

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08881

研究課題名(和文)膜型ATP分解酵素E-NTPD8による腸管腫瘍制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of the mechanism by which E-NTPD8 regulates development of colorectal cancer by hydrolysis of commensal bacteria-dependent ATP

研究代表者

香山 尚子 (Kayama, Hisako)

大阪大学・高等共創研究院・准教授

研究者番号：40548814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸上皮細胞に発現するE-NTPD8を欠損させたマウスでは、便中ATP濃度の上昇、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性大腸炎およびアゾキシメタン/DSS誘導性大腸癌の重篤化が示された。Entpd8/P2rx4二重欠損マウスでは、Entpd8欠損マウスにおける好中球の増加を原因とするDSS誘導性大腸炎の増悪が抑制された。P2rx4欠損大腸好中球では、野生型細胞で示されたATPgS刺激依存的な細胞死抑制が誘導されなかった。これらの結果より、大腸上皮細胞に発現するE-NTPD8による腸管腔内ATPの分解は、好中球の寿命延長を阻害し、大腸炎の重篤化および大腸癌の発症を防ぐことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される炎症性腸疾患(IBD)は、大腸や小腸の粘膜に慢性の炎症や潰瘍が生じる難治性疾患である。IBDは、「遺伝的素因」「環境」「腸内細菌」「上皮バリア」「免疫応答」が複雑に関わり合う多因子疾患のため未だ根治的治療法が確立していない。上皮細胞に発現する膜型ATP分解酵素E-NTPD8による腸内細菌由来の腸管腔内ATP分解がP2RX4シグナルを介した好中球による腸管炎症増悪を抑制することを明らかにした本研究の成果は、ATP/E-NTPD8/P2RX4といったIBD治療法の新規標的分子を同定した点で非常に意義深いものといえる。

研究成果の概要(英文)：E-NTPD8 was highly expressed in the apical aspect of epithelia cells of the colon. Entpd8-deficient mice showed higher levels of ATP in feces than that in wild-type mice. Entpd8-deficient mice developed severe colitis during administration of dextran sodium sulfate (DSS). In this context, Entpd8-deficient mice exhibited increased number of neutrophils in the colonic lamina propria. In addition, Entpd8-deficient mice suffered from severe colitis-associated colorectal cancer following treatment with azoxymethane plus DSS. Introduction of the P2rx4 deficiency into Entpd8-deficient mice drastically reduced large intestinal pathology with decreased number of neutrophils during DSS administration. Treatment with ATPgS induced prolonged life span of neutrophils isolated from the colon of wild-type mice, but not P2rx4-deficient mice. These findings demonstrate that E-NTPD8 in intestinal epithelial cells prevents neutrophil-mediated exacerbation of colitis via P2RX4 by hydrolysis of luminal ATP.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：ATP E-NTPD8 腸炎 大腸癌 P2RX4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ライフスタイルの変化に伴い、これまで欧米諸国の疾患とされていた炎症性腸疾患( IBD )の患者数は日本をはじめアジア諸国において急激に増加している。また、消化管の粘膜に慢性の炎症や潰瘍が生じる IBD の患者では、大腸がんの発症率が健常者の 10 倍以上になることが報告されている。そのため、IBD とそれに続く大腸がんの発症・病態に関わる分子メカニズムの解明に加え、予後規定因子や新規治療法開発を見据えた治療標的分子の同定が望まれている。腸管腔には腸内細菌由来のアデノシン三リン酸(ATP)が豊富に存在する。1 層の上皮により管腔から隔てられている粘膜固有層には、活性化された際に ATP を分泌する免疫細胞が豊富に局在している。Danger signal である細胞外 ATP は、多様な免疫細胞に作用し、炎症応答を惹起する。適切な炎症応答は生体防御に機能する一方、過剰な炎症応答は組織破壊につながる。免疫細胞の活性化に加え、ATP は、癌化上皮細胞の増殖を促進する。これらのことより、腸管炎症及びそれに続く大腸癌を防ぐため、腸管内では ATP 濃度が厳密に制御される必要がある。しかし、これまで、大腸組織における細胞外 ATP 制御機構の詳細は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

近年、ライフスタイルの欧米化に伴い、他の先進国と同様に、我が国においても IBD や大腸がん患者の数が急速に増加している。腸内細菌の代謝産物であるプロピオン酸・酪酸などの短鎖脂肪酸が大腸がん抑制に機能するが、二次胆汁酸は発がん作用を示すことが明らかとなっており(*Nat Rev Microbiol* 12(10): 661-672 (2014))、食生活の変化に伴う腸内細菌叢の組成変化が大腸がん発症・病態に深く関与することが強く示唆される。これまでに、腸内細菌が産生する ATP が、腸管粘膜固有層に局在する樹状細胞を活性化し、Th17 細胞の分化を誘導することで腸管恒常性維持に寄与することが明らかになっている(*Nature* 455 (7214): 808-812 (2008), *J Immunol* 189(6): 2869-2878 (2012))。しかし、宿主による腸内細菌由来 ATP 制御を介した大腸炎/大腸炎関連大腸癌の抑制機構については明らかになっていない。

DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns)の一種である ATP は、P2X/P2Y 受容体を介して細胞増殖・アポトーシス・炎症応答を制御することから (*Nat Rev Immunol* 16(3): 177-192 (2016))、厳密な ATP 濃度調節が生体の恒常性維持に必須であることが強く示唆されている。IBD 患者のミエロイド系自然免疫細胞において P2X7 受容体が高発現することが報告されている。また、腸管上皮細胞には P2X7 および P2X5 が発現することが報告されている(*Cell Tissue Res* 297: 111-117 (1999))。研究代表者らは、大腸上皮細胞に ATP 受容体に加え、膜型 ATP 分解酵素 E-NTPD8 が高発現していることを見出している。E-NTPD8 による大腸管腔内 ATP 濃度の制御が腸管恒常性維持に機能する可能性が示唆される。しかし、腸管炎症および大腸がんにおける腸管上皮細胞 E-NTPD8 の役割は明らかになっていない。本研究では、細胞外 ATP による腸管炎症とそれに続く腸管腫瘍の制御における膜型 ATP 分解酵素 E-NTPD8 の役割を明らかにすることにより、IBD および大腸炎関連大腸がんに対する新規治療法開発の基礎基盤提供を目指す。

### 3. 研究の方法

研究代表者らが作成した E-NTPD8 欠損(*Entpd8<sup>-/-</sup>*)マウスでは、野生型マウスに比べ大腸管腔内特異的に ATP 濃度が上昇することが示された。また、抗生剤投与により、*Entpd8<sup>-/-</sup>*マウス大腸管腔内の ATP 濃度は顕著に低下した。これらの解析結果より、定常状態において、大腸上皮細胞に発現する E-NTPD8 は、腸内細菌依存性の細胞外 ATP を分化することにより腸管恒常性維持に寄与していることが示唆される。しかし、E-NTPD8 欠損による ATP 濃度上昇が大腸炎および大腸がんに及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、以下の解析を通して E-NTPD8 による腸管恒常性維持機構の詳細な分子機構を明らかにする。

#### (1) *Entpd8<sup>-/-</sup>*マウスの大腸炎および大腸炎関連大腸がんに対する感受性の解析

野生型および *Entpd8<sup>-/-</sup>*マウスに、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を投与し、大腸炎を誘導し、体重減少・血便・下痢の重症度合いを解析する。さらに、大腸組織切片を作成し、病理組織の解析を行う。野生型マウスと *Entpd8<sup>-/-</sup>*マウスの間で DSS 誘導性大腸炎の症状に差が認められた場合、大腸粘膜固有層内の自然免疫細胞および獲得免疫細胞について解析を行う。

アゾキシメタン(AOM) + DSS 投与により大腸炎関連大腸がんに対する感受性について解析を行う。

#### (2) E-NTPD8 による大腸炎および大腸炎関連大腸癌の制御に関わる分子機構解明

E-NTPD8 欠損に伴う ATP シグナル亢進に関わる P2X/P2Y 受容体の同定

E-NTPD8 欠損による腸管恒常性維持の破綻に関わる腸管内細胞の同定

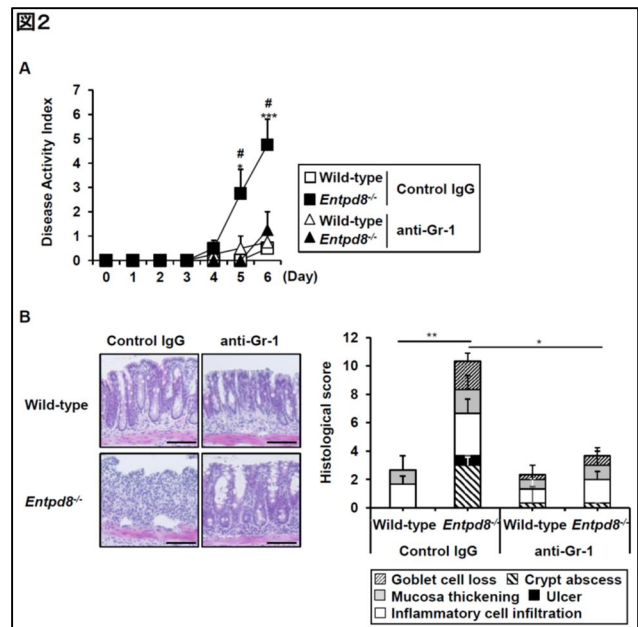
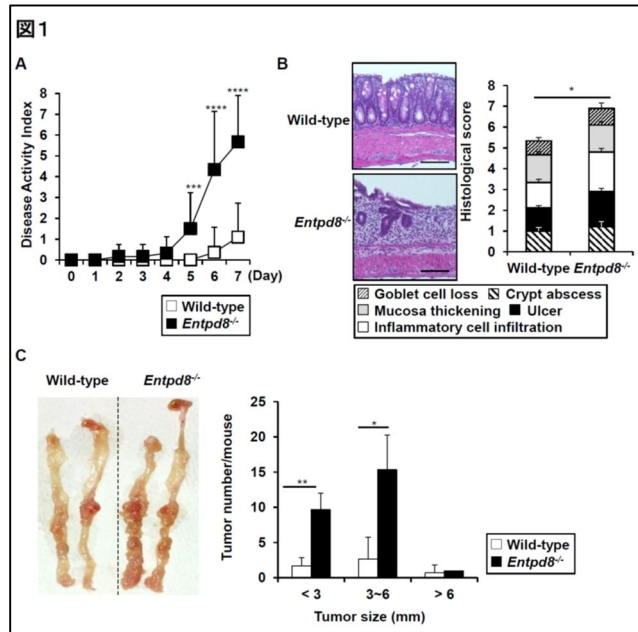
#### 4. 研究成果

蛍光免疫染色法による解析により E-NTPD8 は大腸上皮細胞の管腔側に発現することが示され、管腔内の腸内細菌由来の ATP を分解することが強く示唆された。 *Entpd8*<sup>-/-</sup>マウスに

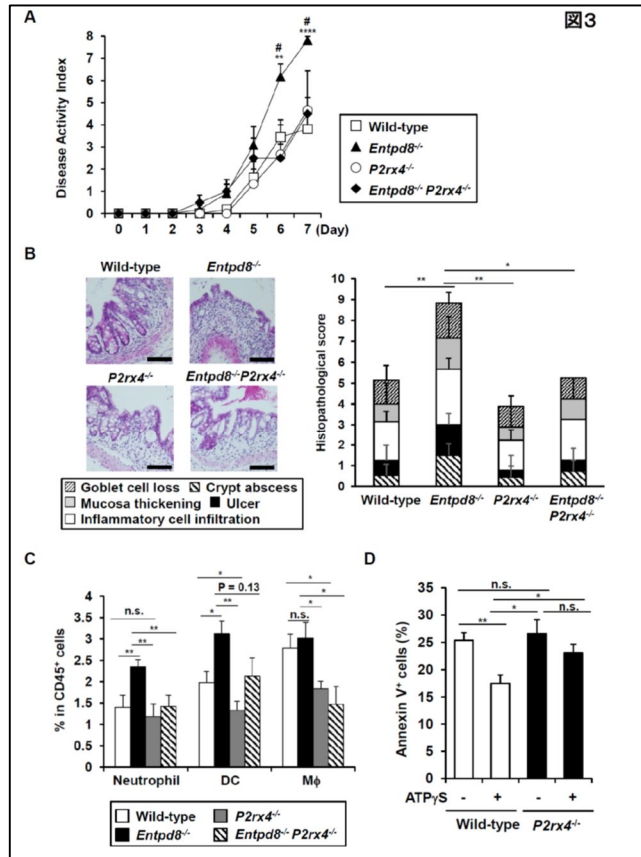
3%DSS を投与し大腸炎を誘導したところ、野生型マウスに比べ、体重減少・血便・下痢の重症度を示す Diseases activity score が顕著に高くなること(図 1 A)、ゴブレット細胞消失・陰窩膿瘍・粘膜肥厚・炎症性細胞浸潤・潰瘍などの病理組織学的所見においても大腸炎の重篤化が示されること(図 1 B)が明らかとなった。さらに、AOM+DSS 投与により大腸炎関連大腸がんを誘導したところ、 *Entpd8*<sup>-/-</sup>マウスにおいて大腸腫瘍数の増加が示された(図 1 C)。DSS 投与により大腸炎を誘導した *Entpd8*<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスに比べ、大腸粘膜固有層内において獲得

免疫細胞である Th17 細胞とミエロイド系自然免疫細胞である好中球の数が顕著に増加していた。Th17 細胞を含む獲得免疫細胞を有しない *Rag2*<sup>-/-</sup>*Ebtpd8*<sup>-/-</sup>マウスにおいても *Ebtpd8*<sup>-/-</sup>マウスと同様に DSS 大腸炎の重篤化および大腸粘膜固有層内の好中球増加が示された。そこで、DSS 投与 2 日目と 4 日目に抗 Gr-1 抗体を投与し、好中球の除去を行った。好中球除去により *Entpd8*<sup>-/-</sup>マウスにおける DSS 誘導性大腸炎誘導時の体重減少・血便・下痢が抑制されるとともに病理学的所見からも大腸炎の抑制が示された(図 2 A and B)。E-NTPD8 欠損に伴う好中球依存的な大腸炎の増悪に関わる ATP 受容体を同定するため、大腸上皮細胞とミエロイド系自然免疫細胞(好中球、CD64<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>マクロファージ、CD64<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>樹状細胞)を用いて RNA-seq 解析を行った。いずれの細胞においても P2X4 受容体(P2RX4)が発現することが

示されたことより、E-NTPD8 欠損に伴う大腸炎の増悪に P2RX4 シグナルが関与するかを明らかにするため *P2rx4*<sup>-/-</sup>*Ebtpd8*<sup>-/-</sup>マウスを作成し、DSS 誘導性大腸炎に対する感受性に関する解析を行った。 *Ebtpd8*<sup>-/-</sup>マウスに比べ *P2rx4*<sup>-/-</sup>*Ebtpd8*<sup>-/-</sup>マウスでは、DSS 投与後の体重減少・血便・下痢が抑制されるとともに病理組織解析においても腸管炎症の改善が示された(図 3 A and B)。さらに、 *P2rx4*<sup>-/-</sup>*Ebtpd8*<sup>-/-</sup>マウスでは、 *Ebtpd8*<sup>-/-</sup>マウスにおける大腸粘膜固有層内好中球の増加が顕著に抑制された(図 3 C)。野生型マウスと *P2rx4*<sup>-/-</sup>マウスの大腸粘膜固有層内の好中球を回収し ATPγS(非加水分解 ATP アナログ)存在下で 5 時間培養したの



ち Annexin V および Propidium iodide で染色し、死細胞の割合を解析した。野生型好中球は、ATPgS 刺激により Annexin V 陽性を示すアポトーシス細胞の割合が減少したが、P2X4 受容体を欠損した大腸好中球では ATPgS 依存的な細胞死抑制が誘導されなかった(図 3 D)。これらの結果より、大腸上皮細胞に発現する E-NTPD8 による管腔内 ATP の分解は、好中球の寿命延長を阻害し、大腸炎の重篤化を抑制するとともに大腸炎関連大腸がんの発症を防ぐことが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 香山尚子
2. 発表標題 消化管内腔アデノシン3リン酸（ATP）制御を介した腸管恒常性維持機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Tani, Hisako Kayama, and Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 The hydrolysis of commensal bacteria-derived ATP by ENTPD8 suppresses neutrophil-mediated colitis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考