

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01708

研究課題名(和文)自然免疫応答および炎症関連性癌発症におけるGADD34の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of the function of GADD34 in innate immune response and inflammation-induced colon cancer

研究代表者

伊藤 佐知子(Ito, Sachiko)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70447845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細菌感染による炎症応答および炎症関連大腸癌発症におけるGADD34の機能について解析した。その結果、GADD34はLPSにより活性化されるIKKの脱リン酸化を促進し、マクロファージによる炎症性サイトカイン産生を抑制することで、LPSによる組織傷害を抑制することが明らかとなった。一方で、AOM/DSS誘導性の炎症関連大腸癌発症においては、GADD34は大腸組織においてDSSによるIL-6産生、またIL-6/STAT3経路の活性化による上皮細胞の増殖を促進し、DSS誘導性の大腸炎及びそれに起因する大腸癌発症を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the function of GADD34 in inflammatory responses against bacterial infections. We found that GADD34-deficiency enhanced tissue destruction, cell death and pro-inflammatory cytokine expression in LPS-induced acute liver injury. GADD34 inhibited hepatic apoptosis through down-regulating the eIF2 γ -ATF4-CHOP pathway. Then GADD34 inhibited TLR4 signaling through dephosphorylation of IKK β , and attenuated pro-inflammatory cytokine production in macrophages. Further, we analyzed the function of GADD34 in colitis associated cancer. We found that GADD34 promoted tumor formation induced by AOM/DSS. DSS induced the expression of GADD34. GADD34 upregulated the production of IL-6 induced by DSS in colon tissue and the proliferation of epithelial cells by activation of the IL-6/STAT3 pathway. These results indicated that GADD34 promoted AOM/DSS-induced carcinogenesis by enhancing IL-6 production from myeloid cells and subsequent STAT3 activation in epithelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：GADD34 ERストレス TLR4シグナル 炎症 炎症関連大腸癌

1. 研究開始当初の背景

細菌等の病原体感染に対し最初に作用する自然免疫応答は、最も基本的な生体防御機構であり、老化などによる自然免疫機能の低下は肺炎など重篤な病気を引き起こす。また、近年、生体内で繰り返し起きる慢性炎症が癌や代謝疾患、循環器疾患など様々な疾患に結びついていることが報告されており、炎症反応に関与する分子の機能解析が疾患の原因解明においても重要であると考えられる。我々は、これまで、ストレス応答分子である GADD34 に着目し、生体防御における役割について解析してきた。GADD34 は小胞体ストレスにより活性化する eIF2 を脱リン酸化し、一時的な蛋白合成の停止からの回復に関与すること、また、創傷治癒において、細胞増殖、移動を抑制し治癒を遅延させること、さらに、栄養飢餓ストレスにおいて、GADD34 は mTOR シグナルを抑制することでオートファジーを促進し、飢餓からの防御に働くことなどを明らかにし、GADD34 が様々な生体防御機構に重要な役割を果たしていることを示してきた。しかし、これまで、細菌感染における自然免疫応答、および慢性炎症関連疾患における GADD34 の機能については十分に解明されていない。

2. 研究の目的

生体防御機構である炎症反応における GADD34 の機能解明は、様々な炎症性疾患の病態解明にも結びつくと考えられることから、本研究では、敗血症を引き起こす細菌感染による急性炎症、また、炎症関連大腸癌における GADD34 の詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細菌感染による急性炎症における GADD34 の機能解析

細菌感染を模倣する LPS による炎症反応における GADD34 の機能を明らかにするために、GADD34 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて解析を行った。GADD34KO または野生型 (WT) マウスに、LPS (30 mg/kg) を腹腔内投与し生存率を比較した。また、LPS (5 mg/kg) 投与後の血中炎症性サイトカインを ELISA により測定した。次に、LPS 投与による組織障害における GADD34 の関与を明らかにするために、LPS を投与したマウス肝臓、および腎臓の H&E 組織染色、血中 ALP、ASP 濃度、TUNEL 染色によるアポトーシスの解析を行った。アポトーシス誘導における GADD34 の関与を明らかにするために、ER ストレス応答分子である eIF2 の活性化、及び、その下流の ATF4、CHOP といったアポトーシス誘導に関与する転写因子の発現について解析した。

さらに、LPS 投与マウスから肝臓を採取し、サイトカイン産生、及び、F4/80 陽性クッパー細胞及び単球由来マクロファージの割合について免疫染色、フローサイトメトリーに

より解析した。マクロファージでの炎症性サイトカイン産生における GADD34 の作用機序を明らかにするために、*in vitro* において、GADD34KO または WT マウスの肝臓より分離したクッパー細胞、または、shRNA により GADD34 遺伝子発現を抑制した RAWshGADD34 細胞株を LPS 刺激し、サイトカイン産生、及び、TLR4 シグナル伝達経路の活性化について解析した。さらに、シグナル伝達分子の一つである IKK と GADD34 の結合を免疫沈降により解析した。

(2) 炎症関連大腸癌における GADD34 の機能解析

GADD34KO または WT マウスに発癌剤であるアゾキシメタン (AOM) と腸炎を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与し、炎症関連大腸癌モデルを作成し、体重変化、大腸における腫瘍形成、腫瘍組織について解析した。また、DSS 誘導性大腸炎による GADD34 の機能を解析するために、DSS 投与後の大腸組織における GADD34 の発現、炎症性サイトカイン、ケモカイン産生、免疫系細胞の浸潤について解析した。また、DSS 投与による IL-6/STAT3 シグナル伝達経路の活性化について比較検討した。

4. 研究成果

(1) 細菌感染による急性炎症における GADD34 の機能解析

GADD34KO または WT マウスに致死量の LPS を投与し生存率を比較検討した結果、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、LPS 投与による有意な生存率の低下がみられた。また、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、LPS 投与後の血中炎症性サイトカイン濃度が上昇していることが明らかとなった (図 1)。

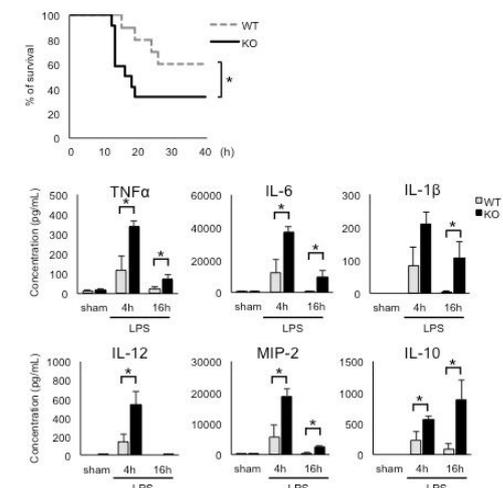


図 1 LPS 投与後の生存率と炎症性サイトカイン産生

LPS 投与後の組織への影響について解析した結果、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、肝臓において necrosis が有意に誘導され、また血清中 AST、ALT 濃度の増加がみ

られたことから、LPS による肝障害がより亢進していることが明らかとなった。また、TUNEL 染色の結果から、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、LPS による肝細胞のアポトーシスが促進していた。アポトーシス関連分子について解析した結果、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、LPS 刺激による eIF2 のリン酸化、またその下流の ATF4、CHOP の発現誘導が亢進しており、GADD34 が eIF2 の脱リン酸化を促進し、アポトーシスを抑制することが示唆された (図 2)。

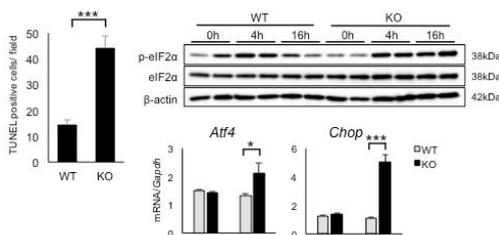


図 2 LPS 投与後の肝細胞アポトーシスの割合と、ER ストレスシグナルの活性化

次に、LPS 投与後の肝臓におけるサイトカイン産生について解析した。その結果、GADD34 KO マウスでは WT マウスに比べ、肝臓において炎症性サイトカイン産生が有意に増加していることが明らかとなった (図 3)。一方、炎症性サイトカインを産生する F4/80 陽性マクロファージ系細胞の割合については、GADD34KO と WT マウスでの変化はみられなかったことから、GADD34 はマクロファージにおける炎症性サイトカイン産生シグナルに直接関与している可能性が示唆された。そこで、LPS 投与したマウス肝臓から F4/80 陽性マクロファージ系細胞を単離しサイトカイン産生を調べた結果、GADD34KO マウス由来細胞では、WT マウス由来細胞に比べ、有意な炎症性サイトカイン産生の増加がみられ、GADD34 はマクロファージにおいて LPS 誘導性の炎症性サイトカイン産生シグナルを抑制することが示された。

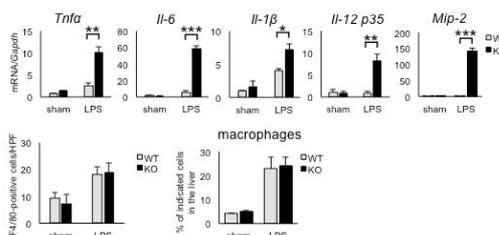


図 3 LPS 投与後の肝臓における炎症性サイトカイン産生と F4/80 陽性細胞の割合

さらに、LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生における GADD34 の機能について、*in vitro* で解析を行った。マクロファージ RAW 細胞株において、LPS 刺激により GADD34 の発現が上昇することが確認された。GADD34 発現を抑制した RAWshGADD34、または、GADD34KO マウスから単離したクッパー細胞を LPS 刺激

し、炎症性サイトカイン産生を解析した結果、RAW、クッパー細胞ともに GADD34 発現抑制により炎症性サイトカイン産生の増強がみられた (図 4)。

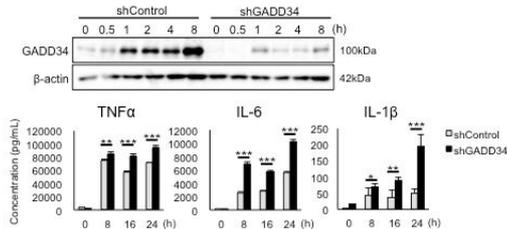


図 4 LPS 刺激による RAW 細胞株での GADD34 発現と炎症性サイトカイン産生

LPS 刺激後の TLR4 シグナルの活性化について解析した結果、RAWshGADD34 では RAWshControl に比べ、NF- κ B、I κ B、IKK、IRF3 のリン酸化が亢進していることが示された。GADD34 がこれらのシグナル分子に直接結合し作用するかを調べる為に、免疫沈降による解析を行った結果、GADD34 が IKK と結合することが示された (図 5)。

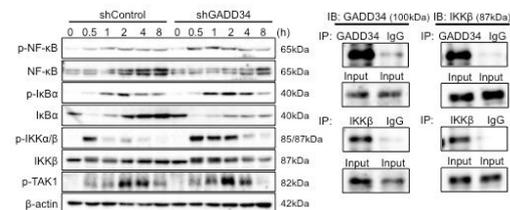


図 5 LPS 刺激による NF- κ B シグナル経路の活性化

以上の結果から、LPS による急性炎症反応において、GADD34 は LPS 刺激により活性化した IKK に結合して脱リン酸化を促進し、TLR4 シグナル活性を抑制することで、炎症性サイトカイン産生を低下させ、急性炎症による組織障害を抑えることが明らかとなった。

(2) 炎症関連大腸癌における GADD34 の機能解析

AOM/DSS 投与後の体重変化を解析した結果、WT マウスでは GADD34KO マウスより著しい体重減少がみられた (図 6)。

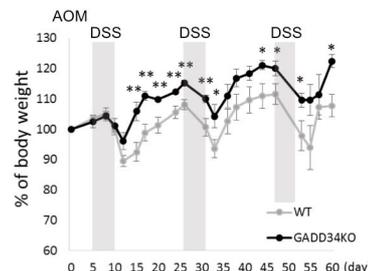


図 6 AOM/DSS 投与による体重変化

AOM/DSS 投与後、62 日目に大腸に腫瘍形成が確認されたが、GADD34 KO マウスでは、WT マウスに比べ腫瘍形成及び腫瘍サイズが抑制されていた (図 7)。

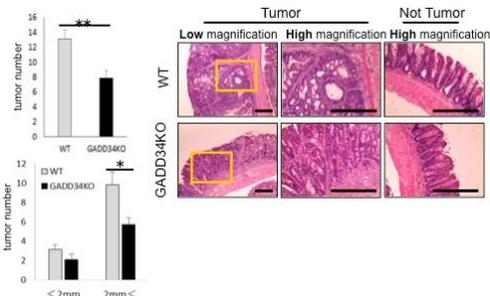


図7 AOM/DSS 投与による腫瘍形成

次に、DSS 投与による大腸炎誘導における GADD34 の機能を解析した。DSS 投与により、大腸において GADD34 の発現が増加することが確認された。GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、DSS 投与による大腸組織の損傷が抑制されており、また、大腸における炎症性サイトカイン IL-6、TNF の産生の低下がみられた(図8)。

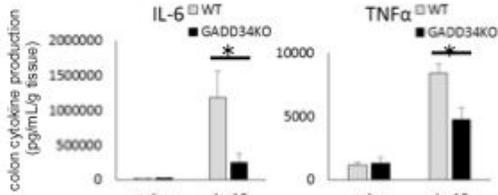


図8 DSS 投与後の大腸での炎症性サイトカイン産生

DSS 投与による大腸組織への免疫細胞浸潤について解析するために、大腸におけるケモカイン、ケモカインレセプターの発現を調べた。その結果、DSS によりマクロファージや好中球の誘引、活性化を引き起こす、MCP1、CXCL2、CXCR2、CSF3 の発現誘導がみられたが、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ有意に発現が抑制されていた(図9)。また、大腸組織の細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ、マクロファージと好中球の浸潤の抑制がみられた。

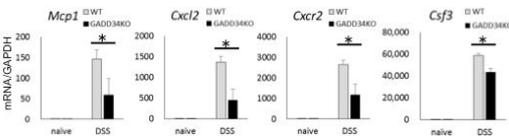


図9 DSS 投与後のケモカイン産生

DSS 投与により誘導される IL-6 は IL-6/STAT3 経路を活性化し、大腸癌の形成、増殖を促進することから、IL-6/STAT3 経路における GADD34 の関与について解析した。DSS 投与により IL-6/STAT3 経路の活性化がみられたが、GADD34KO マウスでは WT マウスに比べ STAT3 の活性化が抑制されていた(図10)。さらに、免疫組織染色の結果、DSS 処理により大腸上皮細胞の増殖がみられたが、GADD34 KO マウスでは WT マウスに比べ増殖が抑制されることが確認された。

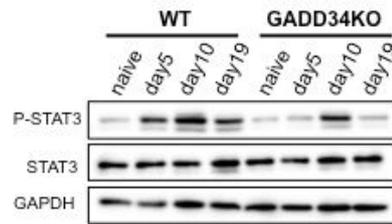


図10 DSS 投与後の STAT3 シグナルの活性化

以上の結果から、GADD34 は AOM/DSS による炎症関連大腸癌の形成、増殖を促進することが示された。GADD34 は DSS 投与により発現誘導され、大腸へのミエロイド系細胞の浸潤、炎症性サイトカイン産生、組織障害を促進し、また、IL-6/STAT3 経路の活性化を増強し、異常化した上皮細胞の増殖を促進することにより大腸癌形成を促進することが明らかとなった。

本研究により、GADD34 は炎症反応において様々な活性化シグナルに作用し、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方で、炎症誘導の違いにより GADD34 が作用する機序が異なることが示された。今後、さらに、炎症誘導の違いによる GADD34 の発現誘導の詳細なメカニズム、および作用機序を解明することにより、炎症性疾患の治療法の開発にもつながると考えられる。

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 12 件)

1. Liu L, Ito S, Nishio N, Sun Y, Tanaka Y, Isobe K. GADD34 Promotes Tumor Growth by Inducing Myeloid-derived Suppressor Cells. *Anticancer Res.* 36(9):4623-8. (2016) <http://ar.iiarjournals.org/content/36/9/4623.long>. 査読有

2. Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Okado S, Hori M, Isobe KI. GADD34 suppresses lipopolysaccharide-induced sepsis and tissue injury through the regulation of macrophage activation. *Cell Death Dis.* 12;7:e2219. (2016) doi:10.1038/cddis.2016.116. 査読有

3. Tanaka Y, Ito S, Isobe K. Vancomycin-sensitive bacteria trigger development of colitis-associated colon cancer by attracting neutrophils. *Sci Rep.* 6:23920. (2016) doi: 10.1038/srep23920. 査読有

4. Liu L, Ito S, Nishio N, Sun Y, Chen N, Tanaka Y, Isobe K. GADD34 Facilitates Cell Death Resulting from Proteasome Inhibition. *Anticancer Res.* 35

(10):5317-24.(2015)<http://ar.iiarjournals.org/content/35/10/5317.long> 査読有

5.Okabe M, Ito S, Nishio N, Tanaka Y, Isobe K. Thymic Epithelial Cells Induced from Pluripotent Stem Cells by a Three-Dimensional Spheroid Culture System Regenerates Functional T Cells in Nude Mice. *Cell Reprogram.* 17(5):368-75. (2015) doi: 10.1089/cell.2015.0006. 査読有

6. Tanaka Y, Ito S, Oshino R, Chen N, Nishio N, Isobe K. Effects of growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34) on inflammation-induced colon cancer in mice. *Br J Cancer.* 113(4):669-79. (2015) doi: 10.1038/bjc.2015.263. 査読有

7. Chen N, Nishio N, Ito S, Tanaka Y, Sun Y, Isobe K. Growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) enhanced liver inflammation and tumorigenesis in a diethylnitrosamine (DEN)-treated murine model. *Cancer Immunol Immunother.* 64(6):777-89. (2015) doi: 10.1007/s00262-015-1690-8. 査読有

8. Sun Y, Ito S, Nishio N, Tanaka Y, Chen N, Liu L, Isobe K. Enhancement of the acrolein-induced production of reactive oxygen species and lung injury by GADD34. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:170309. (2015) doi: 10.1155/2015/170309. 査読有

9. Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Aiba K, Thanasegaran S, Nishio N, Isobe K. GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. *Sci Rep.* 5:8327. (2015) doi: 10.1038/srep08327. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Ito S, Tanaka Y, Isobe K. GADD34 promotes colon carcinogenesis through upregulating IL-6-STAT3 signaling. 第 44 回日本免疫学会学術総会 2015 年
2. Tanaka Y, Ito S, Isobe K. Therapeutic effects of antibiotics on colitis and colon carcinogenesis in AOM/DSS-induced murine colitis-associated colon cancer model. 第 44 回日本免疫学会学術総会 2015 年
3. 田中ゆりこ、伊藤佐知子、磯部健一 ストレス応答遺伝子 GADD34 はマウス炎症関連大腸癌モデルにおいて炎症・発癌を促進する 第 38 回分子生物学会年会 2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 佐知子 (ITO Sachiko)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 70447845