

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590693

研究課題名（和文） TNF-SF15 は腸管上皮細胞にオートファジーを誘導する

研究課題名（英文） Tumor necrosis factor ligand superfamily member 15 induces Autophagy in colonic epithelial cells

研究代表者

高橋 成一（TAKAHASHI SEIICHI）

東北大学・病院・助教

研究者番号：40312574

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレス応答やオートファジーは、多くの細胞の生存に不可欠の機構であり、生体の恒常性維持に寄与していると考えられている。しかしながら、腸管上皮細胞におけるこの2つの機構のクロストークは、良く分かっていない。本研究者は、小胞体ストレス応答が、主に IRE1 α を介し2種類の腸管上皮培養細胞においてオートファジーを誘導し、アポトーシス抵抗性、細胞の生存率に関わっていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Unfolded protein response and autophagy are important mechanisms for the proliferation and differentiation of many types of cells, and contribute to the maintenance of homeostasis. However, the crosstalk of these mechanisms in intestinal epithelial cells are yet unknown. Here, we present that autophagy in two cultured colonic cells is induced in response to unfolded protein response mainly by the signal of IRE1 α , develops to resistance to apoptosis, and contributes to the viability of cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

クローン病は、消化管に潰瘍を形成する原因不明の慢性特発性炎症性腸疾患である。民族により発病率が異なること、高家族内集積性が認められること、二卵性双生児よりも一卵性双生児において疾患の一致率が高いことなどから、遺伝的素因が関与する多因子疾患と考えられている。クローン病の疾患感受性遺伝子として、2007年には ATG16L1 遺伝子、IRGM 遺伝子が同定された。この2つの遺伝子

は、オートファジー機構に関わる遺伝子であるが、この解析結果が判明するまでは、クローン病の発症にオートファジーが関与することは全く予想されていなかった。ところで本研究者は、TNF-SF15 が日本人クローン病の疾患感受性遺伝子であることを報告し（Gut. 2006 Oct;55）、引き続き機能解析を継続してきたが、その研究途上で偶然にも TNF-SF15 がオートファジーに関わることを見出した。すなわち、腸管上皮由来培養

細胞株で TNF-SF15 刺激を加えると、オートファゴソームが形成されることを確認したのである。

オートファジーは、一般的に細胞内構成物の代謝回転や飢餓、細胞内小器官の損傷、感染時に誘導される自己分解機構である。この機構は酵母から哺乳類まで広く備わっており、生体維持に不可欠の適応機能と考えられている。また TNF-SF15 は、血管内皮細胞、マクロファージ、リンパ球で発現し、T 細胞からのインターフェロンの産生亢進を介し、慢性炎症に寄与すると考えられている。以上の知見を超えて、TNF-SF15 とオートファジーを結びつける仮説は未だ報告が無く、本研究を推進し成果が得られれば、日本人クローン病の病態形成にも欧米人で相関が確認されたオートファジー機構が関与することを証明できるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、TNF-SF15 がオートファジーを誘導するメカニズムを解明することと、その経路に障害があった場合なぜクローン病に至るのか、その理論を構築することである。さらに研究課程で、消化管粘膜上皮におけるオートファジーの役割を明らかにし、将来臨床応用に結びつくよう新たに着想したテーマも適宜進行させることであった。

3. 研究の方法

(1) ヒト LC3B 遺伝子 cDNA の単離

ヒトオートファゴソームの LC3B 遺伝子 cDNA を、消化管より抽出した mRNA を鋳型として RT-PCR により単離する。リンカープライマーは、各々 EcoRI 制限酵素部位を有するよう設計する。

(2) 発現ベクターの作成

clontech 社の緑色蛍光蛋白 EGFP 発現プラスミド EcoRI 部位に、ヒト LC3B 遺伝子 cDNA を in-frame となるよう組み込み、GFP-LC3 発現ベクターを作成する。このベクターをコンピュータセルに transfection し、対数増殖期の大腸菌から QIAGEN Plasmid Kit を用いてプラスミド DNA を抽出する。最終濃度は、2~4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるよう調整する。

(3) SW480 細胞、Caco-2 細胞、HT-29 細胞への transfection

HVJ Envelop VECTOR KIT を用いて、ヒト大腸上皮細胞株に、上記 GFP-LC3 発現ベクターを transfection する。neomycin を 500ng/ μl となるよう培地に添加し、セレクションをかける。

(4) stable transformant の樹立

transfection 後に 96 well plate を用いて、

限界希釈法により単一クローンを単離する。neomycin を恒常的に添加し、得られたクローンが目的の stable transformant か、PCR 法、LC3 ウェスタンブロットティング、蛍光顕微鏡観察により確認する。

(5) SW480 細胞、Caco-2 細胞、HT-29 細胞に TNF-SF15 刺激を加える

樹立した SW480 細胞、Caco-2 細胞、HT-29 細胞に TNF-SF15 刺激を加え、誘導されるオートファジーを、蛍光顕微鏡、LC3 ウェスタンブロットティング、透過型電子顕微鏡で確認する。

(6) siRNA による受容体ノックダウンと 3-methyladenine によるオートファジー抑制実験

TNF-SF15 刺激が、TNFR-SF25 を介し伝達されることを確認するため、siRNA でノックダウン後、オートファジー現象を観察する。3-methyladenine でオートファジーを抑制すると、TNF-SF15 刺激によりアポトーシスが誘導されることをアネキシン V と TUNEL 法で検出する。

(7) シグナル伝達系で、mTOR が中心的役割を担うことを明らかにする TNF-SF15 刺激により mTOR 活性が低下しオートファジーに至ることを、K-LISA mTOR Activity kit とリン酸化 mTOR のウェスタンブロットティングと免疫組織化学法で解析する。さらに mTOR は、HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) を介し VEGF/angiogenesis に働くが、mTOR が抑制されると、Akt を経て抑制性のフィードバック機構が働くことを解析する。

研究の目的の項で記載した新知見に基づく新たな研究として、炎症性腸疾患の感受性遺伝子解析を基に、小胞体ストレス応答とオートファジー機構のクロストーク研究を新たに追加した。

(8) 樹立細胞に対する小胞体ストレス負荷とオートファジーの検出

GFP-LC3 発現ベクターをトランスフェクションした SW480 細胞、Caco-2 細胞、HT-29 細胞に、tunicamycin、thapsigargin を負荷し、誘導されるオートファジーを、蛍光顕微鏡、LC3 ウェスタンブロットティング、透過型電子顕微鏡で確認する。

(9) 小胞体ストレス応答分子のノックダウンとオートファジーへの影響

PERK、IRE1 α 、ATF6 をそれぞれ siRNA でノックダウンし、誘導されるオートファジー現象の変化を解析する。

(10) 小胞体ストレス応答誘導のオートファジーを阻害し細胞動態を検討する
tunicamycin, thapsigargin で誘導されたオートファジーを 3-methyladenine で抑制し、細胞の viability を MTT アッセイで、アポトーシスをアネキシン V で検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト LC3B 遺伝子 cDNA の単離

ヒト消化管より抽出した mRNA を鋳型として RT-PCR 法を施行した。量及び質ともに十分なヒト LC3B 遺伝子 cDNA を得ることができた。なお、リンカープライマーは計画通り、各々 EcoRI 制限酵素部位を有するよう設計した。

(2) 発現ベクターの作成

ヒト LC3B 遺伝子 cDNA を clonetech 社の緑色蛍光蛋白 EGFP 発現ベクターに、in-frame となるよう組み込んだ。この発現ベクターの塩基配列は、シークエンシングで計画通りに作成できたことを確認した。

(3) SW480 細胞、Caco-2 細胞、HT-29 細胞への transfection と stable transformant の単離

上記 GFP-LC3 発現ベクターを SW480 細胞、Caco-2 細胞、HT-29 細胞に lipofection 法にて導入し、限界希釈法とシリンドラクロニングにより stable transformant を単離した。

(4) 樹立細胞に対するオートファジー誘導とその検出

東日本大震災により培養環境が損なわれ、電源喪失により細胞株も失った。そのため再度培養株の樹立から再開する必要が生じたが、幸いにも安定発現株を得ることができた。オートファジー刺激である飢餓負荷と mTOR 阻害剤のラパマイシン負荷実験を施行し、ウェスタンブロッティングで GFP-LC3 の発現が亢進し、蛍光顕微鏡観察にて GFP-LC3 のドット数の増加が観察された。さらに電子顕微鏡によりオートファゴソーム二重膜構造が確認された。

(5) 樹立細胞に対する小胞体ストレス負荷とオートファジーの検出

東日本大震災により研究が大幅に遅れている間、炎症性腸疾患と小胞体ストレス応答が大きく脚光を浴びてきたため、樹立した細胞に、小胞体ストレス負荷である tunicamycin, thapsigargin を添加し、誘導されるオートファジーを、蛍光顕微鏡、LC3 ウェスタンブロッティング、透過型電子顕微鏡で確認した。小胞体ストレスによるオートファジーの誘導は、薬剤の添加時間、負荷濃度依存性を示した。

(6) 小胞体ストレス応答分子のノックダウンとオートファジーへの影響

PERK, IRE1 α , ATF6 をそれぞれ siRNA でノックダウンし、オートファジーに与える影響を検討した。IRE1 α のノックダウンではオートファジーの亢進が抑制され、PERK, ATF6 とは異なる挙動を示し、小胞体ストレス応答とオートファジーのクロストークに大きな役割を持っていることが示された。

(7) 小胞体ストレス応答誘導のオートファジーを阻害し細胞動態を検討する

小胞体ストレス応答誘導のオートファジーを 3-methyladenine で抑制したところ、細胞の viability が低下し、アポトーシス細胞が増加した。そのため、小胞体ストレス応答誘導のオートファジーは、ストレス下の細胞保護に働いている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

本研究課題と直接ならびに間接的に関わる研究成果を以下に示す。

[雑誌論文] (計 21 件)

(1) Shiga H, Kajiura T, Shinozaki J, Takagi S, Kinouchi Y, Takahashi S, Negoro K, Endo K, Kakuta Y, Suzuki M, Shimosegawa T. Changes of faecal microbiota in patients with Crohn's disease treated with an elemental diet and total parenteral nutrition. *Dig Liver Dis.* 2012, 44(99): 736-742. 査読有

(2) Arai T, Kakuta Y, Kinouchi Y, Kimura T, Negoro K, Aihara H, Endo K, Shiga H, Kanazawa Y, Kuroha M, Moroi R, Nagasawa H, Shimodaira Y, Takahashi S, Shimosegawa T. Increased expression of NKX2.3 mRNA transcribed from the risk haplotype for ulcerative colitis in the involved colonic mucosa. *Hum Immunol.* 2011, 2(7): 587-591. 査読有

(3) Takahashi S, Takagi S, Shiga H, Umemura K, Endo K, Kakuta Y, Takahashi S, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Scheduled maintenance therapy with infliximab improves the prognosis of Crohn's disease: A single center prospective cohort study in Japan. *Tohoku J Exp Med* 2010; 220(3):207-15. 査読有

(4) Shiga H, Takagi S, Inoue S, Kinouchi Y, Ohkubo T, Takahashi S, Negoro K, Yokoyama H, Kato S, Fukushima K, Hiwatashi

N, Tooru Shimosegawa. What Determines the Later Clinical Course of Patients Who Do Not Undergo Colectomy at the First Attack? A Japanese Cohort Study on Ulcerative Colitis. Digestion 2010, 81(2): 104-112. 査読有

(5) Endo K, Kinouchi Y, Kakuta Y, Ueki N, Takahashi S, Shimosegawa T. Involvement of NF-kappa B pathway in TLI1A gene expression induced by lipopolysaccharide. Cytokine. 2010, 49: 215-220. 査読有

(6) 遠藤 克哉, 高橋 成一, 志賀 永嗣, 木内 喜孝, 下瀬川 徹 IBD 診療の現在 腸管外病変の診断と治療 Pharma Medica 30 巻 9 号 Page35-39(2012. 09) 査読無

(7) 志賀 永嗣, 遠藤 克哉, 高橋 成一, 木内 喜孝, 下瀬川 徹 潰瘍性大腸炎の寛解導入におけるアサコール錠の有用性の検討 消化器内科 55 巻 2 号 Page278-286(2012. 08) 査読無

(8) 角田 洋一, 木内 喜孝, 高橋 成一, 下瀬川 徹 ゲノムワイド関連解析からみえてきた消化器疾患 わが国のクローン病の発症要因と治療抵抗性 G. I. Research 20 巻 3 号 Page196-202(2012. 06) 査読無

(9) 木内 喜孝, 高橋 成一, 遠藤 克哉, 志賀 永嗣, 下瀬川 徹 炎症性腸疾患-病因解明と診断・治療の最新知見- 炎症性腸疾患の病因と病態 炎症性腸疾患の遺伝要因・疾患感受性遺伝子 日本臨床 70 巻増刊 1 炎症性腸疾患 Page66-72(2012. 02) 査読無

(10) 遠藤 克哉, 諸井 林太郎, 高橋 成一, 木内 喜孝, 下瀬川 徹 炎症性腸疾患の薬物療法の極意 クローン病に対するインフリキシマブの治療成績と遺伝子多型との関連 消化器内科 54 巻 1 号 Page77-82(2012. 01) 査読無

(11) 志賀 永嗣, 高木 承, 遠藤 克哉, 高橋 成一, 木内 喜孝, 下瀬川 徹 IBD の最近の治療 その他の治療法 クローン病の栄養療法 臨床消化器内科 27 巻 1 号 Page79-84(2011. 12) 査読無

(12) 高橋 成一, 木内 喜孝, 下瀬川 徹 潰瘍性大腸炎の寛解維持療法とサーベイランス 日本消化器病学会雑誌 108 巻 12 号 Page1983-1995(2011. 12) 査読有

(13) 木内 喜孝, 角田 洋一, 遠藤 克哉, 志賀 永嗣, 高橋 成一, 下瀬川 徹 潰瘍性大腸炎診

療の現状と今後の展望 潰瘍性大腸炎の病態はどこまで解明されたか? 潰瘍性大腸炎の遺伝子異常 Progress in Medicine 31 巻 10 号 Page2327-2331(2011. 10) 査読無

(14) 木内 喜孝, 角田 洋一, 高橋 成一, 下瀬川 徹 遺伝子多型による消化器疾患の理解 遺伝子多型解析から炎症性腸疾患の病因解明は可能か 分子消化器病 8 巻 3 号 Page212-219(2011. 09) 査読無

(15) 木内 喜孝, 荒井 壮, 金澤 義丈, 角田 洋一, 遠藤 克哉, 志賀 永嗣, 高橋 成一, 下瀬川 徹 臨床に役立つ腸管免疫学の最新のトピックス IBD の遺伝子異常 GWAS がもたらした病態研究の糸口 Intestine 15 巻 5 号 Page415-421(2011. 09) 査読無

(16) 高橋 成一 オートファジーとクローン病 IBD Research 5 巻 2 号 Page24-31(2011. 08) 査読無

(17) 角田 洋一, 木内 喜孝, 高橋 成一, 下瀬川 徹 IBD の疾患感受性遺伝子を知り、治療につなげるここまで明らかになったクローン病の感受性遺伝子 IBD Research 5 巻 2 号 Page82-88(2011. 06) 査読無

(18) 遠藤 克哉, 志賀 永嗣, 角田 洋一, 高橋 成一, 木内 喜孝, 下瀬川 徹 クローン病の長期予後改善をめざして 生物学的製剤によるクローン病の寛解維持療法 infliximab 計画的維持投与の治療効果を中心に 日本消化器病学会雑誌 108 巻 3 号 Page401-409(2011. 3) 査読有

(19) 木内 喜孝, 角田 洋一, 高橋 成一, 下瀬川 徹 クローン病の長期予後改善をめざして クローン病の長期予後 日本消化器病学会雑誌 108 巻 3 号 Page381-387(2011. 3) 査読有

(20) 角田 洋一, 木内 喜孝, 高橋 成一, 下瀬川 徹 炎症性腸疾患の今日的アプローチ 遺伝子異常面からみた炎症性腸疾患 成人病と生活習慣病 40 巻 12 号 Page1351-1356(2010. 12) 査読無

(21) 木内 喜孝, 高橋 成一, 下瀬川 徹 クローン病の診断・治療の最前線 疾患感受性遺伝子からみたクローン病 日本消化器病学会雑誌 107 巻 6 号 Page855-862(2010. 06) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 諸井 林太郎, 遠藤 克哉, 木内 喜孝, 只野 敏浩, 川上 瑤子, 奈良 志博, 松下 勝則, 宮澤 輝子, 下平 陽介, 長澤 仁嗣, 志賀 永嗣,

根来健一，相原裕之，高橋成一，下瀬川徹
FCGR3A 遺伝子多型と Infliximab の治療効果
の相関から考えるクローン病の基本病態
日本消化器病学会総会 平成 24 年 3 月 23 日
鹿児島

(2) 長澤仁嗣，角田洋一，奈良志博，平本
圭一郎，松下勝則，宮澤輝子，下平陽介，
諸井林太郎，黒羽正剛，志賀永嗣，遠藤克
哉，高橋成一，木内喜孝，下瀬川徹 日本
人炎症性腸疾患患者における XBP1 遺伝子の
解析 日本消化器関連学会週間 平成 23 年
10 月 20 日 福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.gastroente.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 成一 (TAKAHASHI SEIICHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40312574

(2) 研究分担者

木内 喜孝 (KINOUCHI YOSHITAKA)

東北大学・高等教育開発推進センター・

教授

研究者番号：20250780

遠藤 克哉 (ENDO KATSUYA)

東北大学・高等教育開発推進センター・

助教

研究者番号：40509097