

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17426

研究課題名（和文）腸炎の病態形成における新規オートファジー関連分子の役割

研究課題名（英文）The role of alternative-autophagy related proteins in pathophysiology of colitis

研究代表者

仁部 洋一（Nibe, Yoichi）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：30793351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新規オートファジーは、既知のオートファジーとは全く異なる分解機構である。これに関連するユビキチンリガーゼTRIM31の腸管上皮における機能解析を行った。まず、新規オートファジーで分解される基質標識としてのユビキチンの関与と、それをオートファジーに誘導するアダプター分子候補を同定した。次に、Trim31欠損マウスにおいて、DSS腸炎が増悪することを確認した。さらに、Trim31欠損マウス小腸上皮Organoidに対するLPS刺激下で、Ikbの分解遅延が示唆された。この経路において、Trim31でユビキチン化される新規オートファジーの分解基質の蓄積が、腸炎の病態形成に関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規オートファジーは申請者らの研究室から提唱された新しい概念であり、世界に主導的な立場で、様々な解析系やツールを用いた解析を進めている。ユビキチンを介して、新規オートファジーとその疾患における役割を解明しようとする試みは、独自のユビキチン解析と、新規オートファジー解析系を同時に有する申請者によるのみ遂行可能な研究である。本研究では、新規オートファジーの基質標識としてのユビキチン化の異常が、腸管炎症に関与することを示している。今後、ユビキチン化の関与する部位を特定することで同部位をターゲットとした創薬への応用など、ベッドサイドに直結する新たな知見の提供が期待される、社会的意義の大きな成果である。

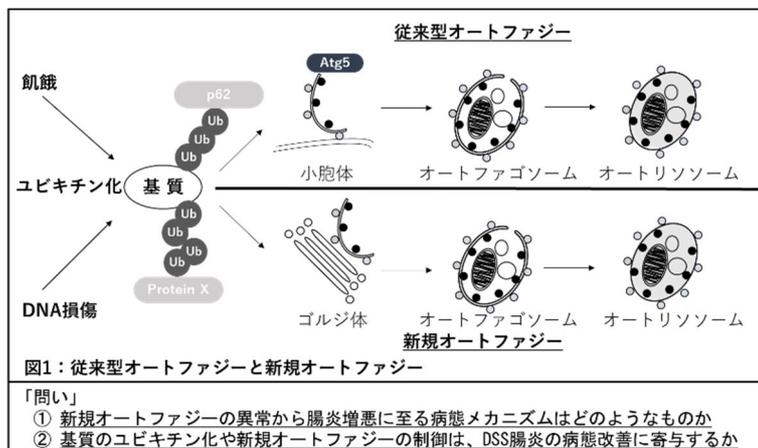
研究成果の概要（英文）：Alternative autophagy is a degradation mechanism that is completely different from conventional autophagy. Functional analysis of the ubiquitin ligase TRIM31 in the intestinal epithelium was performed. First, we identified the involvement of ubiquitin as a substrate label that is degraded by alternative autophagy and the candidate adapter molecules that induce it in autophagy. Next, it was confirmed that DSS colitis was exacerbated in Trim31-deficient mice. Furthermore, it was suggested that Ikb degradation was delayed under LPS stimulation of Trim31-deficient mouse small intestinal epithelial organoids. In this pathway, the accumulation of substrates those are ubiquitinated by Trim31 and degraded by alternative autophagy possibly be involved in the pathogenesis of colitis.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：ユビキチン 炎症性腸疾患 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内小器官やタンパク質などの自己構成成分を分解するシステムである。GWAS 解析によって ATG16L1 や IRGM といったオートファジー関連遺伝子の変異が、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意義が注目され



ている。オートファジーの機能は、特定の基質の選択的分解が主と理解されている。即ち、様々な状況において、オートファジーが何をどのように分解しているか、が生体にとって重要な意味を持つのである。従って、オートファジーによって分解される分子、ならびに分解基質の認識機構を明らかにすることは、生体でのオートファジー機能を理解する上で最も重要なことである。申請者のグループは通常の経路とは全く異なるオートファジー経路（新規オートファジー）を発見した。しかしながら、この新規オートファジーの基質認識機構及び、その病態生理学的意義も明らかではない。(1)申請者らのグループは、ユビキチンリガーゼ TRIM31 が新規オートファジーと関連していることを見出し、(2) Trim 31 Knock out マウスで DSS 腸炎が増悪することが報告された。すなわち、新規オートファジーの異常が腸炎の増悪に関連することが示唆されたのである。これらの知見に立脚して研究目的となる2つの「問い」を提起した(図1)。

2. 研究の目的

「新規オートファジーの異常から腸炎増悪に至る病態メカニズム」

「基質のユビキチン化や新規オートファジーの制御による DSS 腸炎の病態変化」

を明らかにする。

3. 研究の方法

Trim31 欠損マウスにおける、DSS 腸炎の病態を解析

Trim31 欠損マウスの腸管上皮オルガノイドを作成し、オートファジーの異常を検討

Trim31 欠損マウスの腸管上皮オルガノイドにおける、炎症増悪メカニズムの同定

Trim31 でユビキチン化された基質の認識タンパク質の同定

新規オートファジーで分解される基質を同定

4. 研究成果

Trim31 欠損マウスにおける、DSS 腸炎の病態を解析

Trim31 欠損マウスに DSS 腸炎を誘導し、腸管上皮細胞・リンパ球の変化や炎症・細胞死・新規オートファジーを解析した。Trim31 の発現は、腸管上皮に強く認められ、リンパ球での発現は少ないことが知られている。Trim31 欠損マウスに DSS 腸炎を誘発すると、明らかに病勢が増悪することが確認された(図2)。



## Trim31 欠損マウスの腸管上皮オルガノイドを作成し、オートファジーの異常を検討

Trim31 欠損マウスから、小腸上皮オルガノイドを作成したが、培養や継代・分化において明らかな違いは認めなかった。次に、申請者らの研究室にて作成した Autophagy を可視化する DAL-Green で染色した(図3)。Organoid の Autophagy をリアルタイムに解析する実験は新しい知見であり、今後定量的解析を進めていく。

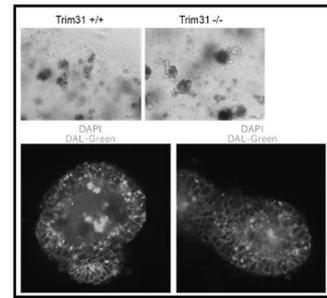


図3: Trim31欠損小腸OrganoidとDAL-Green染色

## Trim31 欠損マウスの腸管上皮オルガノイドにおける、炎症増悪メカニズムの同定

Trim31 欠損マウス小腸上皮オルガノイドに対して、DSS 腸炎の病態における刺激の一つと考えられる LPS を添加し、Western Blot にて関連する分子の変化を解析した。すると、野生型マウスに比べて Ikb の分解遅延が起こっていることが示唆された(図4) また、Trim31 欠損マウスから作成した腸管上皮オルガノイドでは、炎症性腸疾患の病勢マーカーである LRG1 の発現が亢進していた(図5)。これを踏まえ、LRG1 を Output とした腸管上皮オルガノイドによる薬剤スクリーニング系を作成する。これを利用して、ユビキチン化や新規オートファジーを調節する化合物ライブラリから、炎症性腸疾患に対する創薬への応用が期待される。

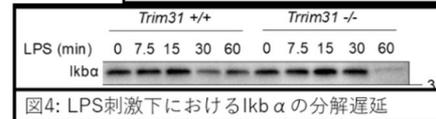


図4: LPS刺激下におけるIkbαの分解遅延

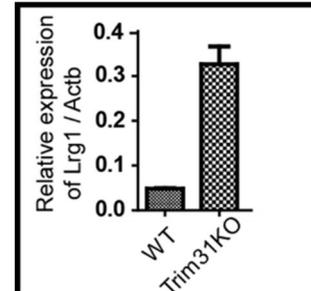


図5: Trim31KO腸管上皮OrganoidでLrg1の発現上昇

## Trim31 でユビキチン化された基質の認識タンパク質の同定

ユビキチン鎖のオートファジー関連デコーダータンパク質として、5種類 (p62, OPTN, TAX1BP1, NDP52, NBR1) が知られている。この内、p62 は新規オートファジーでは使われることはない。5種類のデコーダータンパク質すべてを欠損した HeLa 細胞 (Lazarou et. al. Nature) においては、DNA 損傷による新規オートファジーが観察されなかった。即ち、4分子の中に、デコーダータンパク質が含まれるものと考えられた。実際に新規オートファジーの基質 VSVG-GFP に結合する Optineulin (OPTN)の関与が疑われた(図6)。

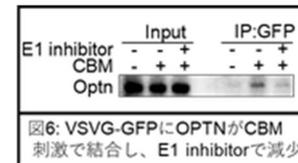


図6: VSVG-GFPにOPTNがCBM刺激で結合し、E1 inhibitorで減少

## 新規オートファジーで分解される基質を同定

申請者は、ユビキチン-オートファジー系の解析経験があり、これを応用して、ユビキチン鎖と基質を同時にかつ効率的に結合し、免疫沈降する系を構築した。(図7)。今後は、これを恒常的に発現する系を作成し、Trim31 にユビキチン化され、新規オートファジーによって分解される、DSS 腸炎増悪の原因となりうる基質を同定する。

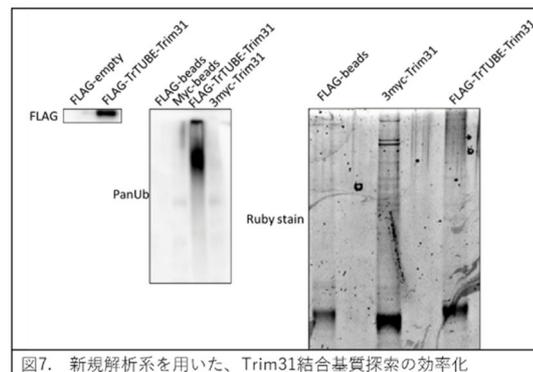


図7. 新規解析系を用いた、Trim31結合基質探索の効率化

以上のように、Trim31 でユビキチン化され、それをオートファジーに誘導するアダプター分子候補を同定した。さらに、Trim31 欠損 Organoid では LPS 刺激下で、Trim31 でユビキチン化されるはずであった新規オートファジーの基質の蓄積が、腸炎の病態形成に関与する可能性が考えられた。今後も基質を探索し、また、LRG-1 を指標とした Drug screening により、新規オートファジーが関与する炎症メカニズムの解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Otsubo Kana, Maeyashiki Chiaki, Nibe Yoichi, Tamura Akiko, Aonuma Emi, Matsuda Hiroki, Kobayashi Masanori, Onizawa Michio, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Torii Satoru, Itakura Eisuke, Watanabe Mamoru, Oshima Shigeru	4. 巻 594
2. 論文標題 Receptor Interacting Protein Kinase 3 (RIPK3) inhibits autophagic flux during necroptosis in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1586 ~ 1595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13748	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 -

1. 著者名 Aonuma Emi, Tamura Akiko, Matsuda Hiroki, Asakawa Takehito, Sakamaki Yuriko, Otsubo Kana, Nibe Yoichi, Onizawa Michio, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Uo Motohiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi, Oshima Shigeru	4. 巻 542
2. 論文標題 Nickel ions attenuate autophagy flux and induce transglutaminase 2 (TG2) mediated post-translational modification of SQSTM1/p62	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 17 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.023	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------