

主論文

A Novel Role of Spred2 in the Colonic Epithelial Cell Homeostasis and Inflammation

(大腸粘膜上皮細胞の恒常性と炎症における、Spred2 の新たな役割)

【緒言】

腸管上皮のバリア機能の破綻は、潰瘍性大腸炎の病状悪化・治癒の遷延に関与している。迅速で適切な粘膜治癒 (mucosal healing) は、潰瘍性大腸炎患者において再燃予防・予後の改善に重要と考えられる。

腸管上皮の維持に重要とされる Epidermal Growth Factor (EGF) などの成長因子は、細胞膜上に存在するチロシンキナーゼ型受容体に結合する。チロシンがリン酸化することで細胞内にシグナルが伝達されるが、その伝達には Ras/Raf/ERK (extracellular signal-regulated kinase)、PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)-Akt、STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) などのシグナル系が関与しているとされている。

Spred 蛋白 (Sprouty-related EVH1-domain-containing proteins) は、Ras/Raf/ERK 系の Raf のリン酸化を抑制することで、ERK シグナルを阻害する分子である。Spred1、Spred3 が神経系を中心に発現しているのに対して、Spred2 は大腸を含め体内のあらゆる臓器に発現している。Spred2 の炎症性腸疾患への関与については、まだ解明されていない部分が多いが、ゲノムワイド関連解析では Spred2 が炎症性腸疾患の感受性遺伝子との報告もある。本研究で我々は、Spred2 の大腸粘膜上皮細胞の恒常性と炎症における役割について検討を行った。

【材料と方法】

1. Spred2 欠損の大腸粘膜上皮恒常性に与える影響

大腸粘膜上皮の細胞増殖評価のため、定常状態の 7-9 週齢の C57BL6/J (wild type :WT) 及び Spred2 knockout (KO) マウスに 50 μ g/g 体重の BrdU (bromodeoxyuridine) を腹腔内投与し、2 時間後に安楽死させ大腸粘膜上皮内の BrdU 陽性細胞を免疫組織化学法により同定した。また、正常大腸の一部より採取した mRNA から cDNA を合成し、qRT-PCR 法にてタイトジャンクション構成に関わる蛋白の遺伝子、claudin (Cldn) 1、Cldn2、Cldn4、mucin (Muc) 1、Muc2、occludin (Ocln)、trefoil factor 3 (Tff3)、cadherin (Cdh) 1、tight junction protein (Tjp) の発現を評価した。

2. Spred2 欠損の DSS 急性大腸炎発症に与える影響

WT 及び Spred2 KO マウスに、2% dextran sulfate sodium (DSS) 溶液を 5 日間自由飲水させて大腸炎を誘導し、体重・下痢便・血便の程度を評価し、大腸炎の活動度を算出した。DSS 飲水終了後は、蒸留水自由飲水とした。DSS 飲水開始後 3 日目、8 日目に大腸を採取し、

H&E 染色で組織像を比較した。6 日目に採取した大腸を用い、Ly6G の免疫染色により好中球浸潤の程度を評価した。

骨髓キメラマウスモデル：WT 及び Spred2 KO マウスに 2 時間の間隔をあけて計 11 Gy の放射線を照射後、それぞれのマウスを 2 群にわけて、WT または Spred2 KO マウス由来の骨髓細胞を 1 匹あたり 2×10^6 個 静注した。6 週間後に DSS 大腸炎を誘導し、その活動度を算出した。13 日目にマウスを安楽死させ、H&E 染色で組織像を比較した。

3. Spred2 欠損の炎症関連大腸癌発症に与える影響

WT 及び Spred2 KO マウスに リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解したアゾキシメタン (AOM) (12mg/kg 体重量) を腹腔内投与した。その後、3 サイクルの 2% DSS 溶液飲水 (5 日間) と自由飲水 (16 日間) を行い、慢性大腸炎を誘導した。AOM 投与 60 日後にマウスを安楽死させ、大腸の全長を測定し、直径 1mm 以上の腫瘍数を数えた。

4. ヒト大腸上皮細胞由来 Caco-2 細胞における Spred2 の生物学的役割

Caco-2 細胞に control siRNA または Spred2 特異的 siRNA を導入し、Spred2 ノックダウンを行った。Spred2 蛋白発現量は導入 48 時間後に Western blot を用いて評価した。siRNA 導入 48 時間後に細胞を EGF で刺激し、EGF レセプター・ERK のリン酸化の推移を Western blot を用いて検討した。細胞遊走能はスクラッチアッセイを用いて検討した。細胞増殖能は MTT assay にて比較した。

【結果】

1. Spred2 欠損の大腸粘膜上皮恒常性に与える影響

Spred2 KO マウスでは WT マウスより大腸粘膜上皮中の BrdU 陽性細胞率が高く、Cadherin (Cdh) 1 の発現が有意に高かった。

2. Spred2 欠損の DSS 大腸炎発症に与える影響

Spred2 KO マウスでは WT マウスより DSS 大腸炎の活動度・組織学的炎症の程度ともに有意に軽度であった。Ly6G による免疫染色では、Spred2 KO マウスでは WT マウスより好中球浸潤の程度が有意に軽度であった。骨髓キメラマウスモデルでは、DSS 大腸炎の発症は造血細胞 (ドナー由来) における Spred2 の有無では全く影響されず、非造血細胞 (レシピエント由来) における Spred2 欠損群で有意に軽減した。

3. Spred2 欠損の炎症関連大腸癌発症に与える影響

AOM/DSS 処置後 (AOM 投与から 60 日後) の Spred2 KO マウスの大腸の長さは WT マウスに比べて有意に長く、1mm 以上の大きさの腫瘍数は WT マウスに比べて有意に少なかった。

4. ヒト大腸上皮細胞由来 Caco-2 細胞株における Spred2 の生物学的役割

Spred2 siRNA 導入群では control siRNA 導入群に比べて Spred2 蛋白発現の有意な低下を認めた。EGF 刺激後の EGF レセプターのリン酸化は両群共に同程度であったが、ERK のリ

ン酸化は Spred2 siRNA 導入群で有意に亢進していた。

スクラッチアッセイによる細胞遊走能または MTT アッセイによる細胞増殖能は、Spred2 siRNA 導入群で、control siRNA 導入群に比べて有意に高かった。

【考察】

我々は Ras/Raf/ERK 経路の抑制因子である Spred2 の KO マウスにおいて、DSS 大腸炎の発症が軽微であることを明らかにした。その原因として、Spred2 KO マウスでは大腸粘膜上皮の細胞増殖が亢進していること、タイトジャンクションがより機能していることが考えられる。Caco-2 細胞においても、Spred2 の発現抑制により細胞の遊走・増殖が有意に高く、大腸上皮での創傷治癒の亢進が示唆される。

Ras/Raf/ERK 経路と炎症性腸疾患に関しては、様々な報告がある。T 細胞においては Ras/Raf/ERK 経路の活性化により Th17 への分化促進が起こり、腸炎が悪化するという報告がある。一方、Ras/Raf/ERK 経路の活性化により腸管上皮の修復が促進されるという報告もある。Ras/Raf/ERK 経路の亢進は腫瘍細胞の増殖促進に関与しているとの報告あり、Spred2 KO マウスにおける発癌亢進が懸念された。しかしながら、AOM と DSS を併用した炎症関連大腸癌モデルでは、Spred2 KO マウスでは WT マウスに比べて腫瘍の出現が有意に少なかった。DSS 大腸炎モデルでは実際の潰瘍性大腸炎と同様、慢性炎症の持続により大腸の長さが短縮するが、Spred2 KO マウスの大腸の長さは WT マウスに比べて有意に長く、大腸炎が軽度であるために腫瘍の出現が有意に抑制されたと考えられる。

【結論】

本研究により得られた結果は、Spred2 の抑制により潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜上皮細胞がより増殖し、炎症が軽微化する可能性を示唆しており、Spred2 が潰瘍性大腸炎の治療において新たな治療標的となりうるのではないかと考えられる。