

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07917

研究課題名(和文)発光レポーター遺伝子導入マウスによる潰瘍性大腸炎の発症部位と病態進展過程の解析

研究課題名(英文) Analysis of the onset site and pathological progression process of ulcerative colitis in model mice with luminescence reporter gene

研究代表者

入江 厚 (Irie, Atsushi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：30250343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが樹立したHLA-DR4tgmホモ接合体は、矮小、下痢、脱肛を呈し、その多くが生後半年以内に死亡する。病理組織解析から大腸に多数の単核球細胞の浸潤が認められ、正常なヘテロ接合体の大腸には見られない上皮細胞の形状崩壊、粘液産生の著減など、潰瘍性大腸炎様の所見を呈する。この大腸炎発症にはHLA-DR4の高発現による小胞体ストレス、およびHelicobacter japonicusの存在が必須である。小胞体ストレスを検出する発光レポーター遺伝子(ERAI-Akaluc)を用いて、大腸炎患部を同一個体で経時的に観察した。患部は直腸肛門付近から始まり、上行性に移行することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis、以下 UC)は原因不明の難病であり、その根本治療法の確立が切望されている。UCの発症に関わる因子として、腸内細菌叢と免疫系の異常が疑われているが、起因菌や免疫系の異常を誘導する機構は未だよくわかっていない。申請者らが樹立したHLA-DR4tgmホモ接合体は、起因菌の経口投与により人為的にUCを発症させることができ、従来のUCモデルマウスよりもより自然なUCの病態が得られる。このマウスを用いることにより、大腸炎病態の進展過程を明らかにし、UC発症メカニズムの理解とその予防法・治療法開発の端緒を得ることを目指す。

研究成果の概要(英文)：The HLA-DR4tgm homozygotes established by the applicants presented with dwarfism, diarrhea, and rectal prolapse, and most of them die within six months of birth. Histopathological analysis revealed numerous mononuclear cell infiltrates in the colon and ulcerative colitis-like findings, including disruption of epithelial cell shape and markedly reduced mucus production, which were not seen in the colons of normal heterozygotes. The presence of endoplasmic reticulum stress due to high expression of HLA-DR4 and Helicobacter japonicus are essential for the development of this colitis. Using a luminescent reporter gene (ERAI-Akaluc) to detect endoplasmic reticulum stress, colitis-affected areas were observed over time in the same individual mice. The affected area was shown to begin near the rectal antrum and migrate ascending.

研究分野：免疫学

キーワード：潰瘍性大腸炎 炎症性腸疾患 小胞体ストレス HLA-DR トランスジェニックマウス 動物モデル

### 1. 研究開始当初の背景

申請者が樹立した HLA-DR4tgm ホモ接合体は、正常同腹仔と比較して矮小、下痢、脱肛を呈し、その多くが生後半年以内に死亡する。病理組織解析から大腸に多数の単核球細胞の浸潤が認められ、正常なヘテロ接合体の大腸には見られない上皮細胞の HLA-DR4 分子の高発現と形状の崩壊、粘液産生の著減など、潰瘍性大腸炎様の所見が認められる。小胞体ストレスを緩和するタウロウルソデオキシコール酸の経口投与を続けることにより、ホモ接合体の体重減少、腸管からの蛍光粒子の血流への漏れが減少し、粘液産生の著しい回復が見られ、また抗生物質を飲水投与することにより大腸炎の発症を抑制した。したがって本マウスは何らかの腸内細菌と大腸上皮細胞の小胞体ストレスが関与する、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis、以下 UC) モデルマウスであると考え、その病因病態の解析を開始した。

*Helicobacter japonicus* はマウスの大腸・盲腸に常在するヘリコバクター種の細菌で、応募者らは *H. japonicus* が本マウスの大腸炎の起原菌であることを突き止めた。抗生剤投与により HLA-DR4tgm ホモ接合体から同菌を駆除すると、当該マウスは有意に大腸炎を発症しない。また同菌を駆除したマウスに培養した *H. japonicus* を投与すると、自然発症大腸炎と同様の過程を経て大腸炎を呈した。そこで小胞体ストレスをルシフェリンの発光により検出するレポーター遺伝子 (ERAI-Luc) を用いて、本マウス的小胞体ストレス部位、すなわち大腸炎患部を同一の個体で生体のまま観察し、大腸炎の病態の発生部位ならびに患部の進展過程を解析することを考えた。交配により ERAI-Luc およびアルビノ形質を導入した HLA-DR4tgm を抗生剤処理し、培養した *H. japonicus* を投与して経時的に同一個体のルシフェリンの発光をモニターした。HLA-DR4tgm ホモ接合体では、起原菌投与後およそ 5 日めから直腸の発光が認められたが、大腸以外の組織にも強い発光が認められた。起原菌投与後 18 日めには、上行性に腸管の発光部位が進展したが、他臓器の発光により大腸での発光が不明瞭になった。大腸炎を発症しない HLA-DR4tgm ヘテロ接合体 / ERAI-Luc マウスには、ルシフェリンの発光は認められなかった。

ERAI-Luc 遺伝子は コピキタスプロモーターが使用されており、HLA-DR4 を高発現する B 細胞も同分子の過剰発現による小胞体ストレスを呈する可能性があり、特にリンパ節発光の原因となりうる。またルシフェリンは組織透過性に劣るためムラができやすく、またその黄緑色の発光は水やヘモグロビンに吸収されやすいため、深部組織の発光の検出には不利である。これらの問題を解決するため、ERAI-Luc のコピキタスプロモーターを、大腸特異的に発現する炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) 1 のプロモーターに、組織透過性に優れ強く赤色発光する akalumine を基質とする Akaluc 遺伝子を導入した改良 ERAI レポーター遺伝子 (ERAI-Akaluc) の構築を考えた。そのトランスジェニックマウスを作成したら、交配によりこの遺伝子を持つ HLA-DR4tgm を樹立する。得られるマウスを用いて、ERAI-Luc を使用するよりも、より詳細に UC の病態を同一個体において経時的に解析することを試みることを計画した。

### 2. 研究の目的

UC は原因不明の難病であり、その根本治療法の確立が切望されている。UC の発症に関わる因子として、腸内細菌叢と免疫系の異常が疑われているが、起原菌や免疫系の異常を誘導する機構は未だ明らかでない。本研究課題ではこの問題に答えるため、起原菌と大腸炎病態との時空間的な関係を明らかにすることを目的とする。これまでに申請者が樹立した、ERAI-Luc 遺伝子を持つ HLA-DR4tgm ホモ接合体の解析では、ERAI-Luc 遺伝子がコピキタスプロモーターを使用するため、大腸以外の臓器のルシフェリンの発光が強く、大腸での詳細な発光の観察が妨げられた。そこで発光レポーターのプロモーターを大腸特異的なものに変更し、その下流に小胞体ストレス依存的に完全長 mRNA が形成される Akaluc 遺伝子を組み込んだ、新規小胞体ストレスレポーター遺伝子を構築した (ERAI-Akaluc)。Akaluc は組織透過性に優れた赤色光を強く発行する。ERAI-Akaluc 遺伝子を導入した UC 自然発症マウスを用いて、大腸炎がいつどこから発症しどのように進展するのかを、同一個体を用いて経時的に観察し、大腸炎病態進展過程の詳細を明らかにし、UC の予防法・治療法開発の端緒を得ることを目指す。

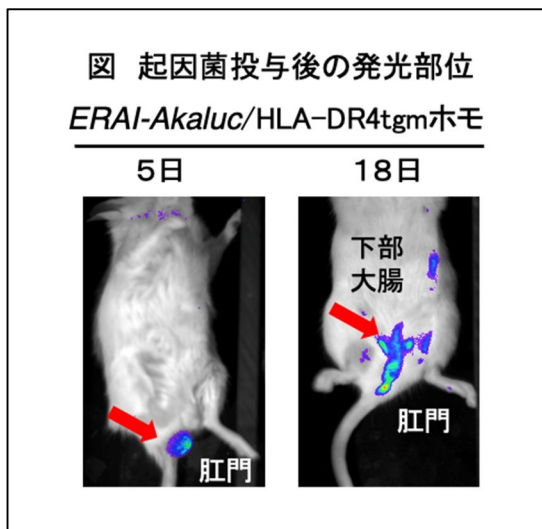
### 3. 研究の方法

ERAI-Luc 遺伝子には コピキタスプロモーターが使用されており、HLA-DR4 を高発現する B 細胞も同分子の過剰発現による小胞体ストレスを呈する可能性があり、リンパ節発光の原因となりうる。またルシフェリンは組織透過性に劣るためムラができやすく、またその黄緑色の発光は水やヘモグロビンに吸収されやすいため、深部組織の発光の検出には不利である。これらの問題を解決するため、(1) ERAI-Luc のコピキタスプロモーターを、大腸特異的に発現する炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) 1 のプロモーターに、また(2)ルシフェラーゼ遺伝子を、組織透過性に優れ強く赤色発光する akalumine を基質とする Akaluc の遺伝子にそれぞれ置換した、改良 ERAI レポーター遺伝子 (ERAI-Akaluc) を構築する。次いでそのトランスジェニック

クマウスを作成し、交配によりこの遺伝子を持つ HLA-DR4tgm を樹立する。このマウスを用いて、UC の病態を同一個体において経時的に解析する。

#### 4. 研究成果

ERAI-Akaluc 遺伝子を持つ HLA-DR4tgm ホモ接合体マウスを樹立した。このマウスに抗生剤を飲水投与して内在性の起因菌 *H. japonicus* を駆除し、その後培養した *H. japonicus* を経口投与し、Akaluc による発光を観察した。その結果、起因菌投与後 5 日めに肛門付近の発光が認められ、18 日めには発光部位が上行性に移行することがわかった(図)。これによりこの大腸炎モデルシステムマウスの系では、大腸炎は肛門から発症すること、患部は肛門から上行性に拡大することが示された。これより、発症初期に肛門付近に抗生剤等を塗布することにより、UC 発症を予防する、などの可能性が考えられる。今後詳細な患部の進展過程と起因菌分布との関係などを詳細に観察し、本大腸炎の発症メカニズムを解析するとともに、UC の予防法・治療法開発の端緒を得ることを目指す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryo Ikeda, Atsushi Irie, Yoshihiro Komohara, Hiroyuki Oshiumi
2. 発表標題 Visible pathogenetic analysis of ulcerative colitis-like inflammatory bowel disease using ER-stress reporter gene and HLA-DR4 transgenic mice.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022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	竹田 直樹 (Takeda Naoki) (90304998)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教  (17401)	

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