

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460946

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における自己抗体産生機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of autoantibody production in IBD

研究代表者

大島 茂(Oshima, Shigeru)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50376787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患における自己抗体産生機構を解析するため、クローン病感受性遺伝子A20の遺伝子操作マウスを用いて解析を行った。抗体産生には免疫細胞のオートファジー機構が重要である。A20によるオートファジー制御機構を検討したところ、A20がオートファジーをサポートしていることが明らかとなった。また、A20が細胞死に対して抑制的に作用していることも明らかとした。A20はその機構に重要なRIPK3のユビキチン化を制御することを明らかにした。これらの機構は自己抗体産生機構と関連している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Polymorphisms in the human TNFAIP3 gene (which encodes A20 protein) are associated with reduced function or expression of A20 that confers susceptibility to Crohn's disease. Autophagy plays important roles in autoantibody production. To determine whether A20 regulates autophagy in CD4 T cells, we analyzed A20 deficient CD4 T cells in vitro. We demonstrated that A20 deficient CD4 T cells exhibited reduced LC3 puncta formation, increased mitochondrial content, and exaggerated reactive oxygen species (ROS) production. These results indicate that A20 promotes autophagy after T cell receptor (TCR) stimulation in CD4 T cells. We found that A20-deficient T cells and fibroblasts were susceptible to caspase-independent and kinase RIPK3-dependent necroptosis. And also we demonstrated that RIPK3 interacts with p62 and regulates p62-LC3 complex formation.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患 オートファジー 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は、日本において加速度的に患者数が増加している原因不明の難病である。若年者の腸管に難治性の慢性炎症を発症し、再燃寛解を繰り返す。近年は抗体製剤(抗TNF α 抗体)や免疫抑制剤などの治療が効果を上げているが未だ完全ではなく、病態の解明および新規治療の確立が望まれている。炎症性腸疾患の病態解明のため、申請者はTNF α におけるシグナル伝達を詳細に解析してきた。その際、TNF α により非常に強く誘導されNF κ Bシグナルを負に制御するユビキチン調節遺伝子A20(TNFAIP3)に着目した。まず、申請者は、A20に結合する分子として同定された新規分子ABIN-1(A20 binding and inhibitor of NF κ B-1)について検討した。ABIN-1は、TNF α による細胞死を強く制御することを明らかとした。次に、ABIN-1に新規ドメインを発見しこのドメインがFADDとCaspase8を含む細胞死分子複合体形成を制御することを明らかとした。このことにより、TNF α による細胞死分子複合体形成にユビキチンシステムが関与していることを世界に先駆けて証明した(*Nature*.2009)。

つぎに、申請者らは抗原提示細胞特異的A20欠損マウスにおいてTリンパ球活性化と腸炎を発症することを見だし、Welcome Trust Case-Control Consortium (WTCCC)のヒトゲノム解析にてA20遺伝子がクローン病の感受性遺伝子であることを明らかとした(*Nature Immunology*. 2011)。

申請者は、A20遺伝子の炎症性腸疾患における更なる機能解析を開始したが、環境因子も断定できていない現時点での詳細な検討は困難であった。そこで新しい着眼の病態解明が必要であり申請者は自己抗体に着目した。自己免疫疾患において、自己抗体は病因と直接的に関係していることが多い。例えば、全身型重症筋無力症における抗アセチルコリン受容体抗体の特異度は98%と高い。これはニコチン性アセチルコリン受容体に抗アセチルコリン受容体抗体が結合し、アセチルコリンによる神経・筋伝達を阻害するために筋肉の易疲労性や脱力が起こすためである。消化器では原発性胆汁性肝硬変(PBC)での陽性率、特異度とも高い抗ミトコンドリアM2抗体が認められる。炎症性腸疾患では診断のため様々な血清マーカーの検討がされているが特異的なマーカーはない。しかし、自己抗体である核周辺抗好中球細胞質抗体(p-ANCA)は潰瘍性大腸炎(UC)の60~70%、クローン病では5~20%認められている。今回申請者は自己抗体産生機構を解明することで炎症性腸疾患の病態解明を目指す。

2. 研究の目的

本申請では、クローン病感受性遺伝子A20欠損マウスを用いて自己抗体産生腸炎モデルを作製し炎症性腸疾患の病態解明につな

げていく。また、自己抗体を産生する腸炎モデルの基礎として抗原提示や細胞活性化には細胞内でのオートファジーが関与していることが示されている。本申請においても自己抗体産生機構を明らかにするためクローン病感受性遺伝子A20によるオートファジー制御から解析も行う。さらに、セリアック病モデルを作製する。セリアック病は小麦に含まれるグルテンによる過剰免疫反応により発症する。セリアック病では遺伝的素因のある人において、グルテンペプチドが、Transglutaminase2 (TG2)により修飾を受け、抗原提示細胞から過剰の抗原提示を行うことで、CD4T細胞が活性化されることから腸管に炎症が惹起される。セリアック病ではTG2に対する自己抗体が感度95%以上で感知され診断に用いられている。A20遺伝子はセリアック病の感受性遺伝子でもあり病因ペプチドに即したモデルの作成を行う。このモデルのペプチド投与方法やアジュバントを参考に抗好球抗体産生腸炎の構築を試みる挑戦的な研究である。

3. 研究の方法

本研究は、次のステップにより順次進行させた。

(1)クローン病感受性遺伝子A20欠損マウスの樹立；申請者は、University of California, San FranciscoのAveril Ma研究室からA20 floxマウスを導入し、薬剤誘導性欠損マウスおよびT細胞特異的欠損マウスを樹立した。そのマウスを用いて解析を行った。腸炎モデルの解析を行うためDSS腸炎にて病理学的解析、体重変化・血便などクリニカルスコアを検討した。

(2)免疫学的解析

脾臓、リンパ節、腸管よりリンパ球を抽出し、FACSにより表面マーカーを解析した。CD4をビーズセレクションにより分離し、in vitroでCD3CD28刺激した。

(3)オートファジー解析

in vitroで刺激したリンパ球をLC3抗体で免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にてLC3 punctaをカウントした。ミトコンドリア解析には電子顕微鏡を用いた。FACSにて活性酸素(ROS)の測定を行った。In vivoでのリンパ球の解析のため、RAG欠損マウスにA20欠損リンパ球を移入しmTOR阻害剤を投与し解析した。in vitroおよびin vivoでの細胞死解析は、刺激後の細胞をdapiで染色し染色されない細胞を生細胞としてカウントした。

(4)遺伝子発現および分子間結合解析

遺伝子発現はRT-PCRで解析した。また、蛋白レベルの検定にwestern blotを行った。タンパク質間の相互作用の解析にProximity Ligation Assay (PLA \otimes)を行った。また、細胞抽出液を用いて免疫沈降を行った。

4. 研究成果

炎症性腸疾患における自己抗体産生機構を解析するために、クローン病感受性遺伝子欠損マウスを用いたモデルの作成を開始した。申請者がクローン病感受性遺伝子の一つとして同定した A20(TNFAIP3) 遺伝子の欠損マウスを使用し自己抗体産生モデルへの展開を行った。臓器特異的欠損や誘導性欠損マウスの解析樹立から行った。

(1) 薬剤誘導性 A20 欠損マウスの樹立

A20 Flox マウスに薬剤誘導性(タモキシフェン)に Cre recombinase を核内移行できる ER-cre Tg マウスを交配させ、誘導性に A20 を欠損できるマウスを樹立した。このマウスはタモキシフェンを投与しなければ Cre recombinase が働かない。薬剤投与前の A20Flox ER-cre マウスに表現系がないことを western blot, PCR, FACS などで確認した。さらに、このマウスからリンパ球を抽出し、in vitro で CD3CD28 刺激とともにタモキシフェンも添加して誘導性に A20 を欠損させるモデルを作成した。4 8 時間後のリンパ球において A20 が欠損していることを western blot, PCR で確認した。

(2) A20 欠損マウスおよび T 細胞特異的 A20 欠損マウスの樹立

ER-cre Tg マウスにタモキシフェンを投与し germ line にて A20 欠損をマウスした樹立し、野生型マウスと交配することで A20 欠損マウスを作成した。また、免疫系における活性化が新規の自己抗体産生モデルの作成に必須であり CD4-cre Tg を A20Flox マウスと交配し T 細胞特異的 A20 欠損マウスも作成した。これらの系を用いてクローン病感受性遺伝子 A20 欠損マウスを用いた解析を行った。

(3) A20 のオートファジー制御機構

自己抗体産生において重要な役割を担っている CD4 リンパ球において A20 のオートファジー制御を検討した。A20 欠損リンパ球は活性化とともに LC3 puncta 形成の低下、ミトコンドリアの腫大、ROS 産生増加を認め、細胞数が減少することが明らかになった。このことは、A20 欠損リンパ球において活性化に伴うオートファジーが抑制されていることを示唆していた。A20 欠損リンパ球における活性化に伴うオートファジー誘導低下を顕微鏡における LC3 puncta だけでなく、ウェスタンにおける LC-11 の誘導低下においても確認した。その分子機構としては上流の mTOR のユビキチン化を A20 が制御していることを明らかとした。さらに、mTOR 阻害剤にて A20 欠損によるオートファジー抑制が回復することを in vitro と in vivo にて明らかとした(Matsuzawa et al. Autophagy 2015)。

また、その A20 欠損 CD4 リンパ球は細胞分裂を行うことができるが、細胞死を誘導することを見いだした。A20 欠損細胞の細胞死は

非アポトーシスであり、ネクロプトーシスであることを明らかとした。RIPK1 阻害剤である Nec1 およびネクロプトーシスの中心分子である RIPK3 を欠損すると細胞死が回復することもあきらかとした。RIPK3 のユビキチン化部位も同定し、RIPK3 のユビキチン化がネクロプトーシスに重要であることを明らかとした(Onizawa et al. Nature Immunology 2015)。

死細胞の貪食もしくは死細胞は放出する分子が炎症および自己抗体産生に参与していることが考えられる。申請者はネクロプトーシスの中心分子の RIPK3 と A20 の関与を検討した。RIPK3 が p62 と複合体を形成し、caspase8 依存的に p62 を cleave することを見いだした。さらに RIPK3 が p62 と LC3 との複合体形成を制御するという新規機構を明らかとし、この機構は A20 により阻害することも見いだした(Matsuzawa et al. BBRC 2015)。DSS 腸炎にて腸炎解析の準備は整っており、T 細胞特異的 A20 欠損マウスの長期飼育後の炎症の有無および自己抗体産生を解析し、詳細な機構を明らかにする予定である。ペプチド投与方法やアジュバント投与による腸炎モデル作成に発展させる。

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 5 件)

1. #Onizawa M, #Oshima S, #Schulze-Topphoff U, Osés-Prieto JA, Lu T, Tavares R, Prodhomme T, Duong B, Whang MI, Advincula R, Agelidis A, Barrera J, Wu H, Burlingame A, Malynn BA, Zamvil SS, Ma A (2015) The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. Nature Immunology 16: 618-627 (# indicates co-first authors) doi: 10.1038/ni.3172. 査読あり
2. Matsuzawa Y, *Oshima S, Nibe Y, Kobayashi M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, *Watanabe M (2015) RIPK3 regulates p62-LC3 complex formation via the caspase-8-dependent cleavage of p62. Biochemical and Biophysical Research Communications 456: 298-304(* indicates co-corresponding authors) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.075. 査読あり
3. Matsuzawa Y, *Oshima S, Takahara M,

Maeyashiki C, Nemoto Y, Kobayashi M, Nibe Y, Nozaki K, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Ma A, *Watanabe M (2015) TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. Autophagy 11: 1052-1062(* indicates co-corresponding authors) doi: 10.1080/15548627.2015.1055439. 査読あり

4. Shao L, Oshima S, Duong B, Advincula R, Barrera J, Malynn BA, Ma A (2013) A20 Restricts Wnt Signaling in Intestinal Epithelial Cells and Suppresses Colon Carcinogenesis. Plos One 8 e62223 doi: 10.1371/journal.pone.0062223. 査読あり
5. Callahan JA, Hammer GE, Agelides A, Duong BH, Oshima S, North J, Advincula R, Shifrin N, Hong-An T, Paw J, Barrera J, DeFranco A, Rosenblum MD, Malynn BA, Ma A (2013) Cutting Edge: ABIN-1 Protects against Psoriasis by Restricting MyD88 Signals in Dendritic Cells. Journal of Immunology 191: 535-539 doi: 10.4049/jimmunol.1203335. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

1. Yu Matsuzawa, Shigeru Oshima, Masanori Kobayashi, Yoichi Nibe, Chiaki Maeyashiki, Averil I. Ma, Mamoru Watanabe. A Crohn's Disease Susceptibility Gene A20 Regulates Autophagy Dynamics in CD4 T Cells. (DDW 2015) 2015.5.17.Washington,DC (USA)
2. Yu Matsuzawa, Shigeru Oshima, Masahiro Takahara, Kengo Nozaki, Masanori Kobayashi, Yoichi Nibe, Chiaki Maeyashiki, Yasuhiro Nemoto, Averil Ma, Mamoru Watanabe. A ubiquitin-modifying enzyme A20 controls the dynamics of autophagy. (UEGW 2014) 2014.10.21. Vienna (Austria)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 茂 (OSHIMA, Shigeru)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・
助教
研究者番号：50376787

(2) 研究分担者

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・教授
研究者番号：10175127