

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15110

研究課題名(和文)オートファジーによる腸疾患の制御

研究課題名(英文)Control of intestinal diseases by autophagy

研究代表者

浅野 純平 (ASANO, Junpei)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：70463809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーの様々な疾患への関与が明らかになりつつあり、疾患制御の観点からオートファジーが注目されている。本研究では近年増加の一途をたどる炎症性腸疾患(IBD)に着目し、オートファジーによる疾患制御の可能性を検討した。それによりオートファジーは腸幹細胞の恒常性維持と上皮再生に重要なことが明らかになった。さらに、5-FUを用いるマウス腸炎モデルにおいてオートファジーを欠損する腸管上皮の炎症増悪を確認した。本研究によりオートファジーが腸管上皮の再生に重要であることが明らかになり、IBDの病因解明や制御におけるオートファジーの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The involvement of autophagy in various diseases is being clarified, and autophagy has attracted attention from the viewpoint of disease control. In this study, we focusing on inflammatory bowel disease (IBD) which has been increasing in recent years, the possibility of autophagy disease control was examined. We confirmed that autophagy is important for intestinal stem cell homeostasis and intestinal epithelium regeneration. Furthermore, inflammation exacerbations of intestinal epithelium lacking autophagy were confirmed in mouse enteritis model using 5-FU. This study revealed that autophagy is important for regeneration of the intestinal epithelium, suggesting the usefulness of autophagy in the clarification and control of IBD pathogenesis.

研究分野：免疫学

キーワード：オートファジー 腸管上皮 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

- (1) オートファジーは細胞質内の変性タンパク質やオルガネラを分解・処理する機構であり、飢餓に対する応答のほか、オルガネラの品質管理や抗原提示などに働いていることが明らかになっていった。さらにオートファジーの様々な疾患への関与が報告されており、疾患制御の観点から注目を集めていた。
- (2) 腸管上皮は未分化細胞が存在するクリプトと絨毛などの分化細胞から構成されていて、上皮再生の起点となる腸幹細胞(Lgr5⁺細胞)はクリプト底部に存在することが明らかになっていった。
- (3) これまでのIBDの原因究明に関する多くの研究により、発症の原因に腸内細菌叢や免疫応答などの異常が挙げられていた。しかしながら、現在でも発症メカニズムには不明な点が多く、IBDは難治疾患に指定されている。
- (4) オートファジー関連遺伝子 *Atg16L1* は炎症性腸疾患(IBD)・クローン病の疾患感受性遺伝子の1つであることが明らかになっていった。その病因解析が腸管上皮特異的にオートファジーを欠損するマウスで行われ、抗菌ペプチドの産生を担うパネート細胞の機能不全が指摘されていた。
- (5) 腸管上皮においてオートファジーがパネート細胞の恒常性維持の他、杯細胞からの粘液の分泌にも関わるということが明らかになっていった。一方、これら以外の細胞におけるオートファジーの役割は不明であった。
- (6) 本研究課題遂行者は腸管上皮特異的にオートファジー遺伝子の *Atg5* を欠損するマウスで腸管上皮の再生能力が低下することを見出していた。さらに、このマウスではLgr5⁺細胞が著しく減少しており、Lgr5⁺細胞にとってオートファジーが重要なことを突きとめていた。

2. 研究の目的

腸管上皮に着目して、Lgr5⁺細胞におけるオートファジーの役割を解明し、IBDの予防や治療法用への手掛かりを探ることを目的とした。

-平成27年度-

Lgr5⁺細胞の恒常性維持におけるオートファジーの役割を追求した。

(1). Lgr5⁺細胞におけるオートファジー誘導の検証

Lgr5⁺細胞で恒常的にオートファジーが誘導されている報告はなかった。一方、先述のパネート細胞における恒常的なオートファジー誘導の報告があった。本研究では生理的条件下のオートファジーの誘導レベルをLgr5⁺細胞とパネート細胞で検証した。

(2). オートファジーを欠損するパネート細胞のLgr5⁺細胞に対する影響の検証

パネート細胞は抗菌ペプチドの産生の他、腸幹細胞のニッチの機能も有していることが明らかになっていった。そこで、腸管上皮特異的にオートファジーを欠損するマウスで見出していたLgr5⁺細胞の減少はニッチの影響に因るものなのか、パネート細胞特異的に *Atg5* 遺伝子を欠損するマウスで検証した。

(3). オートファジーを欠損するLgr5⁺細胞の活性酸素種量と幹細胞性の解析

通常ミトコンドリアはエネルギー産生の際に活性酸素種(ROS)を放出する。それ故にミトコンドリアには次第にダメージが蓄積してくる。ダメージを受けた変性ミトコンドリアは過剰なROSを産生するため、オートファジー機構による変性ミトコンドリアの排除が細胞の活性維持に不可欠である。このような背景から、オートファジー欠損Lgr5⁺細胞の減少に酸化ストレスが関わっている可能性を考え、ROS量を測定した。また、*ex vivo*の実験系で、酸化ストレスの増加が幹細胞性(幹細胞ポテンシャル)に影響するか検討した。ROSの増加がオートファジー欠損Lgr5⁺細胞に認められた場合、抗酸化剤でROSの軽減を図った後、細胞数と幹細胞ポテンシャルを解析することにした。

-平成28年度-

IBDマウスモデルを用いて、疾患におけるオートファジーの役割を追求し、治療や予防応用を検証した。

(1). IBDにけるオートファジーの役割追求

IBDは遺伝的要因、免疫応答の異常などの様々な要因で発症することが明らかになっているが、発症のメカニズムは十分に理解されていない。IBDの発症に関する研究は炎症応答に焦点を当てたものが多く、腸管上皮の再生に着目したメカニズムの追求は殆どなされていない。そこで、オートファジーの欠損に伴う腸管上皮の再生能低下がIBDに関わることを予想し、IBDマウスモデルで関連性を追求した。

3. 研究の方法

(1). Lgr5⁺細胞の解析と分取

Lgr5⁺細胞が GFP 標識されている Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 マウス(Lgr5 マウス)を用い、Lgr5⁺細胞の解析や分取などの一連の実験を行った。

(2). クリプトの観察

腸管上皮特異的に Atg5 遺伝子を欠損するマウス (Atg5^{flox/flox} IEC マウス) のクリプトを共焦点顕微鏡で観察し、Lgr5⁺細胞の分布状態を野生型マウス(Control マウス)と比較した。観察試料は Atg5^{flox/flox} IEC マウスと Lgr5 マウスを交配して得た Atg5^{flox/flox} IEC Lgr5 マウスと Control Lgr5 マウスから調製した。また、電子顕微鏡(TEM)でクリプト底部の微細構造を観察した。

(3). Lgr5⁺細胞におけるオートファジー誘導の検証

オートファジー誘導の指標となるオートファゴソームの形成を LC3-GFP-トランスジェニックマウス(LC3-GFP マウス)を用いて解析した。LC3 はオートファゴソームに集積するため、オートファゴソームが LC3-GFP ドット(ドット)として観察できる。LC3-GFP マウス及び、LC3-GFP マウスと Atg5^{flox/flox} IEC マウスを交配して得た Atg5^{flox/flox} IEC LC3-GFP マウスを用い、共焦点顕微鏡でドットを観察し、クリプトでのオートファジー誘導を観察した。また、オートファジー誘導の指標になる p62 のタンパク質量を ELISA で測定し、誘導の評価を行った。

(4). オートファジーを欠損するパネート細胞の Lgr5⁺細胞に対する影響

Atg5^{flox/flox} IEC マウスに認められる著しい Lgr5⁺細胞の減少はニッチとして機能するパネート細胞の影響に因るのか、パネート細胞特異的に Atg5 遺伝子を欠損するマウス (Atg5^{flox/flox} D6-Cre マウス) と Control マウスで Lgr5⁺細胞数を比較した。Lgr5⁺細胞数はクリプトの調製と酵素処理の後、フローサイトメーター(FACS)で解析した。

(5). Lgr5⁺細胞における ROS の測定

Lgr5⁺細胞内の ROS 量は ROS 用蛍光プローブ(CellROX)を用い、FACS で解析した。

(6). 幹細胞ポテンシャルの評価

Lgr5⁺細胞の幹細胞ポテンシャルは ex vivo のオルガノイド培養系で評価した。この方法はマウス個体より調製したクリプトもしくは Lgr5⁺細胞を腸管上皮の基底膜を模倣するマトリジェル内で培養するものであり、幹細胞ポテンシャルがオルガノイドの形成能に反映する。

(7). 腸管上皮の再生能の評価

腸管上皮の再生能は Atg5^{flox/flox} IEC 及び Control マウスに放射線照射(10Gy/マウス)を施し、再生期の腸管上皮の BrdU⁺細胞 (DNA 合成細胞) と Ki-67⁺細胞(増殖細胞)の数で評価した。

(8). IBD におけるオートファジーの役割追求

IBD の発症とオートファジーの関連性は抗癌剤の 5-Fluorouracil (5-FU)を用いるマウスモデルで追求した。Atg5^{flox/flox} IEC マウス及び Control マウスに 5-FU(150mg/kg)を投与し、投与 6 日後の腸管上皮の組織像や増殖能を比較した。

4. 研究成果

(1). 顕微鏡観察による Lgr5⁺細胞の解析結果

本研究開始以前に Atg5^{flox/flox} IEC Lgr5 マウスにおける Lgr5⁺細胞の著しい減少を見出していた(図.1)。

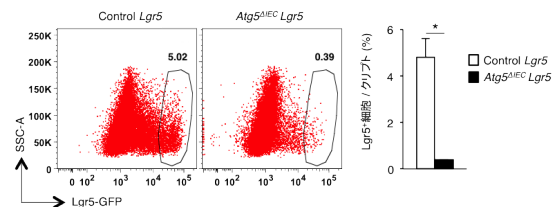


図 1. 空腸における Lgr5⁺細胞数(%); P<0.005.

こうした結果と一致して共焦点顕微鏡による観察でも Atg5^{flox/flox} IEC Lgr5 マウスの Lgr5⁺細胞の減少が確認された(図.2)。

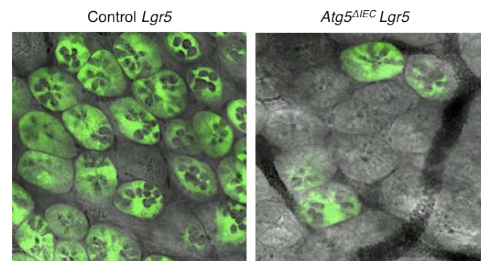


図 2. 共焦点顕微鏡による空腸クリプト底部の観察。

また、Control マウスの幹細胞はパネート細胞に挟まれながら交互に配置するのに対し(図.3,左パネル)、Atg5^{flox/flox} IEC マウスではこのような規則性が見られず、パネート細胞が連続的に配置するなどの形態異常が TEM で観察された(図.3, 中間及び右パネル)。

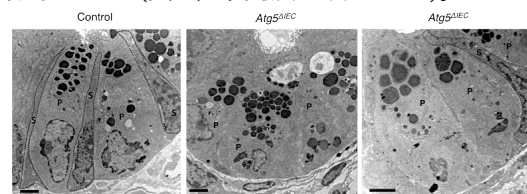


図 3. TEM による空腸クリプト底部の観察。

s: 幹細胞, p: パネート細胞. 点線で囲った細胞は幹細胞を示す。

以上の結果は Atg5^{flox/flox} IEC マウスにおける Lgr5⁺細胞の減少を強く裏付けるものであ

った。

(2). Lgr5⁺細胞におけるオートファジー誘導の検証結果

定常状態の LC3-GFP マウスのクリプト底部に1クリプトあたり数十個のドットが検出され(図4,左パネル)、恒常的にオートファジーがクリプトで誘導されていることが明らかになった。一方、*Atg5^{lox/lox} IEC* LC3-GFP マウスではドットが見られないことから(図4,右パネル)、ドット形成は *Atg5* 遺伝子に依存的であることが確認できた。

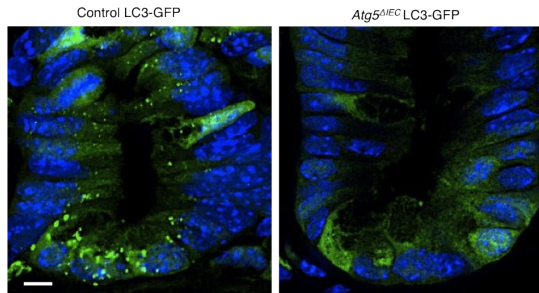


図4. 共焦点顕微鏡によるドットの検出。

クリプト構造の複雑性から *Lgr5⁺*細胞中のドットの定量化が困難なため、細胞を分取し、オートファジー誘導で減少するマーカーの p62 のタンパク質の定量を行ったところ、p62 の Control マウスにおける発現は *Atg5^{lox/lox} IEC* マウスに比べて有為に低下することを確認した。また、同様な傾向をパネート細胞で認めた(図5)。

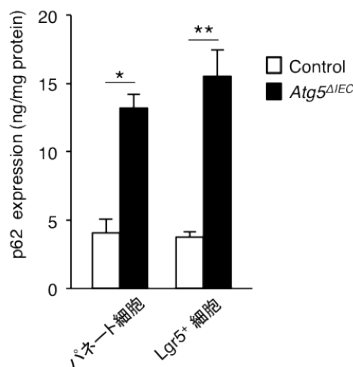


図5. ELISAによる p62 タンパク質の定量化; * $p < 0.04$, ** $p < 0.01$.

以上の結果から、オートファジーが恒常的に *Lgr5⁺*細胞で誘導されていることが明らかになった。

(3). オートファジーを欠損するパネート細胞の *Lgr5⁺*細胞に対する影響

Atg5^{lox/lox} D6-Cre Lgr5 マウスと Control *Lgr5* マウスで *Lgr5⁺*細胞数を比較したが、違いを認めなかった(図6)。この結果から、パネート細胞のオートファジー欠損は *Lgr5⁺*細胞の減少と無関係なことが証明された。

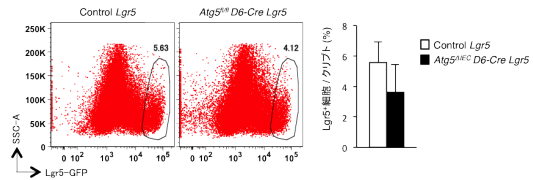


図6. 空腸における *Lgr5⁺*細胞数(%).

(4). オートファジー欠損 *Lgr5⁺*細胞の ROS 量

ROS の増加が *Lgr5⁺*細胞の減少に繋がることを推測し、*Lgr5⁺*細胞内の ROS 量を *Atg5^{lox/lox} IEC Lgr5* マウスと Control *Lgr5* マウスで測定した。*Atg5^{lox/lox} IEC* マウスにおける ROS 量は Control マウス比有為に増加していた(図7)。この結果から、*Lgr5⁺*細胞のオートファジーは過剰な ROS の排除に重要なことが明らかになった。

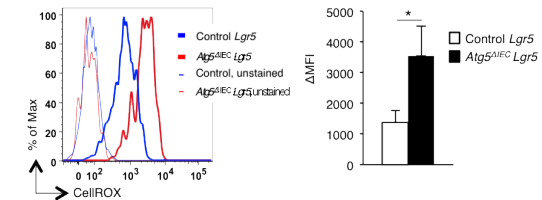


図7. *Lgr5⁺*細胞内の ROS 量; * $p < 0.02$.

(5). オートファジー欠損 *Lgr5⁺*細胞の幹細胞ポテンシャル

Atg5^{lox/lox} IEC マウス及び Control マウスからクリプトを調製し、抗酸化剤(ROS スカベンジャー)の *N*-acetyl-L-cysteine(NAC)存在下、非存在下でオルガノイドの形成効率を検討した。*Atg5^{lox/lox} IEC* マウス由来のクリプトは Control マウスのものよりオルガノイド形成効率(培養7日目のオルガノイド数/培養に供したクリプト数×100)が有為に低く、且つ NAC の存在下で有為な回復を示したことから、過剰な ROS は幹細胞ポテンシャルの低下を引き起こすと考えられた(図8)。

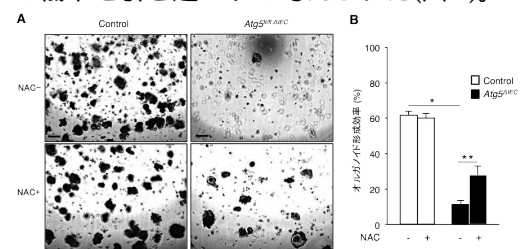


図8. A: 培養7日目のオルガノイド, B: オルガノイド形成効率; * $p < 0.02$, ** $p < 0.05$.

(6). ROS 量制限による腸管上再生能の回復

Atg5^{lox/lox} IEC マウスの腸管上皮の再生能が NAC 投与で回復するか、BrdU を用いて検討した。放射線照射前の BrdU⁺細胞数は *Atg5^{lox/lox} IEC* マウスと Control マウスで同等であったが、再生期に相当する放射線照射3.5日目の BrdU⁺細胞数は *Atg5^{lox/lox} IEC* マウスで著しく減少していた。また、オルガノイ

ド形成効率の結果と一致して、NAC を前処理した *Atg5^{flx/flx} IEC* マウスで BrdU⁺細胞の著しい増加を認めた(図 9)。

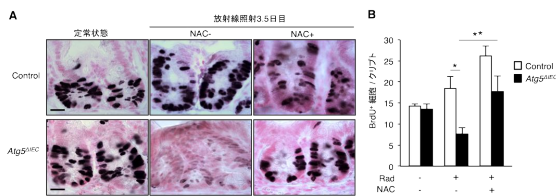


図 9. A: 定常状態と放射線照射 3.5 日後の BrdU⁺細胞, B: 1 クリプトあたりの BrdU⁺細胞数(100 クリプトの解析); * $p < 0.01$, ** $p < 0.03$.

Lgr5⁺細胞は放射線からの腸管上皮の再生に重要な役割を果たすことことから、Lgr5⁺細胞に対する NAC の効果を検討した。注目すべきことに、NAC を前処理した放射線照射 7 日目の *Atg5^{flx/flx} IEC Lgr5* マウスは Control *Lgr5* マウスよりも少ない Lgr5⁺細胞を有していたが、非処理に比べ Lgr5⁺細胞数が有為に戻った(図 10)。

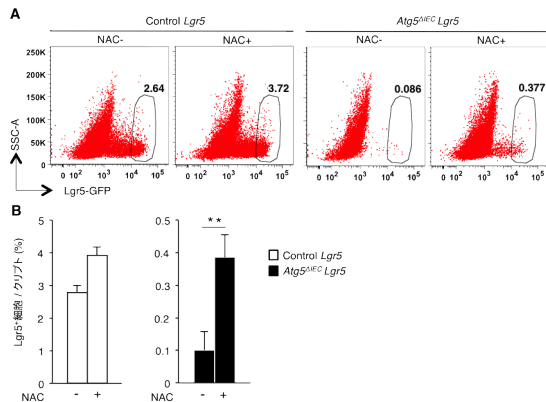


図 10. A: 放射線照射 7 日目の Lgr5⁺細胞の検出(空腸), B: 放射線照射 7 日目 Lgr5⁺細胞数(%); * $p < 0.01$, ** $p < 0.02$.

これらの結果から、オートファジーは Lgr5⁺細胞内の ROS 量を制限しながら、腸管上皮の再生能の維持に働いていることが明らかになった。

但し、NAC を前処理した *Atg5^{flx/flx} IEC Lgr5* マウスの Lgr5⁺細胞数は Control *Lgr5* マウスの数には達しておらず、ROS 以外の因子も Lgr5⁺細胞の減少に関与していると考えられる。そこでオートファジーと小胞体(ER)ストレスの連動性から、ER ストレスに関わる分子(*Xbp1*, *Chop*, *Grp78*)の発現を調べたところ、これらの発現はオートファジー欠損 Lgr5⁺細胞で有為上昇していた(図未表示)。また、オートファジーは代謝ストレスや細胞死にも関与することが知られており、Lgr5⁺細胞の減少メカニズムについて今後のさらなる解析が必要である。

(7). IBD におけるオートファジーの役割

5-FU を用いる IBD 誘発モデルでオートファジーの役割を追求した。5-FU 投与 5 日後

から Control マウスの体重は炎症の軽減に伴い徐々に回復したが、*Atg5^{flx/flx} IEC* マウスでは減少したままであった(図未表示)。これに一致して、5-FU 投与 6 日後の *Atg5^{flx/flx} IEC* マウス空腸横断切片の Ki-67⁺細胞は端的に減少しており、腸管上皮の再生能低下が炎症の悪化に関わると考えられた(図 11)。

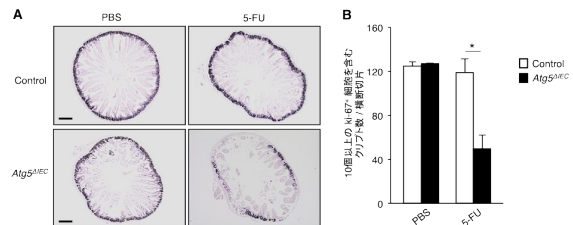


図 11. A: 5-FU 投与 6 日後の Ki-67⁺細胞(空腸横断切片), B: 10 個以上の Ki-67⁺細胞を含むクリプト数/横断切片; * $p < 0.005$.

以上の結果から、腸管上皮の再生能低下は IBD の発症に関わると考えられ、オートファジーの治療への応用が期待される。

現在、本研究課題で得られた知見をまとめた論文を投稿している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

新規 *in vivo* 幹細胞競合モデルの創成、細胞競合・ダイニングコード合同若手 WS, 2017 年 1 月 17 日, ホテルコスモスクエア国際交流センター, (大阪府大阪市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 純平 (ASANO JUNPEI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・

プロジェクト助教

研究者番号: 70463809