

# 北里大学大学院獣医学系研究科

## 博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2023年2月16日

### 学位論文題目

大腸炎および大腸炎誘発腸腫瘍における mitotic spindle positioning (MISP) の機能解析

氏名 日裏 剛基 所属 獣医学専攻 実験動物学

審査委員 主査 北里大学 教授 折野 宏一



副査 北里大学 教授 吉岡 一機



副査 量子科学技術研究開発機構 上席研究員 小久保 年章



副査 北里大学 准教授 鎌田 亮



審査の結果

合格

最終試験の成績

優

## 最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨 お よ び 担 当 者

学位申請者	日 裏 剛基 (DV19001 実験動物学)			
学位論文題目	大腸炎および大腸炎誘発腸腫瘍における mitotic spindle positioning (MISP)の機能解析			
担 当 者	主 査	北里大学	教授	折野 宏一
	副 査	北里大学	教授	吉岡 一機
	副 査	量子科学技術研究開発機構	上席研究員	小久保 年章
	副 査	北里大学	准教授	鎌田 亮

**成績：優**

### 最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

審査員一同は、論文提出者に対し、2023年2月16日、その論文内容および関連事項について詳細な質疑を行った。その結果、論文提出者は博士（獣医学）の学位を受けるに相応しい学識と能力を有するものと認め、優と判定した。

## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	日裏 剛基 (DV19001 実験動物学)			
学位論文題目	大腸炎および大腸炎誘発腸腫瘍における mitotic spindle positioning (MISP)の機能解析			
担当者	主査	北里大学	教授	折野 宏一
	副査	北里大学	教授	吉岡 一機
	副査	量子科学技術研究開発機構	上席研究員	小久保 年章
	副査	北里大学	准教授	鎌田 亮

## 論文審査の要旨

炎症性腸疾患 (IBD)はクローン病 (CD)と潰瘍性大腸炎 (UC)に分類され、腸管粘膜の慢性炎症は発がんのリスクも増大させる。IBD では、炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスの崩壊が慢性大腸炎を引き起こす。また、IBD の原因遺伝子の特定には至っていないが、ゲノムワイド関連解析によって *JAK2*、*STAT3*、*IL-10* などが同定されている。最近では約 200 の遺伝子座位が IBD に関与しているとされ、その大部分が CD と UC で共通している。これらの多くが炎症に関与する遺伝子産物と推定されているが、現在まで、腸上皮の増殖・分化・細胞死に関与する遺伝子産物にフォーカスした研究は乏しい。

アクチン結合タンパク質である mitotic spindle positioning (MISP)は、有糸分裂と紡錘体の位置決めに関与している。ヒトにおいて MISP は大腸に高発現しており、特に腸管上皮細胞の頂端膜に発現する。MISP の機能としては微絨毛の根端部におけるコアアクチン束の安定化・伸長に

関与し腸管粘膜の維持に関わることが示唆される一方、大腸の疾患との関連は全く報告されていない。本研究では MISP と大腸炎の関与について、さらには大腸炎に誘発される腸腫瘍との関与について検証を行った。

## 第一章：大腸炎に関わる MISP の機能解析

本章では、広く用いられているデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与による大腸炎モデルマウスを用いて、MISP と大腸炎の関連について検証した。最初に 3%DSS 投与による急性大腸炎を誘発し、大腸での MISP のタンパク質発現量を検証した結果、DSS 非投与マウスと比較して約 3 倍の増加が認められた。次に、*Misp* ノックアウト (KO) マウスを作製し、急性大腸炎の誘発を行い、体重変動比や便性状から炎症の重症度をスコアリングした結果、WT マウスと比較して *Misp* KO マウスでは大腸炎の著しい増悪が認められた。組織学的解析においても *Misp* KO マウスでは、炎症による大腸陰窩部の消失割合において有意な増加を示した。また、免疫組織化学染色によって、細胞増殖マーカーである Ki-67 を染色した結果、*Misp* KO マウスでは Ki-67 陽性細胞の数が減少傾向にあり、細胞増殖能の低下が示唆された。IBD では炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスの重要性が示唆されているため、RT-qPCR によって大腸における炎症性サイトカインの発現を解析した。抗炎症性サイトカインである *Il-10*、*Tgf- $\beta$ 1* が WT マウスと比較して *Misp* KO マウスで有意な低下が認められた。特に *Tgf- $\beta$ 1* については DSS 投与の有無に関わらず有意な低下を示した。

これらの結果は MISP が抗炎症作用と増殖作用を通じて、炎症後の大腸の回復に関与する可能性を示しており、MISP が IBD の新たな治療標的となる可能性を示唆する。

## 第二章：大腸炎誘発腸腫瘍における MISP の機能解析

慢性大腸炎症は発癌のリスク因子であり、ヒト大腸癌の 15~20%は炎症に由来する。第一章にて、MISP が抗炎症作用を有していることが明らかとなったため、本章では、MISP と腸腫瘍の発生や悪性化の関与について検証を行った。最初にヒト癌ゲノムデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA)を用いて、大腸における MISP の発現量を大腸癌患者の腫瘍組織と健常者の正常組織で比較した結果、腫瘍組織では発現量に有意な増加が認められた。また、健常者の大腸組織での発現分布が高発現と低発現の二峰性を示し、高発現での分布は大腸癌患者と同程度の発現量を示した。次にヒト大腸癌細胞株において siRNA による MISP のノックダウン (KD)を行い、MISP の細胞増殖能に与える影響を検証した結果、MISP KD 群において細胞増殖能に有意な低下が認められた。*in vivo* 実験においてはマウスにアゾキシメタンと 2.5%DSS を組み合わせて投与することで、大腸に慢性炎症由来の腺腫を形成させる大腸炎誘発腸腫瘍モデルマウスを用いて、WT マウスと *Misp* KO マウスでの腺腫形成を比較した結果、*Misp* KO マウスにおいて腺腫の数とそのサイズに有意な低下が認められた。以上の結果から、MISP が慢性炎症由来の腫瘍形成に正に関与することから、大腸癌のリスクファクターとなる可能性が示唆された。

## 第三章：MISP 関連因子の探索

本章では第二章にて明らかとなった MISP による腫瘍形成への正の制御について、関連する因子とそのシグナル経路について検証を行った。最初にヒト大腸癌細胞株において MISP KD を行い、RNA-seq 解析を行った結果、70 種類の遺伝子に有意な発現変動が認められた。発現変動が

認められた遺伝子の中で、大腸癌患者で MISP と同様の発現分布を示す遺伝子 Opa interacting protein 5 (OIP5)に着目した。OIP5 は大腸癌、肝臓癌、腎細胞癌といった様々な癌において高発現を示し、細胞周期の有糸分裂期に高発現を示す。また、発現低下により細胞周期の停止、アポトーシス細胞死が誘導されることが報告されている。また、腫瘍形成に関与する Wnt シグナル経路と JAK2-STAT3 シグナル経路を促進することも報告されている。TCGA データベースを用いて、大腸組織での MISP と OIP5 の発現相関解析を行った結果、MISP と OIP5 の発現に強い相関が認められた。次にヒト大腸癌細胞株において、MISP KD を行い、タンパク質の発現を検証した結果、OIP5 の発現に著しい低下が認められた。この結果から MISP は OIP5 の発現の維持に関与していることが示唆された。さらに、共免疫沈降法では MISP と OIP5 が相互作用していることを明らかにした。次に MISP と Wnt シグナル経路の関与についての検証では、TOP Flash ルシフェラーゼアッセイにより MISP KD によって Wnt シグナルの活性が有意に低下することが明らかとなった。免疫蛍光染色または免疫組織化学染色を行った結果、*in vitro* および *in vivo* 共に Wnt シグナル経路の下流に存在する  $\beta$ -catenin の核への移行量が MISP の発現量低下に起因して、有意な低下を示した。この結果から MISP が Wnt シグナル経路を活性化することが示唆された。さらに MISP と JAK2-STAT3 シグナル経路への検証するためにリン酸化 STAT3 の発現量を検証した結果、MISP KD によってリン酸化 STAT3 が有意な低下を示した。以上の結果から、MISP は OIP5 の発現の維持に関与し、Wnt シグナル経路と JAK2-STAT3 シグナル経路を正に制御することで、腸腫瘍の形成に関与していることが明らかとなった。

## 【論文審査の結果】

本研究の成果から、MISP が、1)抗炎症作用と増殖作用を通じて、IBD の回復に関与する可能性を示し、新たな治療標的となる。2)慢性炎症由来の腫瘍形成に対して、大腸癌のリスクファクターとなる 3) MISP は OIP5 の発現の維持に関与し、Wnt シグナル経路と JAK2-STAT3 シグナル経路を正に制御することで、腸腫瘍の形成に関与することが示された。

これらの一連の研究により、MISP が大腸炎の回復に関与するが、大腸癌では OIP5 の発現の維持に関与し、Wnt シグナル経路と JAK2-STAT3 シグナル経路を正に制御することで、腸腫瘍の形成に関与していることが明らかとなった。これらの研究が大腸炎および大腸癌の病態の解明・治療に繋がる研究であり、極めて高い価値を有するものと判断された。審査員一同は、本論文が新規の知見を多く含み医学や獣医学の発展に寄与するものとの認識で一致した。さらに著者が真摯な研究態度と豊かな人間性を持ち、将来研究成果を社会に還元できる能力を有するものであり、博士（獣医学）の学位の授与に値すると判断した。