

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06928

研究課題名(和文) ホメオボックス転写因子CDX2による腸管粘膜免疫防御機構の解明

研究課題名(英文) Intestinal mucosal barrier by homeobox protein CDX2

研究代表者

青木 耕史 (Aoki, Koji)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40402862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は、遺伝的素因に環境因子が加わることなどにより生じる難治性の慢性炎症性疾患である。また、根本的治療法が未確立となっており、より良い治療薬の開発が急務となっている。しかし、本疾患の発症メカニズムについて解明されている機序は少なく、病因の解明が大きな課題となっている。本研究課題では、腸管上皮細胞に特異的に発現するホメオボックス転写因子CDX2が、腸管上皮細胞の機能制御を介して腸管の粘膜免疫をコントロールする発見を基に、新たに確立した炎症性腸疾患モデルマウスを用いて、腸管上皮細胞による新たな粘膜免疫防御の制御基盤の解明として研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は、遺伝的素因に環境因子が加わることなどにより生じる難治性の慢性炎症性疾患である。主に内科的治療が施されるが、根本的治療法が未確立となっており、根本的治療法の開発が不可欠な疾患として、難治性疾患に指定されている。また、外科的処置による完治が難しいことから、治療薬の開発が不可欠と考えられる。そこで、本疾患の発症メカニズムを解明することが重要と考えられている。本研究課題では、炎症反応の中心となる免疫細胞ではなく、腸管の内腔面を覆う上皮細胞に着眼していることに特徴があり、これまでに明らかにならなかった発症機構の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel diseases such as chron's disease and ulcerative colitics are konwn to be caused by multiple factors including genetic and environmental predispositions, whereas the mechanisms that induce the diseases are unclear. We have found that homeobox transcription factor CDX2 plays a key role in intestinal mucosal defense through autophagy in the intestinal epithelial cells. Then, we investigate possible roles of CDX2 in development of the inflammatory diseases, aiming to find the therapeutic target.

研究分野：腫瘍薬理学

キーワード：炎症性腸疾患 クローン病 腸管上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は、遺伝的素因に環境因子が加わることなどにより生じる難治性の慢性炎症性疾患である。また、主に内科的治療が施されるが、根本的治療法が未確立となっており、より良い治療薬の開発が不可欠となっている。しかし、本疾患の発症メカニズムについて解明されている機序は少なく、病因の解明が課題となっている。

本研究課題では、腸管上皮細胞に特異的に発現するホメオボックス転写因子 CDX2 が、腸管上皮細胞の機能制御を介して腸管の粘膜免疫をコントロールする発見を基に、腸管上皮細胞による新たな粘膜免疫防御の制御基盤の解明を目的に研究を進める(文献1と2)。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患の発症機序解明を目的に CDX2 による腸管粘膜防御の制御基盤を解明する。

とくに *Cdx2* 変異マウスに炎症性腸疾患モデル(DSS 腸炎/細菌性腸炎)を用いて腸炎を誘発し、CDX2 の粘膜防御機能および CDX2 により活性化するオートファジーの粘膜免疫における役割を明らかにする。腸管上皮細胞における、CDX2 によるオートファジーの活性化機序を解明する。CDX2 と CARD18 を介した腸管上皮細胞におけるインフラマソーム活性化制御機序を明らかにする。

3. 研究の方法

CDX2 による腸管の粘膜防御機能の個体レベルの解析

DSS 腸炎および細菌性腸炎を誘発するために、野生型マウス、*Cdx2* 欠損マウス、および *Cdx1/Cdx2* 欠損マウス(*Cdx1* は *Cdx2* の機能を補償するため)に DSS または、病原性細菌を感染させて、腸管上皮細胞内の細菌数の解析、LC3B-II 発現量の定量、炎症度の病理組織学的評価を行う。

CDX2 によるオートファジーの制御機構の解明

腸管上皮細胞由来のオルガノイド細胞にて、オートファジーの活性を LC3B を指標に解析する。また、CDX2 の結合蛋白質を質量分析法により解析を行い、CDX2 によるオートファジーの活性制御機構などの解析を進める。

CDX2 によるインフラマソームの抑制機構の解析

ヒト腸管上皮細胞を用いて、CDX2 の発現を誘導して、cDNA マイクロアレイ解析を行い、炎症に関わるシグナルの解析を行う。

4. 研究成果

CDX2 による腸管の粘膜防御機能の個体レベルの解析

DSS 腸炎および細菌性腸炎を誘発するために、野生型マウス、*Cdx2* 欠損マウス、および *Cdx1/Cdx2* 欠損マウス(*Cdx1* は *Cdx2* の機能を補償するため)に DSS を投与したところ、野生型に比べて、*Cdx1/Cdx2* 欠損マウスでは、腸炎が誘発されることが分かった。また、その際のオートファジーの活性化の程度が、*Cdx* 変異により減弱することも分かった。これらのことから、CDX がオートファジーの活性化に寄与することや、炎症を抑制することが個体レ

ベルで分かった。

加えて、病原性細菌を、それらの変異マウスに感染させた場合に、腸管における病原性細菌の増殖が *Cdx* 変異によって、より促されることも分かった。この結果と一致して、ヒト腸管上皮細胞由来の細胞にて CDX2 の発現を誘導すると、オートファジーの活性化依存性に病原性細菌の上皮細胞内での増殖を抑制することが分かった。これらのことから、CDX2 は、腸管粘膜の免疫防御に働いていることが分かった。

CDX2 によるオートファジーの制御機構の解明

マウスの腸管から、回収した腸管上皮細胞のオルガノイド細胞にて、LC3B を指標にして解析したところ、CDX 変異により腸管上皮細胞におけるオートファジーが減弱することが分かった。これは、ヒト腸管上皮細胞由来の細胞で、CDX2 の発現を誘導したときに、オートファジーが活性する結果と一致した。

また、flag-CDX2 複合体に結合する分子を質量分析および免疫沈降実験により解析したところ、CDX2 がオートファジーの関連分子 ATG7 に結合することや、それ以外に、3 個の新たな CDX 結合分子を同定した。それらの分子への結合を介して、CDX2 が、オートファジーの活性を制御する機構について解析を進めている（文献 3）

CDX2 によるインフラマソームの抑制機構の解析

cDNA マイクロアレイ解析から、CDX2 の発現誘導により最も発現量が増加する遺伝子として CARD18 を同定した。生化学実験から、CARD18 は、caspase-1 を抑制することが報告されているが、ヒトゲノムにのみ存在し、マウスゲノムにないため、生理的・病態的状态における役割が不明である（文献 4）。

ヒト腸管上皮細胞において、CDX2 で誘導される CARD18 がインフラマソームを抑制する結果が得られた。これらのことから、「CDX2 →CARD18 →Inflammasome」と思われる。

さらに、腸管上皮細胞株において CDX2 が CXCL1、CXCL3 などの免疫細胞の遊走に関わる炎症性ケモカインや炎症性タンパク質である血清アミロイドの発現を強く抑制することが分かった。これらの結果は、CDX2 が腸管への免疫細胞への遊走や、遊走された免疫細胞の活性を制御することで腸管の粘膜免疫を調節している可能性を示唆していると思われる。

引用文献

1. Aoki K and Sugai M. Roles of the epithelial autophagy in the intestinal mucosal barrier. Springer Press (Chronic inflammation: Elucidation and Control of the mechanisms). 603-616, 2016.
2. Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, and Taketo MM. Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27^{Kip1}. *Cancer Research*, Vol. 71(2), 593-602, 2011
3. Nitta A, Hori K, Tanida I, Igarashi A, Deyama Y, Ueno T, Kominami E, Sugai M, Aoki K. Blocking LC3 lipidation and ATG12 conjugation reactions by ATG7 mutant protein containing C572S. *Biochem Biophys Res Commun*, 508(2), 521-6, 2019.
4. Humke EW et al., ICEBERG: a novel inhibitor of interleukin-1beta generation. *Cell* 29, 99-111, 2000

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 Nitta A, Hori K, Tanida I, Igarashi A, Deyama Y, Ueno T, Kominami E, Sugai M, Aoki K.	4. 巻 508(2)
2. 論文標題 Blocking LC3 lipidation and ATG12 conjugation reactions by ATG7 mutant protein containing C572S	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 521-526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.158.	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 Aoki K
2. 発表標題 Mechanism that controls colon cancer stemness, via PAF1 complex through a competition between b-catenin and CDX2
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究分担者	堀 一也 (Hori Kazuya) (50749059)	福井大学・学術研究院医学系部門・助教 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------