

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 24日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790527

研究課題名（和文）腸管恒常性維持におけるオートファジー誘導センサーとしてのNod様受容体の役割

研究課題名（英文）The role of Nod-like receptor as an autophagy induction sensor for the maintenance intestinal homeostasis

研究代表者

浅野 純平 (ASANO JYUNPEI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：70463809

研究成果の概要（和文）：細胞質に発現する Nod 様受容体は、細菌細胞壁の構成成分を認識する病原体センサーとして注目されている。本研究課題では、腸管恒常性維持におけるオートファジー誘導センサーとしての Nod 様受容体の役割を追求した。その結果、Nod リガンドの刺激により、腸管リンパ組織（GALT）の樹状細胞（DC）におけるオートファゴソーム形成、ならびに小腸粘膜固有層における Treg の誘導が促進されることが明らかになった。また、腸管上皮組織の恒常性維持にオートファジーが重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nod-like receptors are known as cytosolic sensors for recognition of bacterial cell wall components. In this study, we examined the role of Nod-like receptor as an autophagy induction sensor in the maintenance of intestinal homeostasis. We revealed that Nod ligands enhanced the formation of autophagosome in dendritic cells, and promoted Treg induction in the gut-associated lymphoid tissue (GALT). Furthermore, we also noted that autophagy played an important role in the maintenance of intestinal epithelial cell homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) Nod 分子は細菌細胞壁ペプチドグリカン (PGN) の構成成分を認識する病原体センサーとして注目されている。細胞質に発現する Nod1、Nod2 は Toll-like receptor (TLR) と同様に自然免疫、獲得免疫の誘導に重要な役割を担うことが知られている。Nod1 は PGN の一部である γ -D-glutamyl-*meso*-diaminipimelic acid (iE-DAP) と呼ばれる構造を、Nod2 は muramyl dipeptide (MDP) と呼ばれる構造をそれぞれ認識し、下流のアダ

プタータンパク RICK を介して MAPK や NF- κ B を活性化し、ケモカインやサイトカインの生産を誘導することが明らかにされている。

(2) Nod1、Nod2 は DC やマクロファージなどの抗原提示細胞以外に非造血系細胞での発現が認められている。骨髄キメラマウスの解析から非造血系細胞における Nod シグナルが Th2 細胞の誘導に関わることが明らかにされている。Nod2 は小腸上皮細胞のパネ

ート細胞からの抗菌物質生産に深く関わることが明らかにされている。しかしながら、腸管上皮細胞における Nod 分子の他の役割は不明である。

(3) DC の Nod1 シグナルは TLR シグナルに相乗的に働き Th1 分化を促すことが報告されている。申請者は平成 19 年、20 年度基盤研究(C)の「NOD1 を介した免疫ホメオスターシスの調節」において Nod1、Nod2 シグナルが CD8 α +DC の MHC クラス I への抗原提示 (クロスプレゼンテーション)を増強し、効率的に抗原特異的 CTL を活性化させ、腫瘍免疫を亢進することを明らかにしている。

(4) オートファジー関連遺伝子の一つである ATG16L1 は炎症性腸疾患 (IBD) のリスクファクターであること、ヒトの NOD2 の機能欠損変異が IBD の罹患性に関わることが報告されている。しかしながら、Nod 分子がオートファジー誘導センサーとして機能するかについては不明である。

2. 研究の目的

本研究は、常在菌を含む細菌との関わりが深い腸管に着目し、定常状態ならびに IBD における Nod シグナルの役割について、オートファジー誘導センサーとしての観点から解明することを目的とした。特に、腸管組織の DC と上皮細胞に焦点をあて、定常状態ならびに炎症時における Nod シグナルの役割を解析した。

-平成 23 年度-

(1) 腸管膜リンパ組織 (GALT) DC における Nod シグナルの役割の解明

① Nod シグナル誘導性オートファジー誘導と抗原提示について

申請者は前出の研究課題において、Nod シグナルが DC の MHC クラス I への抗原提示を増強させることを明らかにしている。一方、オートファジーによる MHC クラス II への抗原提示の促進が報告されている。こうした背景から iE-DAP、MDP 刺激によりオートファジーの指標となるオートファゴソーム形成と MHC クラス II への抗原提示が増強するか検証した。

② Nod シグナル依存性オートファジーと獲得免疫の誘導について

GALT では腸内常在菌や食物抗原に対する免疫応答が惹起されないように寛容環境が構築されている。GALT DC の様々な機能分子やサイトカインの発現、さらには DC を介した Th1、Th17、Treg 細胞などの獲得免疫系の分化誘導、並びに免疫環境の構築に Nod シグナルがオートファジー誘導センサーと

して働くか検証した。

-平成 24 年度-

(1) IBD 誘導における Nod シグナルの役割の解明

定常状態の腸管恒常性維持のほか、IBD 誘導に Nod シグナルが関わるか明らかにすることは病態の解明だけではなく予防や治療法の開発に繋げるための基礎研究として重要である。本研究課題では Dextran sodium sulfate (DSS)誘導性モデルを取り入れ、IBD 誘導に Nod シグナルが関わるか検証した。

(2) 腸管上皮細胞におけるオートファジーと Nod シグナルの関連性の解明

腸管上皮細胞は細菌に対応する最前線であり、抗菌ペプチド生産により病原細菌の侵入を防ぐ働きのほか、免疫細胞とのクロストークで腸管の免疫寛容環境を構築している。初めに腸管上皮細胞特異的にオートファジー誘導遺伝子を欠損させたマウス (ATG5-flox/flox Villin-Cre) で定常状態ならびに炎症状態で形質に違いがあるか検証した。形質の違いが認められた場合、Nod シグナルに規定されるか検証することとした。

3. 研究の方法

-平成 23 年度-

(1) 腸管膜リンパ組織 (GALT) DC における Nod シグナルの役割の解明

① Nod シグナル誘導性オートファジー誘導と抗原提示について

Nod1 リガンドである iE-DAP、Nod2 リガンドである MDP をそれぞれ LC3-GFP、Nod1-/LC3-GFP、Nod2-/LC3-GFP、および Nod1-/Nod2-/LC3-GFP マウスに投与し、腸間膜リンパ節、パイエル板から DC を調製、蛍光顕微鏡で Nod シグナルの増強によりオートファゴソーム形成が促進するか解析した。さらに、iE-DAP、MDP 刺激による MHC クラス II への抗原提示能の増強について ^3H -thymidine の取り込みを指標とした Ovalbumin (OVA) 抗原特異的な T 細胞 (OT-II 細胞)の増殖で評価した。

② Nod シグナル依存性オートファジーと獲得免疫の誘導について

野生型マウスに iE-DAP、MDP をそれぞれ投与し、腸間膜リンパ節、パイエル板、腸管粘膜固有層における Th1、Th17、Treg などのリンパ球群の分化誘導が変化するかフローサイトメーターで解析した。さらに、腸組織培養法を行い、培養上清中に含まれるリンパ球群の分化誘導に重要な各種サイトカイン量を ELISA で測定し、iE-DAP、MDP の

刺激で変化するか検証した。

-平成 24 年度-

(1) IBD 誘導における Nod シグナルの役割

DSS を投与した野生型、*Nod1*^{-/-}、*Nod2*^{-/-}、*Nod1*^{-/-} *Nod2*^{-/-}マウスの腸管組織における炎症程度を HE 染色で比較したほか、生存、下血、腸の長さの比較を行い、IBD 誘導における Nod シグナルの関与を評価した。

(2) 腸管上皮細胞におけるオートファジーと Nod シグナルの関連性

野生型、*ATG5*^{-flox/flox} *Villin-Cre* マウス間で定常状態、ならびに放射線照射、抗がん剤の 5-fluorouracil (FU) 投与などのストレス付加後の腸管上皮組織像に違いが認められるか HE 染色で評価した。さらに、免疫組織化学法で TUNEL 陽性、Caspase3 陽性細胞を検出し、アポトーシスの誘導程度を比較した。

4. 研究成果

(1) GALT DC における Nod シグナルの役割について

① Nod シグナル誘導性オートファジー誘導と抗原提示について

野生型マウスの腸管膜リンパ節、パイエル板などの GALT に分布する DC では iE-DAP の刺激でオートファゴソーム形成が促進する結果を得た。

図 1: 細胞 1 個あたりのオートファゴソーム数

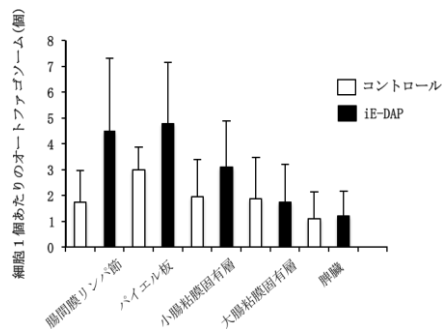
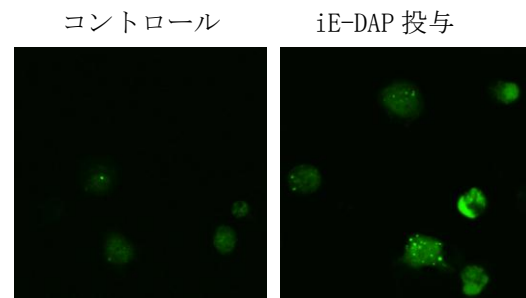


図 2: 腸間膜リンパ節 DC におけるオートファゴソーム

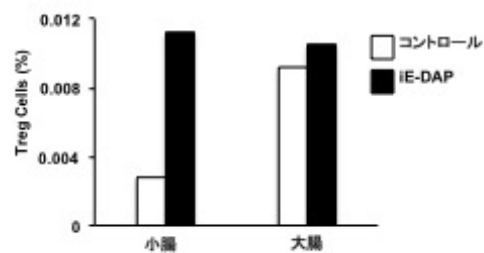


オートファゴソーム形成は MDP 刺激でも促進された。さらに、iE-DAP で刺激した DC は OT-II 細胞の増殖を促進させることが確認され、*Nod1* シグナルは DC における MHC クラス II への抗原提示能を増強することが明らかになった。

(2) Nod シグナル依存性オートファジーと獲得免疫の誘導について

iE-DAP を投与した野生型マウスの小腸粘膜固有層で Th1 の低下、Treg の増加が認められた (図 3)。しかしながら、定常状態の野生型、*Nod1*^{-/-}、*Nod2*^{-/-}、および *Nod1*^{-/-} *Nod2*^{-/-}マウスの間ではこのような差が認められなかった。以上より、定常状態における Th1、Treg の分化・維持に Nod シグナルは特に必要ないこと、積極的な Nod シグナルの増強により免疫寛容が誘導されることが示唆された。

図 3: 腸管粘膜固有層における Treg (%)



(3) IBD 誘導における Nod シグナルの関連性

DSS 投与後の大腸粘膜における腺の萎縮、杯細胞の減少、炎症性細胞浸潤の程度などの組織学的所見において野生型、*Nod1*^{-/-}、*Nod2*^{-/-}、*Nod1*^{-/-} *Nod2*^{-/-}マウス間で違いを

認めなかったことから、IBDの誘導程度とNodシグナルとの関連性はないと結論した。

(4) 腸管上皮細胞におけるオートファジーとNodシグナルの関連性について

ATG5-flox/flox Villin-Cre マウスでは放射線照射、5-FU投与による腸管上皮組織破壊後のbromodeoxyuridine陽性細胞が野生型マウスに比べて少ない結果であった。このことから腸管上皮細胞におけるオートファジーは再生過程に関わることが示唆された。しかしながら、再生過程におけるNodシグナルの関連性は認められなかった。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Yamada M, Tokumitsu N, Saikawa Y, Nakata M, Asano J, Miyairi K, Okuno T, Konno K, Hashimoto K: Molybdophyllysin, a toxic metalloendopeptidase from the tropical toadstool, *Chlorophyllum molybdites*. **Bioorg Med Chem.** 15; 20(22):6583-6588. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

1. 浅野純平、榑木俊聡、IL-1 桂義元、河本宏、小安重夫、山村一彦編 **免疫の事典** 朝倉書店, p49, 2011

[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

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 純平 (ASANO JYUNPEI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号 : 70463809