

学位論文要旨

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

Analysis of mitotic spindle positioning (MISP) function in colitis
and colitis-induced intestinal tumors

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

日裏 剛基

Koki HIURA

指導教授 佐々木 宣哉

炎症性腸疾患 (IBD)は炎症性の発癌のリスクを高めることが報告されている。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が崩れることにより、炎症状態からの回復が妨げられ、腸管に慢性炎症が生じる。また、IBD について、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。

Mitotic spindle positioning (MISP)は、アクチン結合タンパク質であり、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している。MISP の機能としては微絨毛のコアアクチン束の根端部を安定化・伸長することや腸管粘膜の維持に関わっていることが示唆されているが、疾患との関連は全く報告されていない。そこで本研究では 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とそのメカニズムの解析を行った。

第 1 章では、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た結果、大腸での MISP のタンパク質発現量が約 3 倍の増加を示した。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った結果、*Misp* KO マウスでは大腸炎の著しい増悪が認められた。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。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結果、抗炎症性サイトカインである *Il-10*, *Tgfb1* が *Misp* KO マウスで有意な低下が認められた。特に *Tgfb1* 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。また、*Misp* KO マウスでは TGF- β 経路に関わる *Wnt5a* の発現が

低下しており、*Wnt5a* は陰窩組織の修復に促進的に作用することから、*Misp* KO マウスでは大腸陰窩組織の修復能が低下していたことが示唆された。

これらの結果は MISP が抗炎症作用と組織修復作用を通じて、炎症後の大腸の回復に関与してい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している。

慢性炎症は発癌のリスク因子であり、ヒト発癌の 15~20% は炎症に由来するものといわれている。第 1 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、第 2 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、大腸で MISP の発現量を大腸癌患者と健常者と比較した結果、大腸癌患者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。次に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腫瘍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 マウスで腫瘍を比較した結果、*Misp* KO マウスにおいて腫瘍の数とそのサイズに有意な低下が認められた。第 1 章にて *Misp* KO マウスにおいて発現の低下が明らかとなった *Tgfb1* と *Wnt5a* は、大腸炎誘発腸腫瘍モデルマウスにおいて上皮間葉転換 (EMT) を促進することで、腫瘍形成に促進的に作用することが知られている。このことから MISP は EMT を促進することで慢性炎症由来の腫瘍形成を正に制御しており、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3章では第2章にて明らかとなった MISP による腫瘍形成への正に制御について、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。さらに、タンパク質相互作用データベースを用いて MISP と相互作用が示唆されているタンパク質と RNA-seq 解析の結果で共通しているものを探索した結果、Opa interacting protein 5 (OIP5) に着目した。OIP5 は大腸癌、肝臓癌といった様々な癌において高発現を示し、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。関連するシグナルとして、腫瘍形成に関与する Wnt シグナル経路と JAK2-STAT3 シグナル経路に促進的に作用することが報告されている。TCGA データベースを用いて、健常者と大腸癌患者で OIP5 の発現を検証した結果、OIP5 は MISP の発現に近い発現挙動を示した。さらに健常者の大腸組織での 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。一方で OIP5 KD においては MISP の発現に変化は認められなかった。この結果から MISP は OIP5 の上位に位置することで OIP5 の発現量の維持に関与していることが示唆された。さらに、共免疫沈降法により、MISP と OIP5 が相互作用していることが明らかとなった。また、ヒト大腸癌細胞株において OIP5 KD を行った結果、細胞増殖能が有意な低下を示した。次に MISP と Wnt シグナル経路の関与について検証するため、TOP Flash ルシフェラーゼアッセイを行った結果、MISP KD によって Wnt シグナルの活性に有意な低下が認められた。さらに、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 β -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 シグナル経路に促進的に作用することが示唆された。また 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。また MISP KD による細胞増殖能の低下が OIP5 の過剰発現により回復が認められた。

本研究の結果から、MISP は抗炎症性サイトカインの発現や組織修復能に促進的に作用することで大腸炎に対して保護的に作用する一方で、腸腫瘍形成に関わるシグナル経路に促進的に作用することで、大腸癌におけるリスクファクターとなることが明らかとなった。今後、MISP が関わるシグナル経路をさらに解明することで IBD の治療法の解明や腸腫瘍の形成や悪性化の機序の解明に役立つことが期待される。