

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10632

研究課題名(和文) Atg5非依存的オートファジー誘導活性化化合物のマウス腸炎モデルに対する効果の検討

研究課題名(英文) The effects of Atg5-independent autophagy activator on DSS-induced colitis in mice

研究代表者

松田 宙 (Matsuda, Chu)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00379207

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)：オートファジーの減弱は、過剰な炎症応答を介して腸管炎症に影響することが知られ、オートファジー誘導が腸炎緩和に寄与するとの報告がある。そこで、天然成分ライブラリよりオートファジー活性化物質をスクリーニングした内、腸管炎症緩和効果を有する3物質を同定した。最も活性の高かったサンプルAでは、腸管マクロファージにおいて、オートファジーの誘導を介した炎症性並びに抗炎症性サイトカインの産生調整が腸炎緩和に寄与したことを確認した。さらには、サンプルAに含まれるエラグ酸、ガリル酸、カテキン酸といったタンニン類がオートファジー誘導を介した腸炎緩和に主要な役割を担うことが示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管に慢性的な炎症を呈することで知られる炎症性腸疾患(IBD)は、未だ発症原因が明らかではなく、発症原因の解明と、それに対応した治療法の開発が求められている。本検討では、オートファジーの誘導が、マクロファージにおけるサイトカイン産生調整を介して、腸炎緩和に寄与することを示唆する結果を得た。同定サンプルAは今後、ヒトサンプルを用いた解析、並びに安全性検討を経て、炎症性腸疾患の新規治療薬候補となり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Disturbed activation of autophagy is implicated in the pathogenesis of colitis via excessive immune response. We screened the autophagy activators from a library including natural extracts using a high-throughput assay system. The extracts identified as autophagy activators were administered to mice with 2% dextran sodium sulfate (DSS). Among the autophagy inducers, 3 compounds suppressed DSS-induced colitis. Among three, sample A ameliorate DSS-induced colitis by providing intestinal macrophage with anti-inflammatory profiles via promotion of Atg7-dependent autophagy. Furthermore, our results indicated that a mixture of tannins including ellagic acid, gallic acid and catechin acid have important role on colitis amelioration via autophagy activation in macrophage.

研究分野：オートファジー、粘膜免疫、炎症性腸疾患、下部消化管

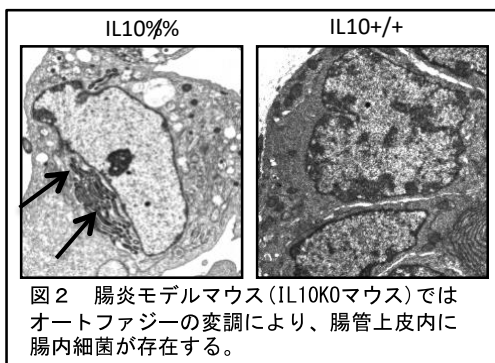
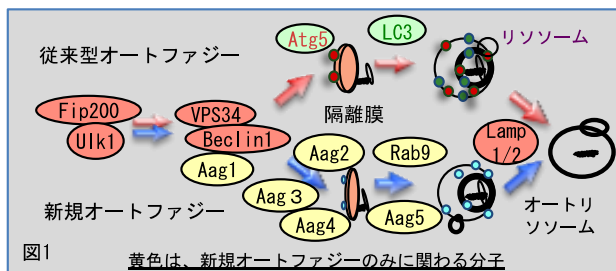
キーワード：オートファジー 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患である炎症性腸疾患は消化管に原因不明の炎症をおこす慢性疾患の総称で、潰瘍性大腸炎、クローン病の2疾患からなる。本邦における患者数は近年増加を続けており、若年者に発症することが多く長期にわたって治療が必要となるため、Quality of Life (QOL) を低下させる。2000年代に入り、生物学的製剤など画期的な新規治療法が登場し、患者のQOLは向上している。しかし、長期にわたって治療を継続する上で、効果減弱や高額な治療費などが問題となっている。また、免疫反応を調整することによる有害事象なども解決が必要な課題である。

この様な課題を克服するために、申請者はオートファジーに着目した。オートファジーとは、細胞内の老廃物や病的な細胞構成成分を分解する機構であり、この機構が活性化すれば、新陳代謝が促され細胞の健全性が維持される。一方、オートファジー活性が低下すると老廃物の蓄積などによって細胞の機能異常が生じる。GWAS解析によって *Atg16L1* 遺伝子の変異が、クローン病のリスクファクターであることが示されてから、炎症性腸疾患における通常型オートファジーの役割が注目されている (Hampe J. et al., Nat Genet, 2007, Travassos LH. et al., Nat Immunol, 2010)。一方、オートファジーには、通常型のオートファジー (Atg5 依存的) の他に、研究分担者が世界に先駆けて発見した Atg5 非依存的オートファジーが存在する (図1: Nature, 2009)。後者のオートファジーは、赤血球の分化や皮膚の分化、加齢との関連など、その多彩な生理的、病理的役割に急速な注目が集まっている。

Atg5 非依存的オートファジーは新しく見つかった細胞機能であるため、炎症性腸疾患との関連に関する報告は極めて少ない。しかしながら、① Atg5 非依存的オートファジー実行遺伝子のうち2種類が、GWASで同定された71種類のクローン病のリスク遺伝子 (Nature Genet, 2010) に含まれていること、② IL10 欠損マウスの腸管上皮細胞では、Atg5 非依存的オートファジーの活性が低下しており、上皮に侵入した腸内細菌の駆除ができないこと (図2)、③ Atg5 非依存的オートファジー誘導化合物 TMD-#29 を投与すると、ゼノファジーが亢進し、腸炎が緩和すること (図3)、を見出している。これらの知見は、Atg5 非依存的オートファジーの機能低下が、炎症性腸疾患の一因もしくは増悪因子となっていることを示している。上述した科学的知見より、従来型オートファジーならびに新規オートファジーを協調して活性化できる天然物を持続慢性的に摂取することにより、炎症性腸疾患の寛解期の長期化、症状の軽症化を図ることが期待できる。なお、申請者らは、これまでに約4,000種の天然物の中から強いオートファジー誘導活性のある天然物33種類を選定している。



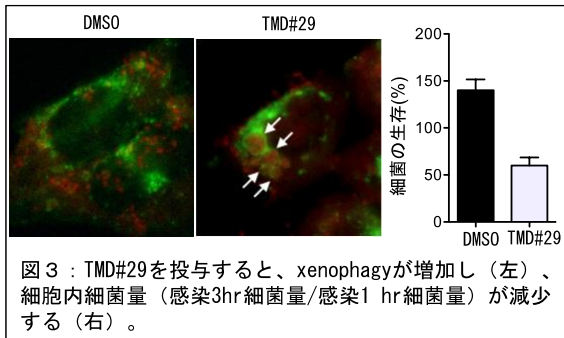


図3 : TMD#29を投与すると、xenophagyが増加し(左)、細胞内細菌量(感染3hr細菌量/感染1 hr細菌量)が減少する(右)。

2. 研究の目的

Atg5 非依存的オートファジー誘導化合物による腸炎治療効果の確認およびそのメカニズム解明

3. 研究の方法

3922 種類の天然成分ライブラリより、MEF 細胞におけるオートファゴソームの集積を指標に、High throughput assay を用いて、オートファジーを誘導する化合物のスクリーニングを実施、33 種類を同定した。それら成分について、2%デキストラン硫酸ナトリウムにより腸炎を誘導する薬剤誘導性腸炎モデルマウス (DSS マウス) に投与し、炎症緩和能 (体重減少抑制、腸管長の短縮抑制、組織における炎症細胞浸潤抑制など) の検討を実施した。オートファジー誘導、腸炎緩和の有効性について、腸管上皮細胞並びに腸管マクロファージ (Mφ) に分けて検討を行った。

まず、腸管上皮細胞におけるオートファジー誘導については、Caco2 細胞並びに野生型マウスより採取した腸管上皮細胞における発現を、オートファジー検出キット (CYTO-ID) を用いて検討した。さらに、通常型オートファジーにおいて必須とされる *Atg7* を腸管上皮特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトモデルマウス *Villin-cre; Atg7^{IEC}* を用いて、オートファジー誘導が腸炎緩和に及ぼす影響について検討した。

続いて、MφにおけるサンプルAのオートファジー誘導能について、腸管上皮細胞同様、マウス骨髄から分化・培養した骨髄由来 Mφ (BMMF)、腸管の粘膜固有層から単離した CD11b⁺細胞を用いて検討を行った。さらに、*Atg7* を単球・Mφ 特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトモデルマウス *LysM-cre; Atg7^{LysM}* を用いて、オートファジー誘導が腸炎緩和に及ぼす影響について検討した。さらに、Mφにおけるサイトカインの発現について、qRT-PCR にて確認を行った。

また、サンプルAに含有される複数の成分についても、同様の検討を実施した。

4. 研究成果

3922 種類の天然成分ライブラリより、High throughput assay を用いたオートファジー誘導物質のスクリーニングにより 33 種類のオートファジー誘導物質を同定した。さらに、活性の強い順に腸炎モデルマウスに投与したところ、3 種類の腸炎緩和能を有する物質の同定に成功した。これらのうち、最も活性の強かった、生薬由来サンプルAを用いて、続くメカニズム解析を実施した。

野生型の DSS 誘導腸炎マウスにおいて、同定されたサンプルAの投与により、体重減少抑制、腸管長短縮抑制、炎症細胞浸潤の抑制を認め、著明な腸炎緩和効果を示した。さらに、炎症時の腸管上皮細胞においてオートファジーの減弱が認められたが、サンプルAの投与により、減弱したオートファジーの亢進を確認した。そこで、腸管上皮特異的にオートファジー (*Atg7*) を欠損させたマウス (*Atg7^{IEC}* マウス) にサンプルAを投与し、腸管上皮におけるオートファジーの活性化が腸炎緩和に及ぼす影響について検討した。その結果、*Atg7^{IEC}* マウスにおいてサンプルAの腸炎緩和効果は消失せず、野生型同等の有効性を認めた。

そこで次に、腸管 Mφ、および骨髄由来マクロファージ (BMMF) において、サンプルA投与によるオートファジー誘導能を検討した。まず、BMMF においてサンプルAの投与はオートファジーを誘導した。そこで、Mφでオートファジー (*Atg7*) を欠損するマウス (*Atg7^{LysM-cre}* マウス) にサンプルAを投与したところ、サンプルA投与による腸炎緩和効果が消失した。よって、Mφにおけるオートファジー誘導が、腸炎緩和に寄与したと考えられた。

続いて、Mφにおけるサイトカイン産生についても検討した。その結果、野生型マウスにおいて、サンプルA投与による炎症性サイトカインの発現低下、抗炎症性サイトカイン並びに M2Mφ マーカーの発現増加を認めた。対照的に、*Atg7^{LysM-cre}* マウスにおいては、サンプルA投与による変化が消失した。

以上のことより、サンプルA投与によるオートファジー誘導のうち、腸管上皮細胞におけるオートファジー誘導が腸炎緩和に及ぼす影響は限定的であり、Mφにおけるオートファジー誘導が腸炎緩和に寄与したものと考えられる。

さらに、サンプル A に含まれる成分のうち、主要成分 4 種類について、オートファジー誘導能及び腸炎緩和能を検討した。4 種類のうち、タンニン類 3 種においては、BMMF への添加でオートファジー誘導を確認した。さらに、野生型並びに、*Atg7^{LysM-cre}* マウスにおいて、それら有効成分の混合物は、サンプル A 同様の有効性を示した。

よって、オートファジー誘導化合物として同定されたサンプル A は、M ϕ におけるオートファジー誘導を介して、炎症性および抗炎症性サイトカインの産生調整を介して、腸炎を緩和した。

また、サンプル A の安全性について検討したところ、主要臓器（心臓、腎臓、肝臓、脾臓）において、投与による他臓器毒性は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asuka Yasueda, Hisako Kayama, Michiko Murohashi, Junichi Nishimura, Koji Wakame, Ken-ichi Komatsu, Takayuki Ogino, Norikatsu Miyoshi, Hidekazu Takahashi, Mamoru Uemura, Chu Matsuda, Toru Kitagawa, Kiyoshi Takeda, Toshinori Ito, Yuichiro Doki, Hidetoshi Eguchi, Shigeomi Shimizu and Tsunekazu Mizushima,	4. 巻 in press
2. 論文標題 Sanguisorba officinalis L. derived from herbal medicine prevents intestinal inflammation by inducing autophagy in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Asuka Yasueda, Shigeomi Shimizu, Junichi Nishimura, Michiko Murohashi, Takayuki Ogino, Yoshifumi Watanabe, Koji Wakame, Ken-ichi Komatsu, Norikatsu Miyoshi, Hidekazu Takahashi, Mamoru Uemura, Chu Matsuda, Tsunekazu Mizushima, Masaki Mori, Yuichiro Doki,
2. 発表標題 Autophagy induction of epithelium alleviate colitis in DSS model mice
3. 学会等名 UEG WEEK 2019 Barcelona (Spain), Oct., 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安枝明日香, 荻野崇之, 清水重臣, 西村潤一, 室橋道子, 渡部嘉文, 三吉範克, 高橋秀和, 原口直紹, 畑泰司, 松田宙, 水島恒和, 森正樹, 土岐祐一郎
2. 発表標題 オートファジー誘導物質による薬剤誘導性腸炎緩和効果の検討
3. 学会等名 第56回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水島 恒和 (Mizushima Tsunekazu) (00527707)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	
研究分担者	西村 潤一 (Nishimura Junichi) (20379209)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・その他部局等・消化器外科副部長 (84409)	
研究分担者	清水 重臣 (Shimizu Shigeomi) (70271020)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	