

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15288

研究課題名(和文) 腸管上皮オートファジーによる粘膜免疫調節機構の解明

研究課題名(英文) Mucosal immune regulation by autophagy in intestinal epithelia

研究代表者

永石 宇司 (NAGASHI, TAKASHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60447464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は申請者がこれまで見出してきた「腸管粘膜の免疫恒常性は上皮細胞内のオートファジーと粘膜内リンパ球間における連鎖・協調によって制御される」という独自の概念や知見を基盤として、腸管上皮細胞と粘膜内T細胞あるいはB細胞とのクロストーク、およびそれによる粘膜内の特異的免疫調節機構における分子メカニズムについて着目している。その結果、当該研究期間に得られた成果から、生理的な条件下における腸管上皮細胞のオートファジー機能の阻害とともに蛋白分解系の異常が誘発されていることばかりでなく、その条件下において免疫学的異常も誘発されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：IBD is characterized by unrestrained lymphocyte activation that results in the production of a variety of pro-inflammatory cytokines and other mediators. Understanding the mechanisms of lymphocyte regulation is therefore of significant importance to dysregulated mucosal inflammation such as IBD. On the other hand, genome-wide association studies in the analysis of IBD have identified genetic risk foci. Especially, several studies have revealed the important roles of autophagy-related genes in IBD, including the suppression of inflammasome in hematopoietic cells and secretion of antimicrobial peptides in Paneth cells. In this regards, we have observed that a lack of autophagy function led to the up-regulated pro-inflammatory cytokines in vivo. Defining the mechanisms of autophagy-mediated T cell regulation will lead to a significant understanding of the manner in which manipulation of this function may provide insights into novel therapeutic methods for the treatment of IBD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 粘膜免疫 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細菌菌体や食餌抗原など腸管内腔の抗原物質に絶えず暴露される消化管粘膜において、「免疫寛容」の成立は局所ならびに全身の免疫学的恒常性維持に不可欠である。一方、この機構の破綻は種々の抗原への過剰で病的な免疫反応誘導を来し、クローン病など炎症性腸疾患 (IBD) の病態に深く関わってくる。

2. 研究の目的

本申請研究は申請者らがこれまで見出してきた「腸管粘膜の免疫恒常性は上皮細胞内のオートファジーと粘膜内リンパ球との連鎖・協調によって制御される」という独自の概念や知見を基盤として、腸管上皮細胞と粘膜内リンパ球とのクロストーク、およびそれによる粘膜内のサイトカイン分泌など免疫学的変動について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸上皮細胞特異的なオートファジーによる膜輸送、蛋白分解機能の解析

① 大腸上皮細胞株を用いたオートファジーによる生化学・細胞生物学的解析

② 大腸上皮特異的 Atg5 欠損マウスの表現型解析

(2) オートファジーによる腸管上皮細胞の免疫学的機能調節の解析

① 腸上皮オルガノイドを用いた上皮-リンパ球間クロストーク関連遺伝子発現解析

② 腸上皮オートファジー機能不全下における IBD モデルの作成とその生体イメージング解析

(3) オートファジーによる GALT 免疫調節ネットワーク関連分子制御機構の解析

4. 研究成果

本研究は申請者が独自に研究を展開してきた腸管上皮細胞内のオートファジー機能調節に注目し、腸管粘膜における免疫学的恒常性の維持におけるその作用意義について着目している。その結果、本研究では当該研究期間に以下のような成果が得られた。

(1) 野生型 C57BL6 マウスの大腸組織から上皮細胞を単離し、長期培養系を樹立させた。

(2) ここに阻害薬によってオートファジーを阻害しつつ、継代培養を継続できる条件を見出した。

(3) これらの培養上皮細胞から蛋白質を抽出し生化学的解析を行った結果、LC-3 II の発現が抑制されていることや p62 の発現が上昇していることを確認した。

(4) 一方、これらの培養上皮細胞にレトロウイルスベクター GFP-RV および DsRed-RV を用いて遺伝子を導入しつつ、継代培養を継続できる条件を確認した。

(5) さらに、マウスから単離した T 細胞を

上記の培養上皮細胞と共培養する条件を見出した。

(6) 野生型と同様に供与された C57BL6 バックグラウンド ATG5 欠損マウスの大腸組織から上皮細胞を単離し、長期培養系を樹立させることができた。

(7) この培養上皮細胞から蛋白質を抽出し生化学的解析を行った結果、やはり LC-3 II 発現の抑制、および p62 発現の上昇を確認した。

(8) またこれらの培養上皮細胞を共焦点顕微鏡下で観察した結果、LC-3 dots の形成不全とともにリソソームの凝集化などを観察した。

(9) また、ATG5 欠損マウスにおいて T 細胞が活性化されていることを見出した。

(10) さらに ATG5 欠損マウスに実験腸炎を誘発した結果、腸炎が重症化することを見出した。

これらの研究結果は生理的な条件下における腸管上皮細胞のオートファジー機能の阻害とともに蛋白分解系の異常が誘発されていることばかりでなく、その条件下において免疫学的異常も誘発されていることを示唆する。そしてこの機構が炎症性腸疾患の病態において治療標的になりうることが示唆された。さらに現在、このメカニズムが関連すると考えられる異種細胞間とのクロストークに着目し、その解析を進めている。今後はこの機構を介した免疫調節メカニズムを追求することによって、炎症性腸疾患に対する新規治療法開発の基盤に繋げることができると期待される。

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 7 件)

① Maeyashiki C, Nagaishi T, WatanabeM et al. (他 10 名, 9 番目, 13 番目), HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 484; 636-641, 2017 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.159. Epub 2017 Jan 30.

② Kobayashi M, Nagaishi T, WatanabeM, et al. (他 9 名, 8 番目, 12 番目) The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. **Sci Rep.** 6; 36780, 2016 査読有
DOI: 10.1038/srep36780

③ Ohtsuka K, Nagaishi T, WatanabeM, et al. (他 5 名, 7 番目, 8 番目) Magnetic resonance enterography for the evaluation of the deep small intestine in Crohn's disease. **Intest**

- Res.** 14; 120-126, 2016 査読有
DOI: 10.5217/ir.2016.14.2.120. Epub 2016 Apr 27.
- ④ Nagaishi T, Watanabe M, et al. (他 7 名, 1 番目, 9 番目) Epithelial NF- κ B activation in inflammatory bowel diseases and colitis-associated carcinogenesis. **Digestion**. 93; 40-6, 2016 査読有
DOI: 10.1159/000441670
- ⑤ Matsuzawa Y, Nagaishi T, Watanabe M, et al. (他 11 名, 9 番目, 14 番目) TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting mTOR and promoting autophagy. **Autophagy**. 11; in press, 2015 査読有
DOI: 10.1080/15548627.2015.1055439
- ⑥ Fukushima K, Nagaishi T, Watanabe M, et al. (他 13 名, 13 番目, 16 番目) Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor alpha induces high malignant potential in colon cancer cell line. **Cancer Sci**. 106; in press, 2015 査読有
DOI: 10.1111/cas.12703
- ⑦ Matsuzawa Y, Nagaishi T, Watanabe M, et al. (他 8 名, 7 番目, 11 番目) RIPK3 regulates p62-LC3 complex formation via the caspase-8-dependent cleavage of p62. **Biochem Biophys Res Commun**. 456; 298-304, 2015 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.075

[学会発表] (計 20 件)

- ① 渡部太郎、永石宇司、Jose, Nisha、東海有沙、細谷明德、小島裕大、安達貴弘、渡辺守。生体イメージングを用いた実験腸炎モデルにおける回盲部免疫応答の解析。第1回免疫学・病態生化学領域合同シンポジウム。2017.03.08. 東京医科歯科大学 (東京)
- ② 渡部太郎、永石宇司、Jose, Nisha、東海有沙、細谷明德、小島裕大、安達貴弘、渡辺守。IgAの欠損は回腸粘膜特異的な炎症を誘発する。第13回日本消化管学会総会学術集会。2017.02.17. 名古屋国際会議場 (愛知)
- ③ Taro Watabe, Takashi Nagaishi, Akinori Hosoya, Jose Nisha, Arisa Tokai, Yudai Kojima, Takahiro Adachi, Mamoru Watanabe. CRISPR/Cas9-mediated mutations in mouse IgA locus and its characterization. 第45回日本免疫学会学術集会。2016.12.05. Okinawa Convention Center (Okinawa)
- ④ Taro Watabe, Takashi Nagaishi, Arisa Tokai, Nisha Jose, Akinori Hosoya, Yudai Kojima, Motomi Yamazaki, Richard S. Blumberg, Mamoru Watanabe. CD66a regulation of BCR signaling in the activated B cells. Asian Pacific Digestive Disease. 2016.11.04. Kobe Convention Center (Hyogo)
- ⑤ Taro Watabe, Takashi Nagaishi, Masahiro Suzuki, Motomi Yamazaki, Michio Onizawa, Nisha Jose, Arisa Tokai, Akinori Hosoya, Y

- udai Kojima, Mamoru Watanabe. Type 2 TNF receptor signaling in colonic epithelia may be involved in the development of colitis-associated carcinogenesis. Asian Pacific Digestive Disease. 2016.11.03. Kobe Convention Center (Hyogo)
- ⑥ Akinori Hosoya, Takashi Nagaishi, Arisa Tokai, Taro Watabe, Nisha Jose, Yudai Kojima, Motomi Yamazaki, Richard S. Blumberg, Mamoru Watanabe. CEACAM1 regulation of BCR signaling in the activated B cells. United European Gastroenterology Week. 2016.10.19. Austria Center Vienna, Vienna (Austria)
- ⑦ 東海有沙、永石宇司、渡部太郎、Jose, Nisha、細谷明德、小島裕大、渡辺守。CEACAM1によるB細胞受容体シグナルの抑制。第44回日本臨床免疫学会総会。2016.09.09. 京王プラザホテル (東京)
- ⑧ Takashi Nagaishi, Arisa Tokai, Taro Watabe, Nisha Jose, Akinori Hosoya, Motomi Yamazaki, Richard S. Blumberg, Mamoru Watanabe. BCR signaling in the activated B cells may be regulated by CEACAM1. Mucosal Immunology Course and Symposium. 2016.07.29. Westin Harbour Castle Hotel, Toronto (Canada)
- ⑨ Taro Watabe, Takashi Nagaishi, Arisa Tokai, Akinori Hosoya, Nisha Jose, Yudai Kojima, Motomi Yamazaki, Richard S. Blumberg, Mamoru Watanabe. BCR signaling in the activated B cells may be regulated by CD66a. The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. 2016.07.08-07.09. Kyoto International Convention Center (Kyoto)
- ⑩ Arisa Tokai, Takashi Nagaishi, Taro Watabe, Nisha Jose, Akinori Hosoya, Motomi Yamazaki, Michio Onizawa, Richard S. Blumberg, Mamoru Watanabe. Activated B cell receptor signaling may be regulated by CEACAM1. Federation of Clinical Immunology Societies. 2016.06.23. Seaport Hotel & World Trade Center, Boston (U.S.A.)
- ⑪ Arisa Tokai, Takashi Nagaishi, Taro Watabe, Nisha Jose, Akinori Hosoya, Motomi Yamazaki, Richard S. Blumberg, Mamoru Watanabe. CEACAM1 may regulate BCR signaling in the activated B cells. Digestive Disease Week/ Annual Meeting of American Gastroenterology Association. 2016.05.21. San Diego Convention Center, San Diego (U.S.A.)
- ⑫ 渡部太郎、永石宇司、Jose Nisha、東海有沙、細谷明德、安達貴弘、渡辺守。生体イメージングを用いたIBDモデルにおける回盲部免疫応答の解析。第102回日本消化器病学会総会。2016.04.23. 京王プラザホテル (東京)
- ⑬ Tokai A, Nagaishi T, Watanabe M, et al. CD66a may regulate BCR signaling in the

activated B cells. 第44回日本免疫学会学術集会. 2015.11.20. Sapporo Convention Center (Hokkaido)

⑭ Watabe T, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Epithelial TNFR2 signaling in the setting of IBD may be involved in the development of colitis-associated carcinogenesis. United European Gastroenterology Week. 2015.10.28. Gran Via Venue, Barcelona (Spain)

⑮ 細谷明德、永石宇司、渡辺守、他. 腸管上皮細胞におけるTNFR2シグナルはIBD合併大腸癌の発生を促進させる. 第43回日本臨床免疫学会総会. 2015.10.22. 神戸国際会議場 (兵庫)

⑯ Watabe T, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Type 2 TNF receptor signaling in the epithelia may be involved in the development of colitis-associated carcinogenesis. 第74回日本癌学会学術総会. 2015.10.8. Nagoya International Convention Center (Aichi)

⑰ Watabe T, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Epithelial type 2 TNF receptor-specific signaling in the development of colitis-associated carcinogenesis. International Congress of Mucosal Immunology. 2015.7.16. Maritim Hotel, Berlin (Germany)

⑱ Hosoya A, Nagaishi T, Watanabe M, et al. TNFR2 signaling in colonic epithelia may be involved in the development of colitis-associated carcinogenesis. The 3rd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. 2015.06.20. China World Hotel, Beijing (China)

⑲ Nagaishi T, Watanabe M et al. Epithelial NF-κB activation via TNF signaling may be involved in the development of colitis-associated carcinogenesis. Digestive Disease Week/ Annual Meeting of American Gastroenterology Association. 2015.05.18. Walter E. Washington Convention Center, Washington DC (U.S.A.)

⑳ 永石宇司、渡部太郎、渡辺守、他. 大腸上皮細胞特異的なTNFシグナルによるIBD合併大腸癌発生機構の解析. 第11回日本消化管学会総会学術集会. 2015.02.13. 京王プラザホテル (東京)

[図書] (計 1 件)

① Takashi Nagaishi and Mamoru Watanabe. Springer, Daniel C. Baumgart ed. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach, Second Edition: Paradigm of T cell differentiation in IBD. pp141-148, 2017

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 炎症性腸疾患の治療方法およびそれに用いるための医薬組成物

発明者: 永石宇司、渡辺守、久場敬司

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学

種類: 特願

番号: 2016-234062

出願年月日: 平成26年12月1日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

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

<http://www.tmd.ac.jp/grad/gast/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永石 宇司 (NAGAISHI, Takashi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・

消化器内科・助教

研究者番号: 60447464

(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

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

山崎 元美 (YAMAZAKI, Motomi)

鬼澤 道夫 (ONIZAWA, Michio)

鈴木 雅博 (SUZUKI, Masahiro)

渡部 太郎 (WATABE, Taro)

細谷 明德 (HOSOYA, Akinori)

津川 直也 (TSUGAWA, Naoya)

Nisha Jose (JOSE, Nisha)

小島 裕大 (KOJIMA, Yudai)

東海 有沙 (TOKAI, Arisa)

柘植 直人 (TSUGE, Naoto)