO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80190833

渡 二郎 (WATARI, JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10311531

大島 忠之 (OSHIMA, TADAYUKI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00381814

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()