

令和元年6月7日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19162

研究課題名(和文) 腸管小胞体ストレスに対する免疫応答と腸炎発症メカニズム解明

研究課題名(英文) Immune response for endoplasmic reticulum stress on intestinal inflammation

研究代表者

細見 周平 (HOSOMI, Shuhei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60554938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮のXbp1欠損が小胞体(ER)ストレスを誘発し、マウスにおいて自然発症腸炎が生じることを報告してきた。本研究では、Xbp1欠損が腸管上皮におけるERストレスとNKG2Dリガンドの一つであるMULT1を誘導し、group1自然リンパ球のNKG2Dを介した細胞傷害が、Xbp1欠損マウスの自然発症腸炎に関与することを証明した。一方、液性免疫であるIgAについては、腸管上皮ERストレスで誘導され、腸管保護的に作用することも明らかとなった。他の自然免疫細胞として知られる肥満細胞におけるERストレスが、炎症や線維化に関与するTNFやAmphiregulinを誘導することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多因子疾患と考えられている炎症性腸疾患(クローン病や潰瘍性大腸炎)の病因の一つとして、小胞体(ER)ストレスによって誘導されるNKG2D-NKG2Dリガンドを介した炎症が明らかとなったことは、炎症性腸疾患治療薬の新規治療標的となりうることで期待される結果である。さらに、腸管ERストレスが腸管保護的に作用するIgAを誘導することが証明されたことは、過剰なERストレスによって悪化する腸内環境を維持するための、新しい腸管恒常性維持機能の発見となった。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress in intestinal epithelial cells (IEC), which can be induced by IEC-specific deletion of Xbp1 (Xbp1<sup>-/-</sup> IEC), an unfolded protein response-related transcription factor, develops spontaneous inflammation of the small intestine. Xbp1<sup>-/-</sup> IEC is shown to cause increased expression of MULT1 on of natural killer group 2 member D (NKG2D) ligands, associating with increased numbers of intraepithelial NKG2D-expressing group 1 innate lymphoid cells (ILC1). Blockade of NKG2D suppresses cytolysis against ER-stressed epithelial cells in vitro and spontaneous enteritis in vivo. Pharmacological depletion of NK1.1+ cells also significantly improved enteritis. IEC ER stress also induces a polyreactive IgA response via T cell independent and microbiota independent pathway, which is protective against gut inflammation. On the other hand, ER stress on mast cells can induce TNF and Amphiregulin via ER stress-related transcription factor ATF4.

研究分野：消化器内科

キーワード：小胞体ストレス Xbp1 NKG2D IgA 肥満細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が2011年から2014年まで在籍したBostonのBrigham and Women's Hospitalの消化器科の研究グループは、小胞体(ER)ストレスセンサーの一つであるinositol requiring enzyme 1 (IRE1) 下流の核内転写因子X-box-binding protein 1 (Xbp1) 遺伝子を腸管上皮細胞またはパネート細胞特異的に欠損させたマウス (*Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウス) において、亢進したERストレスがパネート細胞の異常や自然発症小腸炎をもたらすことを見出していたが、免疫細胞の動態については不明であった。また、このマウスモデルはクローン病類似の表現型を呈することから、クローン病に特徴的な腸管線維性狭窄に関与する細胞・分子などが過剰なERストレスによって変化することも推定された。

これまでに行ってきた、タモキシフェン誘導型腸管上皮特異的Xbp1欠損マウス (*Xbp1<sup>TΔIEC</sup>*) の解析から、Xbp1欠損マウスの小腸には優位に多くのtype 1 innate lymphoid cell (ILC1) 細胞が存在し、活性化状態にあることが確認されていた。また、腸管上皮細胞におけるNKG2Dリガンド発現解析の結果から、そのリガンドの一つであるMULT1がXbp1ノックアウト腸管上皮/Xbp1ノックダウン小腸上皮細胞株で高発現であった。これら結果から、*Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウスの自然発症腸炎発症にはNKG2D-NKG2Dリガンドのinteractionを介した免疫応答が関与していることが示唆されていた。一方、液性免疫に関しては、腸管内免疫グロブリンの定量から、*Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウスでIgAが増加していることが明らかとなっていたが、その誘導メカニズムや作用は明らかとはなっていない。

さらに本研究で注目した肥満細胞は、タンパク合成の盛んな細胞であることから、過剰なERストレスが生じていることが予測される細胞である。また、種々のメディエーターの産生を介して組織の線維性変化に関与する細胞である。実際、クローン病の線維性狭窄部には、平滑筋細胞増生とともに肥満細胞の集簇も認められることが報告されており (C Gelbmann, et al. *Gut*. 1999) また、肥満細胞ノックアウトマウスによる研究から、肥満細胞が炎症性腸疾患の炎症促進因子であることが報告されている (Kurashima Y, et al. *Nat. Commun.* 2012)。

## 2. 研究の目的

### (1) 腸管ERストレスによる自然免疫リンパ球誘導と腸炎:

予備実験で認めた *Xbp1<sup>TΔIEC</sup>* マウスにおける自然免疫リンパ球の増加・活性化の分子調節機構は不明であることから、腸管上皮からのERストレスsignalの解明と、自然免疫リンパ球を介した腸炎発症機構を明らかにすることを目的とした。

### (2) 腸管のERストレス下における液性免疫応答:

腸管上皮のERストレスからのシグナルにより誘導・活性化された樹状細胞が、IgAを誘導するメカニズムの解明と、腸管恒常性維持における役割を検討することを目的とした。

### (3) ERストレスによる肥満細胞の活性化

過剰なERストレスの肥満細胞における作用についての報告はないことから、本研究では探索的にERストレス下でのヒト肥満細胞株であるLUVAcell lineの遺伝子発現を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸管ERストレスによる自然免疫リンパ球と腸炎:

ILC1の分化や活性化にはIL-15が関与することが知られている。Xbp1欠損・ERストレスが腸管上皮細胞においてその産生を誘導している可能性が考えられたため、Xbp1ノックダウン、またはERストレス誘導剤であるThapsigargin (Tg) 刺激条件下での腸管上皮細胞株からのmRNA発現をqPCRで評価した。

*Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウスの自然発症腸炎発症における、NKG2D-NKG2Dリガンドのinteractionを介した免疫応答の役割を明確にするため、*Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウスへのNKG2D阻害抗体の腹腔内投与実験と、NK細胞depletion実験 (NK1.1抗体使用) を行った。マウスのILC1細胞はフローサイトメトリーで解析してdepletion効率を確認し、腸炎の評価は腸管組織のHE染色を解析した。

### (2) 腸管のERストレス下における液性免疫応答:

樹状細胞によるT細胞非依存性IgA誘導は、樹状細胞からのAPRIL、BAFF、レチノイン酸などの刺激によって行われることが知られているため、これらに関連した遺伝子発現の解析をqPCRで行った。レチノイン酸に関しては、Xbp1ノックダウン小腸上皮細胞株と骨髄由来樹状細胞の共培養を行った後に、樹状細胞におけるALDH酵素活性をフローサイトメトリーで検出した (ALDEFUOR試薬を用いて)。T細胞非依存性IgA誘導の証明には、TCT8欠損マウスと *Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウスを交配マウスやパイエル板欠損マウスを用いて証明した (共同研究先であるBrigham and Women's Hospitalで施行)。また、IgAの腸炎における役割を明らかにするためには、IgA欠損マウスやB細胞欠損マウスと *Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウスの交配マウスを用いた。

### (3) ERストレスによる肥満細胞の活性化:

ヒト肥満細胞株であるLUVAcell lineを用いて、ERストレス誘導剤であるTg刺激条件下に

おける各種 mRNA 発現を microarray で解析した。解析には KEGG パスウェイデータベースを用いた。Microarray で発現亢進が明らかとなった Amphiregulin については、そのコードする遺伝子である *AREG* を Tg 刺激後の経時的変化を定量 PCR 法で、培養上清中の蛋白発現を ELISA 法で測定した。

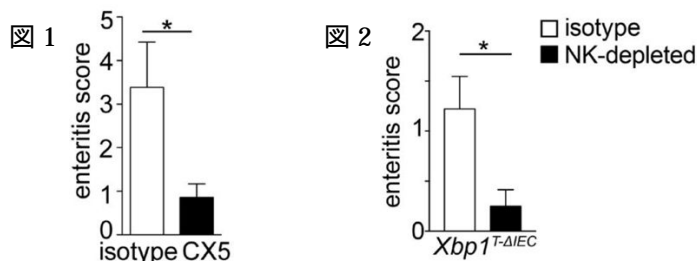
siRNA を用いたノックダウン実験・クロマチン免疫沈降(ChIP)・ルシフェラーゼアッセイで、小胞体ストレス応答による Amphiregulin 誘導機構を検討した。具体的には、siRNA アッセイでは *siATF4* で ATF4 をノックダウンした LUVA 細胞を Tg で 24 時間刺激後に、培養上清中の Amphiregulin を ELISA 法で測定した。また、ChIP アッセイでは Tg 刺激後 LUVA 細胞を用いて、抗 ATF4 抗体で免疫沈降後に、抽出した DNA を real-time PCR 法で解析し、ルシフェラーゼアッセイでは *AREG* のプロモーター領域 -1000bp をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に組み込み、Tg 刺激下でのレポーター活性を測定した。

ヒト小腸粘膜での Amphiregulin 発現を評価するために、コントロール 6 例とクローン病 6 例の手術切除標本を用いて、Amphiregulin 発現を免疫染色で比較検討した。

#### 4. 研究成果

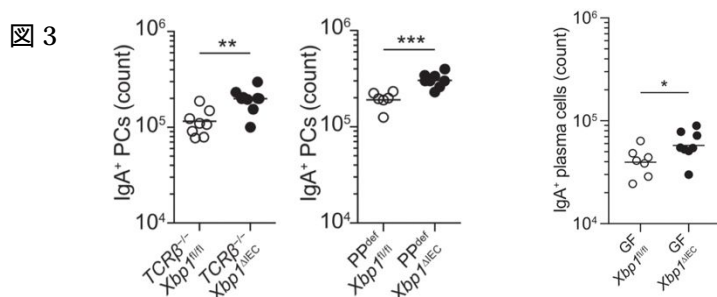
##### (1) 腸管 ER ストレスによる自然免疫リンパ球誘導と腸炎:

Xbp1 ノックダウン MODE-K 細胞の IL-15 発現を比較検討したが、Xbp1 ノックダウン細胞における発現亢進は認められなかった。また、共同研究先である Brigham and Women's Hospital の研究室の実験結果から、NKG2D 阻害抗体 (CX5) の腹腔内投与を行った *Xbp1<sup>T-ΔIEC</sup>* マウスでは、自然発症腸炎が抑制され (図 1)、また、NK 細胞 depletion を行った *Xbp1<sup>T-ΔIEC</sup>* マウスでも自然発症腸炎が抑制された (図 2) ことから、Xbp1 ノックアウトマウスの自然発症腸炎が NK 細胞・NKG2D を介したものであることが明らかとなった。



##### (2) 腸管の ER ストレス下における液性免疫応答:

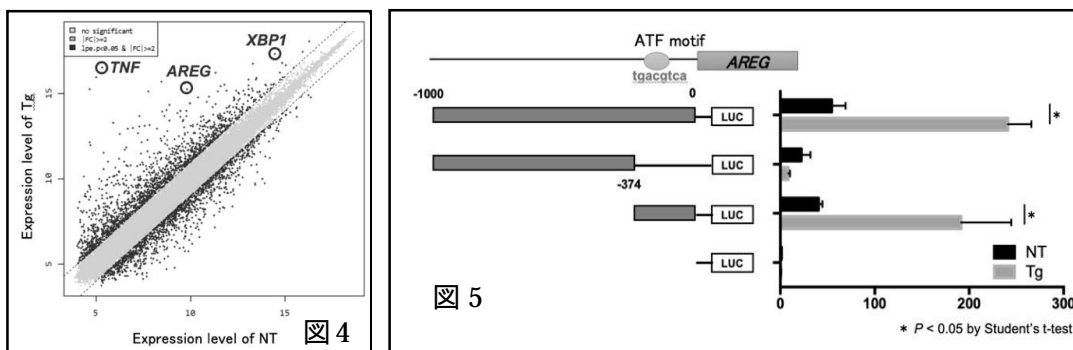
Xbp1 欠損マウスの腸管粘膜を用いた qPCR では、APRIL、BAFF の mRNA 発現には変化を認めなかった。MODE-K 細胞とマウス骨髄由来樹状細胞の共培養実験では、樹状細胞における ALDH 酵素活性の亢進が認められ、T 細胞非依存性 IgA 産生形質細胞が分化誘導されていることが考えられた。このことを裏付ける結果として、共同研究先である Brigham and Women's Hospital の研究室の実験結果 (図 3); TCR ノックアウトマウスやパイエル板欠損 (PP<sup>def</sup>) マウスモデル、Germ Free (GF) マウスでも、Xbp1 ノックアウトマウスの IgA 産生は亢進していたことから、*Xbp1<sup>ΔIEC</sup>* マウスにおいては T 細胞や炎症、腸内細菌叢非依存的に IgA が誘導されることが明らかとなった。さらに、この IgA は腹腔内 B1b 細胞が IgA 誘導の経路であることが判明した。



##### (3) ER ストレスによる肥満細胞の活性化

肥満細胞株の Microarray の解析から肥満細胞における過剰な小胞体ストレスは、小胞体ストレス応答関連遺伝子だけでなく、TNF・TNF superfamily やケモカインなどの炎症関連遺伝子の誘導や、EGF リガンドの一つである Amphiregulin の遺伝子を誘導することが確認できた (図 1)。この中で、炎症性腸疾患に大きく関与する TNF・TNF superfamily と、EGF 受容体に結合することで組織修復や線維芽細胞の増殖などに関与する Amphiregulin に注目した。まず microarray 結果の確認の為に、LUVA cell line の Tg 刺激条件下における Amphiregulin の mRNA (*AREG*) 発現を定量 PCR 法で、培養上清中の蛋白発現を ELISA 法で測定したところ、Tg 刺激により *AREG* 発現及び培養上清中の蛋白発現が誘導された。その誘導メカニズム解析

のために、ER ストレス応答で重要な各種核内転写因子のノックダウン実験を行い、ER ストレス応答核内転写因子の一つである ATF4 が AREG 誘導に重要な転写因子となった。AREG のプロモーター領域を含むレポータープラスミドを作成して行ったルシフェラーゼアッセイの結果、開始コドン 0～-374bp の領域にプロモーター領域が含まれることが示唆された(図 5)。また、抗 ATF4 抗体で免疫沈降後に抽出した DNA を real-time PCR 法で解析 (ChIP アッセイ) したところ、同領域に存在する ATF motif に ATF4 が直接結合している可能性が示唆された。クローン病患者の手術切除標本を用いた Amphiregulin 発現の比較検討を行ったところ、Amphiregulin 陽性の粘膜固有層細胞数が、コントロールに比較してクローン病患者では有意に高値を示した



多因子疾患と考えられている炎症性腸疾患(クローン病や潰瘍性大腸炎)の病因の一つとして、ER ストレスによって誘導される NKG2D-NKG2D リガンドを介した炎症が明らかとなったことは、炎症性腸疾患治療薬の新規治療標的となりうることを期待される結果である。さらに、腸管 ER ストレスが腸管保護的に作用する IgA を誘導することが証明されたことは、過剰な ER ストレスによって悪化する腸内環境を維持するための、新しい腸管恒常性維持機能の発見となった。また、肥満細胞で亢進した小胞体ストレスは、TNF $\alpha$  や Amphiregulin 産生を介して腸管炎症・線維性狭窄を惹起する可能性が考えられ、今後さらなる詳細な検討が必要である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Joep Grootjans†, Niklas Krupka†, **Shuhei Hosomi**† (†These three authors contributed equally), Juan D. Matute, Thomas Hanley, Svetlana Saveljeva, Thomas Gensollen, Jarom Heijmans, Hai Li, Julien P. Limenitakis, Stephanie C. Ganai-Vonarburg, Shengbao Suo, Adrienne M. Luoma, Yosuke Shimodaira, Jinzhi Duan, David Q. Shih, Margaret E. Conner, Jonathan N. Glickman, Gwenny M. Fuhler, Noah W. Palm, Marcel R. de Zoete, C. Janneke van der Woude, Guo-Cheng Yuan, Kai W. Wucherpfennig, Stephan R. Targan, Philip Rosenstiel, Richard A. Flavell, Kathy D. McCoy, Andrew J. Macpherson, Arthur Kaser, Richard S. Blumberg. Epithelial endoplasmic reticulum stress orchestrates a protective IgA response., *Science*, Mar 1;363(6430):993-998., 2019 ( 査読あり )
2. **Hosomi S**, Grootjans J, Huang YH, Kaser A, Blumberg RS. New Insights Into the Regulation of Natural-Killer Group 2 Member D (NKG2D) and NKG2D-Ligands: Endoplasmic Reticulum Stress and CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. *Front Immunol*. 2018 Jun 18;9:1324. 2018. ( 査読あり )
3. **Hosomi S**, Grootjans J, Tschurtschenthaler M, Krupka N, Matute JD, Flak MB, Martinez-Naves E, Gomez Del Moral M, Glickman JN, Ohira M, Lanier LL, Kaser A, Blumberg R. Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress promotes MULT1 up-regulation and NKG2D-mediated inflammation., *J Exp Med*. Oct 2;214(10):2985-2997. 2017 ( 査読あり )

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 小胞体ストレス応答による肥満細胞 Amphiregulin 発現誘導の検討  
細見周平, 山上博一, 藤原靖弘  
第 54 回日本消化器免疫学会総会 2017 年 9 月 28 日

〔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〕

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Blumberg S. Richard ( Brigham and Women's Hospital )

ローマ字氏名：Blumberg S. Richard

研究協力者氏名：杉田奈央子 ( 大阪市立大学大学院医学研究科 消化器内科学 )

ローマ字氏名：Sugita Naoko