

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09366

研究課題名(和文) ビタミンAを介した腸管マクロファージ・オートファジー調節機序

研究課題名(英文) Vitamin A regulates autophagy of intestinal macrophages

研究代表者

平賀 寛人 (Hiraga, Hiroto)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：80637546

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)：1. VAD DSS腸炎マウス大腸粘膜下層では非古典的インフラマソームが活性化している。2. レチノイン酸受容体(RAR)阻害薬処理したマクロファージ細胞株(RAW264.7)では、非古典的インフラマソーム経路によるパイロトーシスが亢進している。3. 抗IL-1b抗体はVAD DSS腸炎マウスにおける生存率・体重曲線を有意に改善させる。4. 活動期CD患者の血清中ビタミンA濃度は、非活動期CD患者と比較して有意な低下を認め、他、CRPと有意な相関関係を認める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VADマウスでは腸炎モデル・感染モデルのいずれにおいても宿主抵抗性が減弱しており、ビタミンAがマクロファージのパイロトーシスに及ぼす影響と炎症性腸疾患の病因・病態に関与している可能性が示唆された。ビタミンAが自然免疫系におけるパイロトーシスに及ぼす影響を明らかにすることで、自己炎症性疾患に対する寛解導入・維持療法への応用や診断・治療効果判定の新規バイオマーカーとなる可能性があるという点で非常に有意義と考えられた。

研究成果の概要(英文)：1. IL-1b production and non-canonical inflammasome activity of lamina propria separated by EDTA perfusion method were significantly higher in VAD mice compared with VAS mice, whereas TNF-a production was not increased. 2. Pyroptosis through non-canonical inflammasome signaling was increased in RAW264.7 cells pre-treated with Ro41-5253. 3. VAD mice treated with anti-IL-1b monoclonal antibody revealed amelioration of DSS-induced colitis in both of survival rate and bodyweight course. 4. serum vitamin A levels of active CD patients are lower than those of inactive CD patients, and serum vitamin A levels are related with disease activity and CRP.

研究分野：消化管免疫

キーワード：ビタミンA マクロファージ オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

Single nucleotide polymorphism (SNP)を用いた全ゲノム相関解析で特定された感受性候補遺伝子から、クローン病 (Crohn's disease; 以下CD) のdisease pathwayとして「細胞内細菌の処理異常」が挙げられている。検出された30以上のCD感受性遺伝子の中に、細胞質内細菌処理システムであるオートファジー関連分子であるATG16L1 (autophagy-related protein 16-1)とIRGM (immunity-related GTPase family M)が含まれている。オートファジーは、細菌・ウイルス・寄生虫など様々な病原体の侵入から細胞を防御する自然免疫機構としても機能しており、細胞内寄生菌 (*Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* etc.) を捕らえて殺し、宿主細胞の細胞質における増殖を阻止する能力を持つ。

一方、食餌中ビタミンAは、視覚、上皮再生、血液細胞の分化など多岐にわたる生物活性を持つレチノイン酸の前駆物質として恒常性の維持に必要不可欠であり、CDに対する治療のひとつである経腸栄養療法で用いる成分栄養剤エレンタール(味の素ファーマ)は、ビタミンA含有量が多い(約600 IU/1パック=300kcal、成人必要量:1800-2000 IU/日)。本邦では比較的高い寛解導入率が報告されているが、いまだに明確な作用機序は不明であり、その作用機序の一つにビタミンAが関与している可能性がある。これまでにビタミンAがTリンパ球の小腸へのホーミングに関与しているという報告 (Iwata M, et al. Immunity, 2004;21:527-538) はあるが、ビタミンAが腸管粘膜バリアー機能に及ぼす影響や自然免疫系のマクロファージやオートファジー機能に関連する可能性に着目した報告はない。

研究代表者らはこれまでに炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病) の病因・病態解明に関する研究の一環として、ビタミンAが腸粘膜バリアー機能に及ぼす影響に関する解析を行ってきた。ビタミンA欠乏食を継続して作製したビタミンA欠乏 (Vitamin A-deficient: VAD) マウスでは、DSS誘発腸炎に対する抵抗性が減弱する (The 2<sup>nd</sup> Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology, 2008)。T・B細胞が欠損したSCIDマウスにおいても同様の結果であり、ビタミンA欠乏状態での粘膜障害増悪の機序としてT・B細胞以外の腸管上皮の機能異常、あるいは粘膜固有層マクロファージの機能異常が関与しているものと考えられる(腸炎モデル)。

また、VAD SCID マウスにおいて細胞内寄生菌である *Listeria monocytogenes* に対する感染抵抗性の減弱及びマクロファージの殺菌能低下を認めること、*Salmonella typhimurium* 経口感染に対する抵抗性が減弱していることを予備実験にて確認している (感染モデル)。

VAD マウスでは腸炎モデル・感染モデルのいずれにおいても宿主抵抗性が減弱しており、ビタミンAがマクロファージ・オートファジー機能に及ぼす影響と炎症性腸疾患の病因・病態に関与している可能性に着目し、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ビタミンAが腸管マクロファージのオートファジー機能に及ぼす影響と炎症性腸疾患の病因・病態への関与について明らかにすることを目的に以下仮説を検証する。

- (1) ビタミンA欠乏マウス・デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発腸炎増悪には、オートファジー機能低下を介したNLRP3(nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing pyrin receptor 3)インフラマソーム活性化が関与している (腸炎モデル)。
- (2) ビタミンA欠乏マウスでは、腸内細菌(*Salmonella typhimurium*)・細胞内寄生菌(*Listeria monocytogenes*)に対するマクロファージのオートファジー機能が低下する (感染モデル)。

(3) CD に対する成分栄養剤 ( エレンタール ) の作用機序にビタミン A が関与している。

### 3 . 研究の方法

(1) VAD ・ DSS 誘発腸炎マウスの粘膜下組織におけるオートファジー関連分子を解析する。

(2)VAD マウス CD11b<sup>+</sup>脾細胞 ・ RAR を siRNA 処理したマクロファージ細胞株を用いて、LPS 刺激時の NLRP3 インフラマソーム ・ オートファジー関連分子の動態を解析する。

(3)VAD GFP-LC3II トランスジェニックマウスを用いて DSS 誘発腸炎マウスを作製し、ビタミン A 欠乏状態におけるオートファゴソーム発現量 ・ オートファジー機能を評価する。

(4)抗 IL-1b 抗体またはエレンタールによるオートファジー機能の reverse 効果を確認する。

(5)CD 患者血清中ビタミン A 濃度と血清中及び腸管局所の IL-1b 発現との相関を明らかにする。

### 4 . 研究成果

(1) VAD DSS 腸炎マウス大腸粘膜下層では、タンパクレベルで Caspase-11 ・ GSDMD ・ IL-1b 発現が亢進しており、非古典的インフラマソームが活性化していた。

(2) レチノイン酸受容体 ( RAR ) 阻害薬処理したマクロファージ細胞株 ( RAW264.7 ) では、タンパクレベルで Caspase-11 ・ IL-1b 発現が亢進しており、非古典的インフラマソーム経路によるパイロトーシスが亢進していることが明らかとなった。

(3) VAD GFP-LC3II トランスジェニックマウスの大腸粘膜下層では、オートファゴソーム形成が亢進している一方で、p62 発現量は減少しておらず、VAD マウスにおけるオートファジー機能不全の存在が示唆された。

(4) 抗 IL-1b 抗体は VAD DSS 腸炎マウスにおける生存率 ・ 体重曲線を有意に改善させた。

(5) 活動期 CD 患者の血清中ビタミン A 濃度は、非活動期 CD 患者と比較して有意な低下を認めたと他、CRP と有意な相関関係を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 7. Tanaka N, Hiraga H, Sakuraba H, Murai Y, Maeda T, Watanabe R, Ota S, Akemoto Y, Hasui K, Yoshida S, Asano K, Nakane A, Fukuda S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Vitamin A deficiency impairs host resistance to <i>Listeria monocytogenes</i> infection through excessive apoptosis of macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hiroasaki Med. J.	6. 最初と最後の頁 163-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroto Hiraga
2. 発表標題 Retinoic acid regulates pyroptosis of macrophages and experimental colitis through non-canonical inflammasome signaling.
3. 学会等名 The 7th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (AOCC 2019) in Taipei (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平賀寛人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 講談社MOOK	5. 総ページ数 110
3. 書名 食と医療	

〔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