

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893231

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答によるNKG2Dリガンド発現機構と腸炎への関与の解明

研究課題名(英文)Role of endoplasmic reticulum stress on induction of NKG2D-ligand, leading to enteritis

研究代表者

細見 周平 (Hosomi, Shuhei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：60554938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮のXbp1欠損が小胞体(ER)ストレスを誘発し、マウスにおいて自然発症腸炎が生じることが知られている。本研究ではERストレスに伴って誘導されるCHOPが、NKG2DのマウスにおけるリガンドであるMULT1の発現を誘導することを証明した。また、この誘導がNKG2Dを介して、NK細胞の細胞傷害活性を亢進させることを証明した。

ヒト大腸上皮細胞株を用いた実験から、ERストレスがNKG2DのヒトにおけるリガンドであるULBP1・5・6の発現を誘導することが明らかとなった。更に、クローン病患者小腸の免疫染色では、パネート細胞を中心とした腸管上皮でULBP5の発現が亢進している傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum stress (ER stress) is commonly observed in intestinal epithelial cells (IEC) and can be a primary factor in intestinal inflammation as shown by mice with IEC-specific deletion of X-box binding protein-1 (Xbp1), an unfolded protein response-related transcription factor, which develop spontaneous inflammation of the small intestine. In the present study, I showed that ER-stressed IECs, as a consequence of Xbp1 deletion, selectively upregulate mouse NKG2D-ligand MULT1 and its human orthologue ULBP through ER stress-related transcription factor CHOP. The increased expression of NKG2D-ligand on mouse IECs induces and activates intraepithelial natural killer (NK) cells through their expression of NKG2D. The ULBPs expression was induced by ER stress in not only intestinal cell line but also other cell lines, indicating that the NKG2D-ligands induction by ER stress might be universal phenomenon to maintain homeostasis in our body.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 腸管免疫 小胞体ストレス NKG2D

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノムワイド関連解析により、炎症性腸疾患の多数の疾患感受性遺伝子が報告されてきているなか (*Graham DB et al. Trends Immunol. 2013*)、申請者が2011年から2014年まで在籍した Boston の Brigham and Women's Hospital の消化器科の研究グループは、小胞体ストレス (ER ストレス) センサーの一つである inositol requiring enzyme 1 (IRE1) 下流の核内転写因子 X-box-binding protein 1 (XBP1) の Hypomorphic 変異を炎症性腸疾患の新たなリスク因子として同定した (*Kaser A, et al. Cell 2008*)。さらに Xbp1 遺伝子を腸管上皮細胞またはパネート細胞特異的に欠損させたマウスを作成し、その欠損が ER ストレスを誘導しパネート細胞の異常を来し、自然発症小腸炎をもたらすことを発見した (*Kaser A, et al. Cell 2008, Adolph TE, et al. Nature. 2013*)。この腸炎発症における免疫応答メカニズムは不明であったが、予備実験において、自然免疫系細胞と NK 細胞の活性化受容体である NKG2D が小胞体ストレスと関連している可能性が示唆される結果であった。

## 2. 研究の目的

炎症性腸疾患の疾患感受性遺伝子として同定された XBP1 と病因・病態を理解する上で、Xbp1 ノックアウトマウスで認める自然発症小腸炎における免疫応答を理解することは重要であることから、下記を本研究の目的とした。

### (1) ER ストレスによる MULT1 発現の分子機構の解明:

Xbp1 欠損マウスの小腸粘膜では、ER ストレス関連分子発現増加を認めることから、これらの分子が MULT1 発現を調節していると仮説をたて、ノックダウンや過剰発現系を用いて MULT1 発現メカニズムを解明することを

目的とした。

### (2) MULT1 発現上皮細胞に対する NKG2D 陽性細胞の免疫応答:

MULT1 高発現腸管上皮細胞に対する自然免疫系細胞による細胞傷害活性を明らかにする。また、Xbp1 欠損マウスにおける自然発症腸炎の発症メカニズムとして、MULT1-NKG2D を介した腸炎発症機序を解明する。ヒト炎症性腸疾患における NKG2D 及び NKG2D リガンドの発現や ER ストレス関連分子発現を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) ER ストレスによる NKG2D リガンド発現の分子機構の解明:

マウス小腸細胞株に ER ストレス刺激を加えた際の NKG2D リガンド発現を検討する。具体的には細胞を ER ストレス誘導剤 Thapsigargin (Tg) で刺激培養を行い、フローサイトメトリー及び定量 RT-PCR で発現を解析する。ヒト大腸癌細胞株における NKG2D リガンド発現についても、同様の実験で検討する。予備実験の結果から、腸上皮特異的 Xbp1 欠損マウスの小腸上皮細胞においては、NKG2D リガンドの一つである MULT1 の発現が誘導されることが明らかとなり、Xbp1 欠損マウスの小腸上皮細胞においては PERK・ATF4・CHOP の活性化や発現誘導が見られたため、これらの分子が MULT1 の発現を直接調節していると仮説をたて、siRNA 実験によりその発現誘導分子の同定を試みる。調節分子が転写因子であった場合は、クロマチン免疫沈降 (ChIP) assay や MULT1 のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼプラスミドを用いた reporter assay により、そのメカニズムを明らかにする。

### (2) MULT1 異常発現と自然免疫細胞の免疫応答:

Xbp1 欠損、ER ストレスによる MULT1 の高発現が、NKG2D を介した自然免疫細胞の細胞傷

害活性を誘導していることが予測されるため、エフェクター細胞として recombinant IL2 刺激後の NK 細胞を、標的細胞として Xbp1 ノックダウン MODE-K 細胞を用いて細胞傷害アッセイを行う。この際に NKG2D の阻害抗体でエフェクター細胞を全処置し、細胞傷害を阻害しうるか否かも検討する。

### (3) ヒト炎症性腸疾患での NKG2D/NKG2D リガンドの発現と ER ストレスとの関連:

健常人・潰瘍性大腸炎患者・クローン病患者から手術または内視鏡下生検にて得られた組織を、パラホルムアルデヒドにて固定し凍結切片を作成し、腸管上皮細胞における NKG2D リガンドの発現を免疫組織染色にて評価する。発現数や強度をスコア化し相関関係の有無を検討する。同時に、組織より抽出した RNA サンプルを用いて、mRNA の定量 RT-PCR を行い、GRP78 などの ER ストレスマーカーと各 NKG2D リガンド発現の相関を検討する。

### (4) ヒト癌細胞株における ER ストレス刺激による NKG2D リガンド発現の検討:

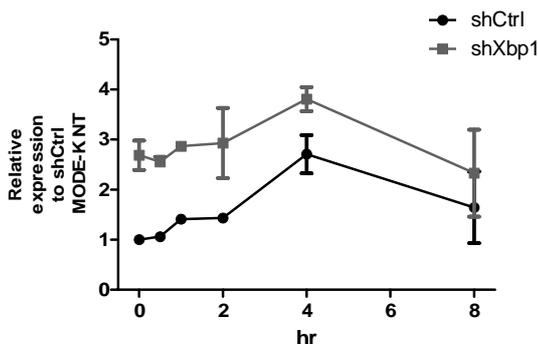
ヒトの NKG2D リガンドとして MICA/B と ULBP1-6 が同定されている。ER ストレスによるこれら NKG2D リガンド発現変化を検討すべく、ヒト食道、胃、肝臓癌細胞株、及び T 細胞系細胞株や B 細胞系細胞株を用いて、ER ストレス刺激下での NKG2D リガンドの mRNA 発現を定量 RT-PCR 法で検討する。

## 4. 研究成果

### (1) マウス小腸細胞株における NKG2D リガンド発現:

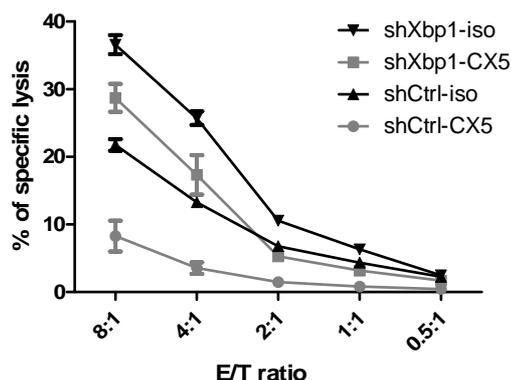
フローサイトメトリーと定量 RT-PCR による解析にて、マウス NKG2D リガンドの一つである MULT1 が Thapsigargin (Tg) による ER ストレス下や Xbp1 ノックダウン条件下で特異的に誘導された。mRNA の安定性実験などから、この誘導メカニズムは転写レベルと考えられた。発現機構解析のためにおこなったノックダウン実験では、ER ストレスを誘発に伴っ

て誘導される CHOP のノックダウンによって、ER ストレス下での MULT1 の発現誘導が抑制された。ChiP assay・Reporter assay により、CHOP が MULT1 のプロモーター領域に結合することで転写レベルでの MULT1 発現の誘導につながるということが明らかとなった。



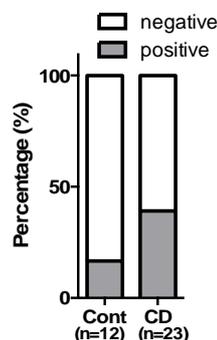
### (2) NKG2D を介した MULT1 発現細胞への細胞傷害活性

マウス小腸細胞株である MODE-K 細胞に対する IL-2 刺激 NK 細胞による細胞傷害活性実験では、コントロール細胞 (shCtrl) と比較して Xbp1 ノックダウン細胞 (shXbp1) に対する NK 細胞による細胞傷害活性はより高かった。またこの細胞傷害活性は NKG2D 阻害抗体 (CX-5) により抑制された。



### (3) ヒト炎症性腸疾患における NKG2D リガンド発現

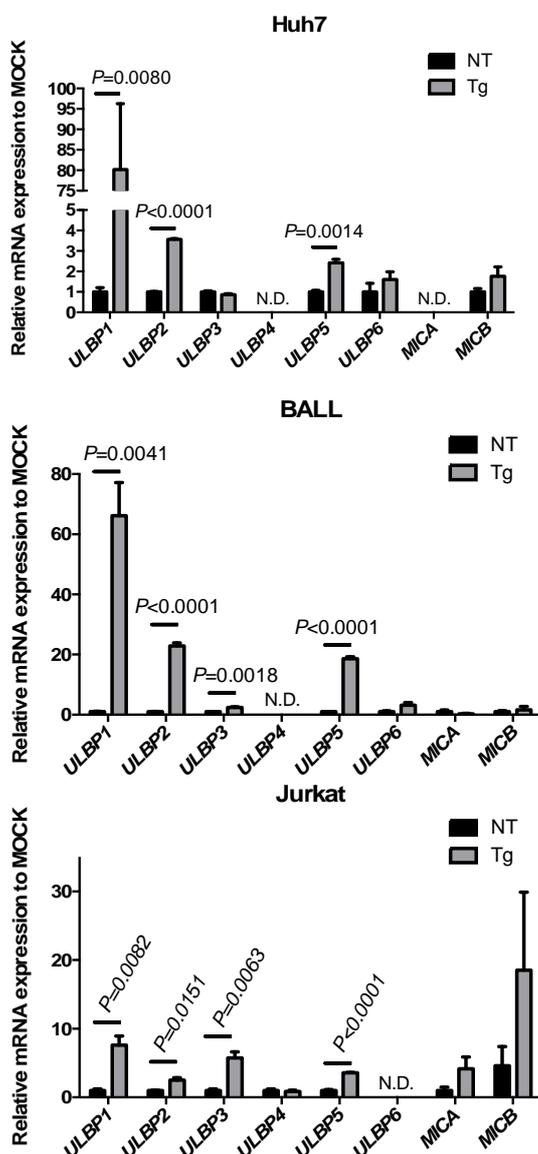
ULBP5 発現については、潰瘍性大腸炎の粘膜 PCR で mRNA 発現が優位に亢進している結果が得られた。しかしながら免疫染色では裏付ける



結果が得られなかった。一方で、クローン病（CD）の腸管上皮で ULBP5 の発現が亢進している傾向を認め、特に小胞体ストレスマーカーの発現が強いパネート細胞における発現が強い傾向にあった。

#### (4) ER ストレスによるヒト細胞株における ULBP 発現

ヒト大腸上皮細胞株において ER ストレスが ULBP1・5・6 の発現を誘導した。食道、胃、肝臓癌細胞株、及び T 細胞系細胞株や B 細胞系細胞株などでも評価を行ったところ、胃がん細胞株においても ER ストレスで ULBP5 と ULBP6 の発現が誘導された。また肝細胞癌細胞株（Huh7）、B 細胞系（BALL）・T 細胞系細胞株（Jurkat）のいずれにおいても ULBP1・ULBP2・ULBP5 の発現が亢進した。このことは、



ER ストレスによる NKG2D リガンド、特に ULBP の発現を誘導することは universal な現象であることが明らかとなった。

以上の結果から、Xbp1 欠損腸管上皮細胞で認められる ER ストレスは、その応答シグナル分子として重要な CHOP を介して NKG2D リガンド発現を誘導することが明らかとなった。この NKG2D は NK 細胞表面に発現する活性化受容体であり、NKG2D リガンド発現細胞に対して細胞傷害活性を有する。この系を介した免疫応答が、ER ストレスを有する腸管において、炎症を導いている可能性が示唆される結果であった。また、炎症性腸疾患の新たな治療標的の探索をすすめる上で重要な結果であったと考える。

#### 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1件)

Hosomi S, Kaser A, Blumberg RS. ER stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 査読なし 31(1):81-8 2014

[学会発表](計2件)

細見 周平, Magdalena B Flak, 山上 博一, 渡辺 憲治, 荒川 哲男, Richard S Blumberg, Xbp1 遺伝子欠損マウスにおける NKG2D NKG2D リガンドを介した自然免疫応答の解明、第 51 回 日本消化器免疫学会、2014 年 7 月 10・11 日、京都大学医学部 芝蘭会館 (京都府京都市)

Grootjans J, Hosomi S, Flak MB, McCoy KD, Macpherson AJ, Kaser A, Blumberg RS, B Cells and Dendritic Cells React to

Intestinal Epithelial Stress with a Coordinated and Protective IgA Response, 17th International Congress of Mucosal Immunology. 17<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology. 2015年07月14日～2015年07月18日、ベルリン(ドイツ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: Endoplasmic Reticulum Stress Induced ULBP as a Target for Inflammatory Bowel Disease

発明者: Richard S. Blumberg

権利者: Richard S. Blumberg

種類: 特許

番号: BWH #23735

出願年月日: 2015年11月20日

国内外の別: 外国

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細見 周平 (HOSOMI, Shuhei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号: 60554938

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

Richard S. Blumberg

Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical school