

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16949

研究課題名（和文）腸管上皮細胞における小胞体ストレス応答関連分子CHOPの役割の解析

研究課題名（英文）The role of CHOP in intestinal epithelial cells

研究代表者

下平 陽介（Shimodaira, Yosuke）

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20777982

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）：CHOPを腸管上皮特異的にノックアウトしたマウス(CHOP^{-/-} IEC)を作成することにより、*in vivo*の腸管上皮におけるCHOPの役割を検討した。CHOP^{-/-} IECマウスは出生、その後の成長およびマクロ、組織学的な腸管の明らかな変化を認めなかった。DSSにより腸炎を誘導すると、CHOP^{-/-} IECマウスではコントロールマウスと比べて腸炎が軽快した。さらに腸管上皮におけるCHOPの役割を解明するために糞便、腸管上皮細胞などを採取しDNA、RNA、タンパクなどを抽出しメカニズムの検討を行った。現在結果は解析中であり完了次第報告する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス応答に関わる分子であるCHOPが腸管上皮細胞において腸炎保護的に関わることが明らかとなった。現在解析中であるが、オートファジーやアポトーシス、その他の小胞体ストレス応答関連分子との関わりを明らかにすることでメカニズムが明らかとなる可能性がある。炎症性腸疾患は患者数が増え、難治例も増えている。本研究結果を元に新たな機序の治療法に展開していくことが重要である。また小胞体ストレス応答は細胞維持の基礎となる細胞内機構の一つであり、腸炎だけでなく他疾患との関わりについても発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have generated mice in which CHOP was specifically knocked out in the intestinal epithelium (CHOP^{-/-} IEC) and investigated the role of CHOP in the intestinal epithelium *in vivo*. CHOP^{-/-} IEC mice were born normally and showed no significant changes in the intestinal tract growth macroscopically and histologically. CHOP^{-/-} IEC mice reduced DSS-induced colitis compared with that in control mice. Furthermore, in order to elucidate the role of CHOP in the intestinal epithelium, we collected feces, intestinal epithelial cells and extracted DNA, RNA, and protein, and examined the downstream assay of intestinal microbiota, and qPCR, and Western blotting to investigate the mechanism. Results are currently under analysis and will be reported when finished.

研究分野：消化器内科学

キーワード：CHOP 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

炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease:IBD)は、消化管に慢性炎症を来たす原因不明の慢性腸炎である。発症には複雑なメカニズムが関与し、免疫などに関わる遺伝子の多型、腸内細菌を含めた腸管内容物に対する異常免疫応答などが疾患の発症や維持に関わることが知られている。

小胞体ストレス応答とは、過剰なタンパク合成や変性タンパクの蓄積などにより小胞体でのタンパク質の折りたたみ等のプロセッシングが正常に行えなくなると、タンパクの翻訳を制御し負荷を減らすなど細胞の恒常性を維持するための仕組みである。オートファジーは二重膜構造物が細胞内小器官を包み込みリソソームで分解し、その成分を再利用するなど細胞内恒常性に重要な役割をもつ細胞内分解機構である。2008年にIBDの新たな疾患感受性遺伝子として小胞体ストレス応答関連分子であるXBP1が同定された。また、2007年にはオートファジー関連分子であるATG16L1が同様に疾患感受性遺伝子として同定されていたが、それまで小胞体ストレス、オートファジーがIBDと関わっていることは予想されていなかった。さらにこれらの知見を基に機能解析が行われ、細胞内において小胞体ストレスがオートファジーを誘導すること、パネート細胞において小胞体ストレス-オートファジーの機能経路が腸炎と関連することが示された。腸管上皮細胞の小胞体ストレスは、さらに腸管免疫における主要な免疫グロブリンであるIgA分泌にも関わり腸管免疫制御に重要な役割を果たすことなどが示されてきているものの、小胞体ストレスがどのようにIBDと関わるかについての知見は未だ乏しく、IBDの病態解明や治療法の開発などの面からも研究する必要があるテーマである。

CHOP(C/EBP-homologous protein)は、小胞体ストレスの持続などにより細胞をアポトーシスへと誘導する小胞体ストレス応答に関わる分子である。また、CHOPは小胞体ストレスによるオートファジーの誘導に関連する分子であることが示唆されている。CHOPのノックアウトマウスはDSS誘導性腸炎を軽快させるなど、CHOPは腸管免疫に重要な役割を果たしている。In vivoでの腸管上皮細胞においてCHOPを強制発現させたマウスの報告もあり、このマウスではDSS腸炎が増悪することが示された。しかし、CHOPの腸管上皮細胞におけるオートファジーやアポトーシスとの関連やCHOPが欠損した場合のphenotypeなどについては知られていない。申請者はin vitroにおいて大腸癌細胞における小胞体ストレス-オートファジー機能経路にCHOPが重要な役割を持つことを示した。これはin vitroの実験における主に大腸癌培養細胞株すなわち腸管上皮系細胞を用いた結果であるものの、in vivoでも同様に腸管上皮細胞における小胞体ストレス-オートファジー経路にCHOPが関与している可能性が考えられる。このように、本研究ではin vivoの腸管上皮細胞におけるCHOPは小胞体ストレスによるオートファジーの誘導に関与するという仮説をたてた。

小胞体ストレス応答とオートファジーは遺伝子解析の結果などからそれぞれIBDに関わること

が予想されているものの、どのようにIBDの病態に関与するかに関してはまだほとんどわかっていない。小胞体ストレス応答関連の分子でありオートファジーとも関わることが示唆されているCHOPの、特にin vivoにおいて腸管上皮細胞における機能、腸炎との関わりについて解析することで、小胞体ストレス応答やオートファジーに関する新たな知見を得たいと考えている。

2．研究の目的

本研究の目的はin vivoで腸管粘膜バリアの重要な役割を担う腸管上皮細胞におけるCHOPの機能を解析し、IBDにおけるCHOPの役割を明らかにすることである。

3．研究の方法

CHOPfloxマウスの凍結受精卵および腸管上皮細胞のプロモーターとして広く用いられているvillin-Cre成体マウスをJackson Laboratoryから購入する。凍結胚受精卵を仮親マウスに移植し個体発生を試みる。成体化に成功したマウスを用いCHOPfloxマウスとvillin-Creマウスを掛け合わせることでCHOPの腸管上皮特異的欠損マウス(CHOP^{IEC})を作成する。マウスに対し3%DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)水を1週間飲用させることによりDSS誘導性腸炎を引き起こす。CHOPfloxマウスをコントロールとし、CHOP^{IEC}マウスにおける定常状態およびDSS誘導性腸炎時のphenotypeを検討する。腸管粘膜におけるRNA発現、タンパク発現はqPCR、western blottingまたは免疫染色にてそれぞれ解析を行う。炎症の程度は体重減少の程度、DAIスコア、組織学的検討を行う。糞便中の16SrRNAを解析し腸内細菌叢を検討する。同時に糞便中代謝物をLC-MSを用いたメタボローム解析を行う。小胞体ストレス応答、オートファジー、アポトーシスの変化を中心に解析する。

腸管上皮細胞のphenotypeとして、増殖能や、tight junctionなど腸管バリアに関わる機能についても、BrdU取り込みやtight junction関連分子の免疫染色を行い解析する。

4．研究成果

CHOPfloxマウスの個体発生に成功し、CHOP^{IEC}マウスの作成を行った。CHOP^{IEC}マウスは概ねメンデルの法則に従い出生し、個体の成長に関しても変化は認めなかった。また、同マウスにおいてマクロ、組織学的な腸管の明らかな変化を認めなかった。

DSSにより急性腸炎を誘導すると、CHOP^{IEC}マウスではコントロールマウス(それぞれn=6)と比べて体重減少、下痢、血便で構成されるDAIスコアが軽快した。さらに腸管上皮におけるCHOPの役割を解明するために腸管膜リンパ節、腸組織、腸管上皮細胞などを採取しRNA、タンパク抽出を行った。小胞体ストレス応答、オートファジー、アポトーシスに関わる遺伝子発現、

タンパク発現を qPCR、western blotting、免疫染色で一部実施しており結果を解析中である。また糞便を採取し、DNA 抽出を行った。現在 16SrRNA 解析により腸内細菌叢を検討している。残りの実験を行い完了次第学会および学術誌で報告する予定である。

腸管上皮細胞における CHOP は DSS 誘導性腸炎において炎症を増悪させる役割を有していることが明らかとなった。本知見に基づきそのメカニズムをさらに解明することにより腸管炎症の病態を一部明らかにできるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------