

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	安藤 勝祥
学位論文題目			
抗CD3抗体誘発小腸障害マウスにおけるRNA結合蛋白heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1による腸管上皮の細胞死制御に関する研究			
共著者名			
なし			
北海道医学雑誌 89巻 平成26年 掲載予定			
研究目的			
<p>炎症性腸疾患は原因不明の慢性、再発性の腸炎で、その病態には、腸管局所のT細胞の異常活性化やTNF-<math>\alpha</math>、INF-<math>\gamma</math>、Fas/Fas-ligandなどの炎症性サイトカイン産生亢進に起因する腸管上皮の過剰なアポトーシスが関与することが明らかにされている。一方、アポトーシスの制御に、RNA結合蛋白によるmessenger RNA (mRNA)の翻訳調節が関与していることが知られ、なかでもRNA結合蛋白の一種であるheterogenous nuclear ribonucleoprotein A1(hnRNP A1)は、TNF-<math>\alpha</math> mRNAの非翻訳領域に結合しその発現を抑制すること<sup>1)</sup>、Fas遺伝子のエクソン5に結合して膜型Fasの発現を調節することが報告されている。当教室では、hnRNP A1がmicroRNA-18aとの結合を介して分解されることで、大腸癌細胞のアポトーシスが亢進することを突き止め、hnRNP A1が腸管上皮アポトーシスの制御に重要な役割を持つことを示した<sup>2)</sup>。本研究では、T細胞の異常活性化によるアポトーシス誘導モデルである抗CD3抗体誘発小腸障害マウスを用い、腸管炎症におけるhnRNP A1の役割を明らかにする。</p>			
材料・方法			
<p>1. 抗CD3抗体誘発小腸障害マウスの作成 6週齢C57Bl6/Jマウスに対し、1匹あたりハムスター抗CD3e抗体 12.5<math>\mu</math>gをPBS 200<math>\mu</math>lに希釈後、腹腔内へ投与した。</p> <p>2. hnRNPA1 siRNA遺伝子導入 抗CD3抗体を腹腔内投与する24時間前に、HVJ Envelope VECTOR KITを用いてhnRNP</p>			

A1のsiRNAおよびscramble RNAを腹腔内投与した。

### 3. Extra vivo intestinal loop study

マウスに抗CD3抗体を腹腔内注入した24時間後に、近位空腸を切離し三分割した。RPMI 1640を1mlずつ注入し、両端を糸で結紮した。この腸管ループ内にRI標識マンニトールを注入し、腸管外培養液に漏出したマンニトール濃度を15分後、30分後でそれぞれ測定した。

### 4. TUNEL染色

抗CD3抗体腹腔内注入後のマウスより切除した空腸組織より切片を作成した。In Situ Cell Death Detection Kit, TMR redを用い染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、絨毛内と陰窩の陽性細胞数を計測した。

### 5. Western Blotting

マウス空腸粘膜を回収してMammalian Cell Extraction Kitを用い可溶化した。サンプルを12.5% SDS-PAGEで泳動、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体には抗hnRNP A1、抗NF- $\kappa$ B、抗actinに対する単クローン抗体、抗PARP (nuclear poly(ADP-ribose) polymerase)、抗Fas-ligand、抗Fas、抗Trefol factor 2(Tff2)に対する多クローン抗体を用いた。Actinの発現量を内部コントロールとし、それぞれの蛋白発現量を標準化した。

### 6. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

マウス腸管上皮からRNeasy mini kitを用いてRNAを抽出した。hnRNP A1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17aの特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。18S rRNAの発現量を内部コントロールとして標準化した。

### 7. cDNAアレイ

hnRNP A1のsiRNAまたはscramble RNAを腹腔内投与し、24時間後に抗CD3抗体を投与した。24時間後に空腸粘膜からRNAを回収し、mRNAの発現プロファイルを3D-Gene<sup>B</sup> 全遺伝子型DNAチップを用いて解析し、2倍以上の変化があったものを有意とした。

### 8. 統計学的解析

統計学的処理にはt検定を用いた。p<0.05をもって統計学的有意差ありと判断した。

## 成 績

### 1. 抗CD3抗体誘発小腸障害マウスにおけるhnRNP A1の発現変化

抗CD3抗体投与3時間後の組織学的所見では絨毛の短縮と粘膜固有層の浮腫を認め、24時間後には陰窩の肥厚を認めた。TUNEL染色では、3時間後に絨毛上皮のアポトーシスを認め、24時間後に陰窩上皮のアポトーシスを認めた。hnRNP A1蛋白の発現は24時間後に、mRNAの発現は8時間後、24時間後に有意な増加を認めた(n=3)。以下の実験では24時間後の小腸サンプルを用いた。

### 2. hnRNP A1発現抑制による抗CD3抗体誘発小腸障害マウスの腸管障害の変化

hnRNP A1のsiRNAおよびscramble RNAを投与し、24時間後に抗CD3抗体を投与したマウスおよび、無処置のcontrolマウスの3群にて腸管障害の変化を検討した。摘出空腸の腸管

重量/腸管長比はhnRNP A1発現抑制マウスで有意に増加した(n=6). scramble RNA投与マウスに比べhnRNP A1発現抑制マウスにおいて、組織学的に絨毛の短縮と浮腫が著明で、Extra vivo intestinal loop studyでは腸管外に漏出したマンニトール濃度が有意に増加していた(n=6). 以上より、hnRNP A1発現抑制により、組織学的な小腸障害が増強し、腸管バリア機能が低下することが明らかになった.

### 3. hnRNP A1発現抑制による小腸粘膜のアポトーシスの変化

抗CD3抗体投与24時間後に回収した空腸組織の絨毛、陰窩でのTUNEL陽性細胞数は、control群で各々 $0.94 \pm 0.68$ ,  $0.73 \pm 0.60$ 個, scramble RNA群で各々 $9.3 \pm 4.5$ ,  $10.6 \pm 3.2$ 個であったのに対し、hnRNP A1発現抑制群では各々 $16.7 \pm 5.1$ ,  $17.1 \pm 4.8$ 個であり、絨毛、陰窩ともTUNEL陽性細胞数が有意に増加した(n=3).

### 4. hnRNP A1発現抑制による腸管組織中の炎症・アポトーシス関連因子の変化

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17a, IFN- $\gamma$ , IL-10のmRNAの発現は、controlマウスに比較してscramble RNA群, hnRNP A1発現抑制群で有意に上昇していた(n=6). さらに、TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17aはscramble RNA群と比較してhnRNP A1発現抑制群で有意に上昇していた. また、hnRNP A1発現抑制マウスにおいて、アポトーシス関連分子であるcleaved PARP, Fas-ligandの有意な発現亢進を認めた(n=6).

### 5. cDNAアレイによるhnRNP A1の標的分子の検討

scramble RNAマウスと比べhnRNP A1発現抑制マウス腸管で2倍以上の発現亢進を示したcDNAが9種類、2倍以上の発現低下を示したcDNAが15種類であった. 最も発現が低下していたTff2は、mRNA内にhnRNP A1の高親和性結合部位(5'-UAGGGA/U-3')と相同性配列をもち、抗アポトーシス作用を有することが報告されていた<sup>3)</sup>. そこで、Western blottingにより、hnRNP A1発現抑制マウスにおけるTff2蛋白の発現を検討した結果、有意な低下を認めた(n=6). hnRNP A1の発現抑制によりTff2 mRNAの安定化が阻害され、発現が減少した結果、アポトーシスが亢進したものと推測された.

## 考 案

本研究では、抗CD3抗体誘発小腸障害マウスを用いて、過剰な腸管上皮アポトーシスおよび腸管障害に対するRNA結合蛋白hnRNP A1の作用を検討した. その結果、アポトーシス誘発によりhnRNP A1発現は増加すること、hnRNP A1発現を抑制すると小腸粘膜のアポトーシスが亢進し、粘膜障害が増強されることを突き止め、hnRNP A1は過剰なアポトーシスを制御する作用があることを明らかにした. 本モデルはT細胞誘導性アポトーシスモデルであり、IBDにみられる腸管上皮アポトーシスの発生機序と類似した病態を呈することから、hnRNP A1はIBDの腸管障害を改善することが示唆された. さらに、cDNAアレイによる発現解析からhnRNP A1による抗アポトーシスの作用機序として、Tff2 mRNAの安定化の関与が示唆された. Tff2は腸管上皮の杯細胞に発現するペプチドであり、腸管上皮の分化誘導やバリア機能の増強、ERKやMAPK経路の不活化を介したアポトーシスの制御を行っている. 本研究成果を考え合わせると、腸管炎症下ではhnRNP A1の発現が増加し、Tff2 mRNAの安定

化、蛋白発現の誘導を介して、過剰なアポトーシスが抑制され、腸管障害の改善に寄与するものと考えられる。また、hnRNP A1発現抑制マウスにおいて、アポトーシス関連分子であるTNF- $\alpha$ 、Fas-ligandの上昇がみられた。TNF- $\alpha$  mRNAの非翻訳領域やFas-ligandのエクソン5にhnRNP A1が結合し、発現を制御することが知られており、hnRNP A1の発現抑制によりこれらアポトーシス関連分子の発現が亢進したものと考えられる。本研究ではT細胞誘導性の腸管上皮障害モデルにおけるhnRNP A1の抗アポトーシス作用とそのメカニズムを明らかにした。今後、hnRNP A1のTff2に対する結合能や作用機序を解明することによって、hnRNP A1を標的とした新規腸炎治療の開発が期待される。

## 結 論

本研究により、T細胞活性化にて誘導される腸管上皮アポトーシスは、hnRNP A1の発現抑制によって増悪することを明らかにし、hnRNP A1は腸管上皮アポトーシスの制御に深く関与していることが示唆された。その機序として、Tff2発現低下およびTNF- $\alpha$ やFas-ligandの発現亢進を介した小腸粘膜のアポトーシスの増悪が関与していると考えられた。hnRNP A1の発現誘導による新規のIBD治療薬の開発が期待される。




### 引 用 文 献

1. Buxadé M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, Bain J, Espel E, Proud CG. The Mnks Are Novel Components in the Control of TNF Biosynthesis and Phosphorylate and Regulate hnRNP A1. *Immunity* 2005; 23: 177-189
2. Fujiya M, Konishi H, Mohamed Kamel MK, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene*. 2013 doi: 10.1038/onc.2013.429. [Epub ahead of print]
3. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2000; 97(2):799-804

### 参 考 论 文

1. Nomura Y, Tanabe H, Moriichi K, Igawa S, Ando K, Ueno N, Kashima S, Tominaga M, Goto T, Inaba Y, Ito T, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Kohgo Y.. Reduction of E-cadherin by human defensin-5 in esophageal squamous cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;439(1):71-7.
2. Ando K, Fujiya M, Ito T, Sugiyama R, Nata T, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Ishikawa C, Inaba Y, Moriichi K, Okamoto K, Ikuta K, Tanabe H, Tokusashi Y, Miyokawa N, Watari J, Mizukami Y, Kohgo Y. A pseudosarcomatous lesion resembling a malignant tumor of the esophagocardiac junction diagnosed by a total biopsy with endoscopic surgery. *Endoscopy*. 2012;44 Suppl2 UCTN:E21-2
3. Sato R, Fujiya M, Watari J, Ueno N, Moriichi K, Kashima S, Maeda S, Ando K, Kawabata H, Sugiyama R, Nomura Y, Nata T, Itabashi K, Inaba Y, Okamoto K, Mizukami Y, Saitoh Y, Kohgo Y. The diagnostic accuracy of high-resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow-band imaging for differentially diagnosing colon adenoma. *Endoscopy*. 2011; 43(10):862-8

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	安藤 勝祥
審査委員長 谷口 隆信 			
審査委員 高後 裕 			
審査委員 牛首 文隆 			
学 位 論 文 題 目			
抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスにおける RNA 結合蛋白質 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 による腸上皮の細胞死制御に関する研究			
<p>本論文は、腸上皮障害マウスモデルにおいて、RNA結合蛋白質hnRNP A1の上皮保護作用について解析を行ったものである。</p> <p>抗CD3抗体投与にて腸上皮のアポトーシスを誘導するとhnRNP A1の発現上昇が認められた。ここで、siRNAを用いてhnRNP A1の発現を抑制すると、アポトーシスの亢進と炎症の増強が観察され、hnRNP A1はアポトーシスを抑制的に制御していると考えられた。そこでcDNAアレイ解析を用いてhnRNP A1標的分子の探索を行い、Trefoil factor2を同定した。hnRNP A1がTrefoil factor2のmRNAに結合していることを免疫沈降RT/PCRにより、またhnRNP A1の発現抑制によってTrefoil factor2の発現が1/2以下に低下することをウェスタン解析によって示している。申請者はこれらの結果から、hnRNP A1は抗アポトーシス分子であるTrefoil factor2のmRNAを安定化することで、腸上皮保護作用を発揮していると結論づけている。</p> <p>本論文の論旨は明確であり、hnRNP A1の腸上皮保護作用が抗アポトーシス分子であるTrefoil factor2によって仲介されているという知見は、消化器学領域に新しい方向性をもたらすものと評価される。また、委員の質問に対しても、具体的かつ明快な説明がなされ、十分な知識を有していた。以上の結果を総合し、本審査委員会は本論文を博士論文として相応しいものと判定した。</p>			