

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860568

研究課題名(和文)腸管上皮または骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスを用いた腸管炎症制御の解明

研究課題名(英文)Cell type-specific role of Autophagy against intestinal inflammation

研究代表者

井上 潤 (INOUE, Jun)

神戸薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：50631561

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)：炎症性腸疾患の原因遺伝子のひとつとして知られるオートファジー遺伝子による腸管炎症制御機構は、まだ解明されていない。本研究では、臓器特異的オートファジー欠損マウスを作製しオートファジーの炎症制御機構を解析した。オートファジー欠損マクロファージとマウス感染性腸炎モデル細菌である *Citrobacter Rodentium* を共培養すると IL-1 の分泌が亢進し、さらに骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスに *C. Rodentium* を感染させると腸炎が増悪した。これらの結果より、骨髄性細胞のオートファジーは腸管上皮細胞と同様に腸管の炎症制御に関して重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide association studies identified autophagy gene as a Crohn's disease susceptibility gene. However it is unclear how autophagy regulates the inflammation in the intestine. The purpose of this study is to clarify the mechanism of autophagy to regulate the intestinal inflammation. We generated the organs specific autophagy deficient mouse, then the involvement of autophagy in intestinal inflammation was examined. Secretion of IL-1 in the macrophages harvested from peritoneal cavity of the mice in which *Atg7* had been conditionally deleted from the lysozyme cells was higher than that of control mice after infection with *Citrobacter Rodentium*, a pathogen used in the murine model of infectious enteritis. And more infected knockout mice exhibited greater clinical evidence of disease and higher expression levels of IL-1 mRNA in the large intestine. These results indicated that autophagy in the lysozyme cells have important role in the regulation of intestinal inflammation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 炎症性腸疾患 感染性腸炎

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは不要なタンパク質を分解し、栄養飢餓時には自己タンパク質の分解による栄養確保に重要である。また、細胞内に侵入した病原体の分解や細胞内タンパク質の抗原提示などにも関与する。オートファジーの機能異常はさまざまな疾患の病態と関連することが明らかにされている (*Cell*. 2008;132(1):27-42)。その中で、オートファジーに関連する Atg16L1 の遺伝子多型が炎症性腸疾患であるクローン病で同定され (*Nat Genet*. 2007;39(2):207-11)、オートファジーと炎症性腸疾患との関係が注目されている。炎症性腸疾患の発症には腸内細菌に対する宿主の免疫異常の関りが強く (*Gastroenterology*. 2008;134:577-94)、このことから、本実験代表者はオートファジーの機能異常が腸内細菌に対する免疫異常を誘起して炎症を増悪させるという仮説の基に研究を行ってきた。これまでに、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製し、このマウスに病原性大腸菌 *Citrobacter Rodentium* を感染させると腸管粘膜に強い炎症が惹起され、同時に菌の排除能も低下することを見出した。これらの結果により、腸管上皮のオートファジーが病原菌に対する免疫応答を介して炎症反応を制御することが明らかとなった。近年、血液系の全細胞でオートファジー遺伝子である Atg16L1 を欠損させたキメラマウスで炎症性腸疾患モデルである Dextran Sulfate Sodium (DSS) 誘発性腸炎が増悪することが明らかとなり、血球のオートファジーの腸管炎症制御も注目されている (*Nature*. 2008;456:264-68)。しかし、どの細胞のオートファジーがどのように炎症性腸疾患の病態制御に関与するかは未だ不明である。

2. 研究の目的

オートファジーの機能異常が炎症性腸疾患の病態形成因子として重要であるという仮説の基に、腸管上皮細胞やマクロファージなどの腸管炎症に関わるどの細胞のオートファジーが腸管の炎症制御機構において重要であるかを分子レベルで明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) オートファジー欠損マクロファージを用いた、オートファジーの炎症制御機構の解析

腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスと同様に Cre-loxP システムを用い Atg7 Flox/Flox マウスと Lyz-cre マウスを掛け合わせることで骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスを作製した。このマウスに 3% チオグリコレート溶液を腹腔内投与し、腹腔内に誘導されたマクロファージを含む腹腔液を採取し、リポポリサッカライド (LPS) の投与や *C. rodentium* との共培養を

行い、炎症反応について解析を行った。

(2) 腸管上皮オートファジー欠損マウスおよび骨髄性細胞オートファジー欠損マウスを用いた腸管炎症制御機構の解析

腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスおよび骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスを用い、マウス炎症性腸疾患モデルマウスを作成し解析した。3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 7 日間自由飲水させ、体重変化、大腸の長さ、病理スコアなどにより、腸炎が増悪するかを検討した。さらに、骨髄細胞特異的オートファジー欠損マウスに対して *C. rodentium* を経口投与し感染性腸炎モデルでの解析を行った。

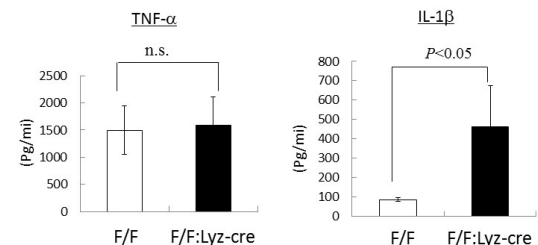
4. 研究成果

(1) オートファジー欠損マクロファージの細菌に対する炎症応答解析

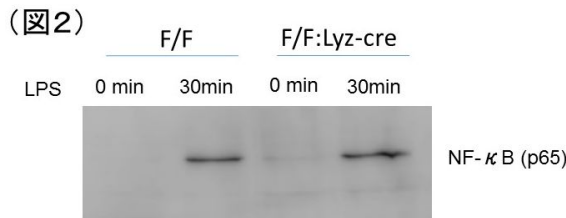
LPS および *Citrobacter Rodentium* に対する炎症反応亢進

Cre-loxP システムによって腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスと同様に骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスを作成した。このマウスから採取した腹腔内マクロファージを培養しマウス感染性腸炎モデル細菌である *C. rodentium* と共培養すると、TNF- α 量はコントロールマウスのマクロファージと比べ差がなかったが、IL-1 分泌量が亢進した (図 1)。さらに、オートファジー欠損マクロファージに 100ng/ml の LPS を投与すると培養上清中の IL-1 量は同様にオートファジー欠損マクロファージで上昇していた。この炎症反応亢進が NF- κ B の活性化を介しているかを検討する目的で LPS 投与後の核内の NF- κ B をウェスタンブロット法によって解析したが、NF- κ B の活性化にはコントロールとオートファジー欠損マクロファージでは差がなかった (図 2)。これまでに、腸管上皮のオートファジーは NF- κ B を抑制することで LPS による炎症反応を制御していることを明らかにしているが (*Arch Biochem Biophys*. 2011 Feb;506(2):223-35.)、マクロファージのオートファジー (Atg7) は NF- κ B を介さない経路で炎症を制御していると考えられた。

(図 1)

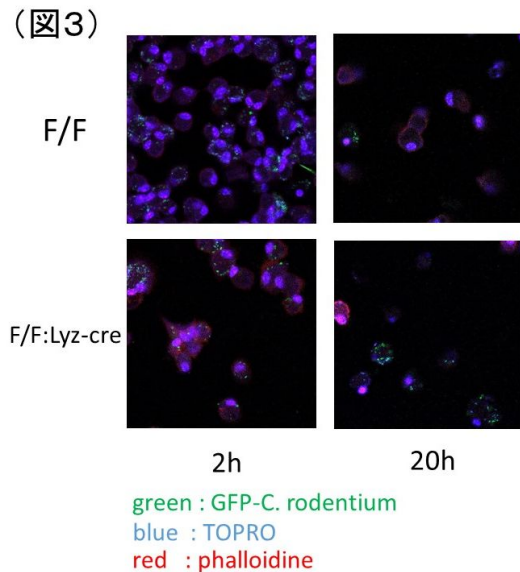


腹腔内マクロファージを採取し、*C. rodentium* と 20 時間共培養し、培養液中のサイトカイン濃度を ELISA にて測定



オートファジー欠損マクロファージにおける *Citrobacter Rodentium* のクリアランス低下

骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスより採取した腹腔内マクロファージに *C. rodentium* を感染させると、2 時間後のマクロファージ中の菌量はコントロールと差がなかったが 20 時間後の菌量はコントロールに比べ多かった (図3)。このことよりオートファジーが欠損したマクロファージの菌の分解能がコントロールのものに比べ低下していることが示唆された。



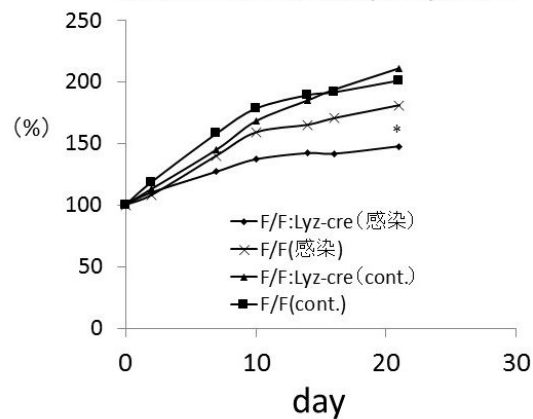
(2)腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスと骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスを用いた腸管炎症制御機構の解析

Cre/loxP システムによって作成した腸管特異的オートファジー欠損マウスおよび骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスを用いてマウス炎症性腸疾患モデルである DSS 腸炎を誘発させた。しかし、どちらのマウスも体重変化や腸の長さおよび病理像などからコントロールマウスと比べ腸炎の程度に差はなかった。これらの結果より、化学物質誘発性の炎症性腸疾患モデルでは、その感受性にオートファジーは関与していない可能性が示唆された。

次に、骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスに *C. rodentium* を経口感染させた。その結果、骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスで、体重減少が増悪し (図4)、腸管上皮の IL-1 mRNA が有意に上昇した。また、糞便中の *C. rodentium* 菌量はコントロ

ールマウスのものに比べ多い傾向にあったが、統計学的有意差は認めなかった。マウスモデルでは、マクロファージによる菌のクリアランス低下を補う他の機構が働いていると考えられた。これらの結果から、骨髄性細胞特異的オートファジー欠損マウスでは、菌のクリアランスはコントロールマウスと比べ変わらないが、菌に対する炎症反応の亢進により腸炎の増悪を来していると考えられた。

(図4) *C. rodentium* 感染後体重変化率



(3)考察

近年、クローン病感受性遺伝子としてオートファジー関連遺伝子が同定され、腸管炎症病態におけるオートファジーの重要性が注目されている。しかし、その詳しい分子機構や関与する細胞の種類などは不明である。今回の研究で、骨髄性細胞のオートファジーはマウス感染性腸炎モデル細菌である *C. rodentium* による腸管炎症を制御していることが明らかとなった。骨髄性細胞のオートファジーは腸管上皮のオートファジーと同様、腸管炎症制御において非常に重要な役割を担っていることが示唆された。今後、腸管上皮のオートファジーおよび骨髄性細胞のオートファジーがどのように腸管の炎症を制御しているかを分子レベルでさらに追っていくことが重要であると考えられる。本研究は、感染性腸炎や炎症性腸疾患の病態解明や予防および治療に必要な理論基盤の確立に貢献しうると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Horibe S, Matsuda A, Tanahashi T, Inoue J, Kawachi S, Mizuno S, Ueno M, Takahashi K, Maeda Y, Maegouchi T, Murakami Y, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins. Life Sci. 2015 Mar 1;124:31-40 査読有

DOI:10.1016/j.lfs.2015.01011

Kawauchi S, Nakamura T, Yasui H, Nishikawa C, Miki I, Inoue J, Horibe S, Hamaguchi T, Tanahashi T, Mizuno S. Intestinal and hepatic expression of cytochrome P450s and mdr1a in rats with indomethacin-induced small intestinal ulcers. *Int J Med Sci.* 2014 Sep 13;11(12):1208-17. 査読有
DOI:10.7150/ijms.9866

Kawara F, Inoue J, Takenaka M, Hoshi N, Masuda A, Nishiumi S, Kutsumi H, Azuma T, Ohdaira T. The influences of pepsin concentrations and pH levels on the disinfective activity of ozone nanobubble water against helicobacter pylori. *Digestion.* 2014;90(1):10-17. 査読有
DOI:10.1159/000358286

Kawauchi S, Nakamura T, Miki I, Inoue J, Hamaguchi T, Tanahashi T, Mizuno S. Downregulation of CYP3A and P-glycoprotein in the secondary inflammatory response of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis and its contribution to cyclosporine A blood concentrations. *J Pharmacol Sci.* 2014;124(2):180-91. 査読有
DOI:10.1254/jphs.13141FP

〔学会発表〕(計 4 件)

井上 潤、棚橋 俊仁、堀部 紗世、河内 正二、井上 正康、水野 成人、マウスモデルを用いた分子状水素による抗炎症効果の検討、日本薬学会、2015年3月25~28日、神戸

井上 潤、河内 正二、棚橋 俊仁、井上 正康、水野 成人、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) モデルマウスにおける分子状水素の抗炎症効果の検討、第 29 回日本ストレス学会学術総会、2013年11月8~9日、徳島

Jun Inoue, Ikuya Miki, Toshihito Tanahashi, Shoji Kawauchi, Takeshi Azuma, Shigeto Mizuno. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of NSAID-induced small intestinal injury. *American Gastroenterological association (AGA) Digestive Disease Week 2013*, 2013年5月18~21日, Orlando

Jun Inoue, Namiko Hoshi, Shin Nishiumi, Yoshimi Fujishima, Atsuhiko Masuda, Hideyuki Shiomi, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Cell type-specific role of autophagy against *Citrobacter rodentium* infectious colitis. *IMMUNOLOGY 2013 AAI*

Annual Meeting. 2013年5月1~9日, Honolulu

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 潤 (INOUE Jun)

神戸薬科大学・医療薬学研究室・研究員

研究者番号: 50631561