

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22895

研究課題名(和文)炎症性腸疾患におけるIFN-1によるautophagyを介した新規病態の解明

研究課題名(英文) Analysis of the IFN-1 and autophagy mediated pathogenesis in inflammatory bowel disease

研究代表者

伊藤 剛 (Ito, Go)

東京医科歯科大学・高等研究院・プロジェクト助教

研究者番号：20733900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：IFN-1は腸上皮細胞において細胞死を誘導すること、同作用はAtg16L1欠損腸上皮で著しく増幅・促進されることを明らかとした。また細胞死制御におけるキー分子の一つであるRIP1のキナーゼ活性を不活化させることによりIFN-1誘導性細胞死に抵抗を示し、Atg16L1欠損下における細胞死増強作用も抑制することを明らかとした。細胞内オートファジーが障害された環境ではIFN-1応答が増強・促進されることから、腸上皮におけるIFN-1-オートファジー相互作用が炎症性腸疾患の病態において重要な役割を担っていることが考えられ、同作用においてRIP1キナーゼ活性が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染は炎症性腸疾患の再燃・増悪因子の一つである。ウイルス感染によりIFN-1は分泌されることが知られている。今回我々は腸上皮における炎症性腸疾患の責任遺伝子であるオートファジー関連遺伝子Atg16L1とRIP1キナーゼが制御する細胞死を介して局所炎症の惹起・遷延に繋がる新規IFN-1応答を明らかとした。以上のことにより「感染による炎症性腸疾患の炎症増悪、遷延に対する新規治療の開発」「新規オートファジー関連細胞死のメカニズムの解明」につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that IFN-1 induces cell death in intestinal epithelial cells and that this effect is significantly accelerated in Atg16L1-deficient intestinal epithelium. In addition, inactivation of RIP1 kinase, one of the key molecules in the regulation of cell death, confers resistance to IFN-1-induced cell death and suppresses the cell death-enhancing effect in Atg16L1-deficient intestinal epithelium. The IFN-1 response is enhanced and promoted in an environment where intracellular autophagy is impaired, suggesting that the IFN-1-autophagy interaction in the intestinal epithelium plays an important role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and that RIP1 kinase activity may play an central role in this interaction. RIP1 kinase activity may play an important role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：IFN-1 Atg16L1 アポトーシス ネクロトーシス RIP1キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)研究代表者の前所属研究室のグループが中心となり実施した GWAS 解析によりオートファジー関連遺伝子 Atg16L1 が炎症性腸疾患の疾患感受性遺伝子として同定された (Nat Genet, 2007)。以来、オートファジーは炎症性腸疾患の病態研究において注目を集めてきた。

(2)研究代表者は上記の Atg16L1 に注目し、同遺伝子欠損マウスを用いて大腸炎における腸上皮再生に重要な役割を有する IL-22 に関する解析を行った。その結果、IL-22 が腸上皮細胞における小胞体ストレスを誘導し、cGAS-STING 経路を介して IFN-1 の分泌を促すという知見を得た。また Atg16L1 欠損下では IL-22 依存的な小胞体ストレス応答を介し腸上皮による IFN-1 分泌を増幅・亢進させること、これにより腸上皮細胞死を誘導するという、従来とは全く異なる IL-22 の機能的役割を解明し報告した(図 1)。一方、腸上皮 IFN-1 受容体の阻害により、Atg16L1 欠損マウスにおける IL-22 を介した DSS 腸炎の増悪が抑制されたことから、IFN-1 が腸上皮に対する直接作用を通じて大腸炎の病態に重要な役割を担っているという仮説を着想した。

(3)IFN-1 は本来、ウイルス感染等により分泌が促進され、免疫応答を惹起する主たる役割を果たすことが示されているが、腸上皮に対する直接作用の詳細やオートファジー・細胞死との機能的な繋がりについては詳細が不明であった。

2. 研究の目的

IBD の発症・再燃因子の一つとしてウイルス感染等を契機とした I 型インターフェロン(IFN-1)を中心とした免疫応答が知られているが、腸上皮における IFN-1 応答の意義・役割の詳細は明らかでない。また GWAS 解析により疾患感受性遺伝子の一つとしてオートファジー関連遺伝子 Atg16L1 が同定されている。我々は腸上皮 IFN-1 受容体の阻害により、Atg16L1 欠損マウスにおける IL-22 を介した DSS 腸炎の増悪が抑制されたことを報告した(*J Exp Med* 2017)。そのため腸上皮における「オートファジー」と「細胞死」を介して局所炎症の惹起・遷延に繋がる新規 IFN-1 応答に焦点を当て、その分子機構の全貌を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では JAK-STAT 経路、アポトーシス・ネクロプトーシス経路の遺伝子変異・欠損マウスから作成した腸上皮オルガノイドを用いて IFN-1 下流のメカニズム解析、IFN-1 誘導性腸上皮細胞死を制御するキー分子群の同定を試みる。IFN-1 投与下でのアポトーシス・ネクロプトーシス応答の定量的・網羅的評価には FACS を用いた Cell death assay、Western Blot 解析、RNA-Seq などを用いた。

4. 研究成果

(1) 腸上皮において IFN1 は細胞死を誘導しオートファジー欠損によりその作用は増幅される。

研究代表者は炎症性腸疾患における腸上皮細胞における IFN-1 応答と「腸上皮オートファジー」に着目し、野生型(WT)、Atg16L1 欠損マウスからそれぞれオルガノイドを樹立し、同腸上皮オルガノイドを用いた機能解析等を行なった。その結果、1) IFN-1 は細胞死(アポトーシス及びネクロプトーシス)を誘導すること、2)同細胞死応答は Atg16L1 の機能を欠失した腸上皮では著しく増幅されることを明らかとした。(図 1)

これらの結果は、腸上皮細胞に IFN-1 シグナルを介して細胞死を誘導する機構が備えられており、これによりウイルス感染細胞等の生体維持に不都合な細胞の排除を行う一方、細胞死異存的に免疫誘導物質を誘導・放出し炎症遷延の要因となる可能性を示す重要な知見と考えられた。また、ATG16L1 等のキー分子の機能欠損により細胞内オートファジーが障害された環境では IFN-1 応答が増強・促進されることから、腸上皮における IFN-1-オートファジー相互作用が、炎症性腸疾患の病態において重要な役割を担っている可能性も併せて考えられた。

(2)RIP1 キナーゼ活性は IFN-1 誘導性細胞死を制御する

そこで研究代表者らはオートファジー機能により制御を受け、IFN-1 誘導性細胞死に介在する分子群の探索・同定を更に試みた。この結果細胞死(アポトーシス、ネクロプトーシス)制御におけるキー分子の一つである RIP1 について注目すべき知見を得た。RIP1D138N マウス(RIP1 蛋白 138 番アミノ酸の変異により同分子キナーゼ活性を不活化したマウス)と Atg16L1 欠損マウスを

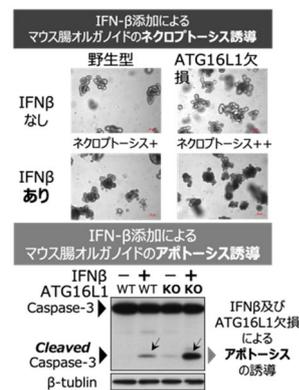


図1. 腸上皮においてIFN-1は細胞死を誘導しオートファジー欠損により同作用は増幅される。

交配し作成した RIP1 キナーゼ不活化・オートファジー欠損マウスを用い、同マウスより腸上皮オルガノイドを樹立し解析を行ったところ、1)RIP1 キナーゼ不活化腸上皮オルガノイドは IFN-1 誘導性細胞死に抵抗性を示し、2) オートファジー欠損条件下においても RIP1 キナーゼ不活化により IFN-1 誘導細胞死が抑制される、という新たな知見を得た。(図 2)

また細胞死と細胞増殖の制御は一般に背反の関係にあり、相互に制御を受けることが示されている。研究代表者らは腸上皮オルガノイドを用いた「オルガノイド再構成試験」により幹細胞増殖機能を検討した結果、

Atg16L1 欠損オルガノイドでは同機能の著しい抑制を認めた一方、RIP1 キナーゼ不活化オルガノイドでは同機能の著しい促進を認めている。さらに Atg16L1 欠損オルガノイドの RIP1 キナーゼ活性を不活化することにより、幹細胞増殖機能が回復することも確認した。(図 2)

(3)RIP1 キナーゼは細胞周期関連遺伝子発現に關与する

これら表現型を分子レベルで統合的に理解するため、Atg16L1 欠損及び RIP1 キナーゼ不活化について異なる 4 条件の腸上皮オルガノイドを対象に RNA-seq 解析を行ったところ Atg16L1 欠損により細胞周期に關わる遺伝子の発現は低下するが、RIP1 キナーゼ不活性化により改善を認めることを明らかとし、オルガノイド再構成試験の結果と矛盾しない結果を得ており、RIP1 キナーゼ活性は細胞増殖制御においても中心的な役割を果たす可能性が示された。(図 3)

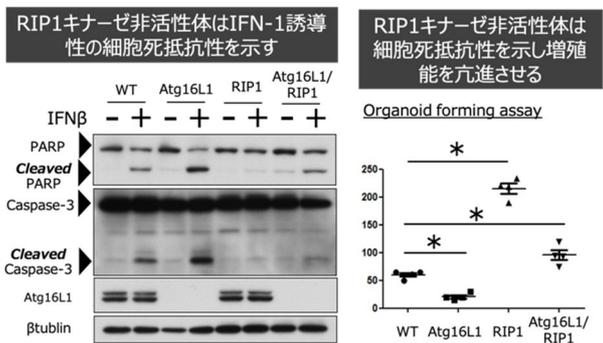


図2. RIP1キナーゼ活性はIFN1誘導性細胞死のmaster regulator

Atg16L1 = Atg16L1 KO
RIP1 = RIP1D138N

RIP1キナーゼ非活性体は細胞周期関連遺伝子発現を回復させる

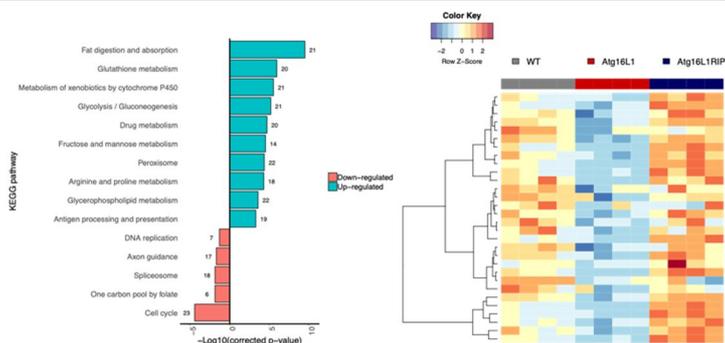


図3. RIP1キナーゼ活性は細胞周期関連遺伝子発現に關与する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuchiya Mao, Ito Go, Hama Minami, Nagata Sayaka, Kawamoto Ami, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Anzai Sho, Takahashi Junichi, Kuno Reiko, Takeoka Sayaka, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Mizutani Tomohiro, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 542
2. 論文標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.021	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 該当する

1. 著者名 Kuno Reiko, Ito Go, Kawamoto Ami, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Takeoka Sayaka, Nagata Sayaka, Takahashi Junichi, Tsuchiya Mao, Anzai Sho, Mizutani Tomohiro, Shimizu Hiromichi, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Notch and TNF- signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100906 ~ 100906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito Go, Yui Shiro, Okamoto Ryuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 A Cellular "Hub" Function to Resolve Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 789 ~ 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.04.008	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Welz Lina, Kakavand Nassim, Hang Xiang, Laue Georg, Ito Go, Mishra Neha, Tengen Felicitas, Wottawa Felix, Arnold Philipp, Kaikkonen Leena, Stengel Stefanie, Tran Florian, Das Saumya, Kaser Arthur, Trajanoski Zlatko, Blumberg Richard, Schreiber Stefan, Rosenstiel Philip, Aden Konrad	4. 巻 162
2. 論文標題 Epithelial X-Box Binding Protein 1 Coordinates Tumor Protein p53-Driven DNA Damage Responses and Suppression of Intestinal Carcinogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 223 ~ 237.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.09.057	査読の有無 無
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
---------	---------