

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17486

研究課題名（和文）PAR6Bを介した新たな防御機構の解明と炎症性腸疾患への治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of a novel defense mechanism mediated by PAR6B and its therapeutic application to inflammatory bowel disease

研究代表者

前田 啓子（Maeda, Keiko）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00830291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腸管上皮細胞は、病原体などの外来抗原に常に曝されており、独自の外来抗原認識機構や防御機構を備えている。本研究では、PAR6Bを介した腸管上皮細胞の防御機構がどのようなシグナルにより誘導されるかを明らかにした。さらに腸管上皮細胞特異的PAR6B欠損マウスを作製し、PAR6Bの機能解析を行った。腸管上皮細胞特異的PAR6B欠損マウスは杯細胞の数の減少や腸炎の増悪を認めており、杯細胞の分化や腸管炎症の制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管上皮細胞がどのように病原体を認識して、感染を防御するかは不明な点が多かった。本研究において、腸管上皮細胞が、病原体の細胞膜の糖脂質への結合を感知して、感染を防御することを発見した。病原体が細胞膜に結合すると、PAR6B/aPKC/Cdc42複合体の分解が誘導され、エンドソームの機能を阻害することにより、病原体の細胞内への侵入を阻止するという感染防御機構を同定した。この機構は、腸管感染症や炎症性腸疾患の病態に関与しており、本研究結果は、病態の解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Intestinal epithelial cells are constantly exposed to foreign antigens such as pathogens and have their own antigen recognition and defense mechanisms. In this study, we investigated what kind of signals induce PAR6B-mediated defense mechanisms in intestinal epithelial cells. Furthermore, we generated intestinal epithelial cell-specific PAR6B-deficient mice and analyzed the function of PAR6B. Intestinal epithelial cell-specific PAR6B-deficient mice showed decreased goblet cell number and exacerbated intestinal inflammation, suggesting that PAR6B is involved in goblet cell differentiation and regulation of intestinal inflammation.

Translated with [www.DeepL.com/Translator](http://www.DeepL.com/Translator) (free version)

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 腸管上皮細胞 防御機構

## 1. 研究開始当初の背景

腸管上皮細胞は、粘液や抗菌ペプチドの産生、タイトジャンクションの形成により、粘膜バリアを形成する。粘膜バリアの破綻は、腸管透過性を亢進させ、病原体や腸内細菌の侵入を容易にし、腸管感染症、炎症性腸疾患 (IBD) の進展に關与する。研究代表者は、腸管上皮細胞が PAR6B を介して、病原体のエンドサイトーシスを阻害し、病原体の侵入を食い止めるという新たな防御メカニズムを見出した。さらに、PAR6B が病原体のみでなく、腸内細菌の認識や識別にも關与し、腸管恒常性を保つ機能があると考えている。しかしながら、どのようなシグナルが PAR6B の分解を誘導するかは不明な点が多く、腸管感染症、IBD の病態との關連も不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PAR6B を介した腸管上皮細胞の防御機構の機序を解明し、IBD との關連を明らかにすることである。そのため (1) PAR6B の分解を誘導するシグナルの同定、(2) PAR6B 遺伝子欠損マウス、IBD モデルマウスの機能解析による、PAR6B を介した防御機構の機能解析、(3) IBD 患者における PAR6B の発現様式と予後、重症度の相關解析を行い、PAR6B の機能と IBD の病態との關連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)- PAR6B の分解を誘導するシグナルの同定

PAR6B の分解を誘導するシグナルは、これまでの検討から、病原体のレセプターであるスフィンゴ糖脂質との結合、PAR6B の結合蛋白である Cdc42 の活性化を考えた。スフィンゴ糖脂質をレセプターとする志賀毒素、コレラ毒素をヒトの腸管上皮細胞株 (Caco-2 細胞) に投与し、PAR6B の分解が誘導されるかをウエスタンブロットで解析した。Cdc42 に関しては、ロタウイルスまたはコレラ毒素が、Cdc42 の活性化を誘導するかを検討し、Cdc42 阻害剤により、PAR6B の分解が阻害されるかを検証した。

### (1)- 病原体に対する阻害効果の検討

PAR6B の分解誘導により、その後の別の病原体の侵入を阻害するかを解析した。Caco-2 細胞にロタウイルスを感染させたあと、センダイウイルスを感染させ、Caco-2 細胞のセンダイウイルスの発現量を定量 PCR で測定を行った。また、コレラ毒素を先に感染させ、その後ロタウイルスを加え、Caco-2 細胞でのロタウイルス量を測定した。

### (2)- PAR6B の腸管上皮における機能解析

腸管における PAR6B の機能を解析するため、腸管上皮細胞特異的な PAR6B コンディショナルノックアウトマウスを作製した。PAR6B flox マウスと腸管上皮細胞特異的に Cre を発現する Villin-Cre Tg マウスの交配を行い、腸管上皮細胞特異的 PAR6B 欠損マウスを樹立した。腸管長の計測、病理学的評価、エンドソームの形態、タイトジャンクション構成分子の発現、局在を評価した。腸管透過性への影響を FITC-Dextran 試験、ZO-1 の免疫染色で評価した。小腸、大腸の上皮細胞を単離し、遺伝子発現を RNAseq で解析する。

(2)- 腸管上皮細胞特異的 PARD6B 欠損マウスにデキストランナトリウム (DSS) で腸炎を誘導し、野生型マウスと比較検討を行う。

腸管上皮細胞特異的 PARD6B 欠損マウスに DSS を用いて腸炎を誘導し、IBD の病態と関連するかを検証した。腸炎活動性スコア、体重減少率で腸炎の重症度を評価した。さらに、関与する分子や腸内細菌を検討するため腸管上皮の RNAseq や腸内細菌を解析し、野生型マウスと比較検討する。腸炎の重症度、タイトジャンクション、エンドソームの解析は上記の項目で評価する。

(3) ヒト検体での PARD6B の発現と重症度との相関

潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の内視鏡下生検検体を用いて、PARD6B の発現様式と重症度、予後との相関を統計学的に解析し、活動性マーカー、予後予測マーカーとなりうるかを検討する。

4. 研究成果

(1) スフィンゴ糖脂質をレセプターとする志賀毒素、コレラ毒素をヒトの腸管上皮細胞株に投与し、PARD6B の分解が誘導されるかをウエスタンブロッティングで解析したところ、ロタウィルスと同様にこれらの毒素も PARD6B と aPKC の分解を誘導することが分かった。PARD6B の mRNA の発現量は変わらず、プロテオソームインヒビター (MG132) の投与により、分解誘導が阻害されることから、プロテオソーム依存性の経路によることが同定できた。さらに、糖脂質と結合しない変異体のコレラ毒素を感染させたところ、PARD6B の分解は誘導されなかった。その上、サルモネラ菌や腸管出血性大腸菌の感染では、PARD6B の分解は誘導されなかったことから、細胞膜の糖脂質への結合が、PARD6B の分解を誘導することが示唆された。また、PARD6B は Cdc42 のエフェクターであることが知られており、ロタウィルスやコレラ毒素が Cdc42 の活性化を誘導することは複数報告されている。Cdc42 の阻害剤を加えたところ、PARD6B の分解誘導が阻害されることから、Cdc42 の活性化がシグナル伝達に関与している可能性があると考えられた。

(2) PARD6B flox マウスと Villin-Cre Tg マウスを掛け合わせるにより腸管上皮細胞特異的 PARD6B を欠損するマウスの作製を行った。遺伝子型を調べた結果、PARD6B<sup>flox/flox</sup> Villin-Cre マウスは産まれてくるのが分かったが、成長障害、直腸脱を認めた。DSS 誘導性腸炎モデルを作成したところ、Pard6b 欠損マウスは、コントロールマウスと比較して、有意な体重減少、腸炎活動性スコアの上昇を認め、腸炎の増悪が認められた。機序としては、杯細胞の数の減少、腸管粘液の主成分である MUC-2 の発現低下を認めるため、杯細胞の分化、成熟に関連する機能を持つことが示唆された。今後は腸内細菌叢の解析や RNASeq を行う予定である。

(3) 内視鏡下生検検体

健常人と潰瘍性大腸炎患者の生検検体を用いて、免疫組織学的染色法、ウエスタンブロット法を用いて、PARD6B の発現を検証した。健常人と比較して、潰瘍性大腸炎患者では、PARD6B の発現は有意に低値であることが分かった。さらに、潰瘍性大腸炎の活動期では寛解期と比較して有意に PARD6B の発現上昇を認めた。疾患活動性と PARD6B は軽度の相関を認めたが、予後との相関は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maeda K, Zachos NC, Orzalli MH, Schmieder SS, Chang D, Bugda Gwilt, K, Doucet M, Baetz NW, Lee S, Crawford SE, Estes MK, Kagan JC, Turner JR, Lencer WI.	4. 巻 30 (2)
2. 論文標題 Depletion of the apical endosome in response to viruses and bacterial toxins provides cell-autonomous host defense at mucosal surfaces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Host Microbe.	6. 最初と最後の頁 216-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2021.12.011	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 該当する
1. 著者名 Maeda K, Nakamura M, Yamamura T, Sawada T, Ishikawa E, Oishi A, Ikegami S, Kakushima N, Furukawa K, Iida T, Mizutani Y, Ishikawa T, Ohno E, Honda T, Ishigami M, Kawashima H.	4. 巻 10(4)
2. 論文標題 Gelsolin as a Potential Biomarker for Endoscopic Activity and Mucosal Healing in Ulcerative Colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10040872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawamura T, Yamamura T, Nakamura M, Maeda K, Sawada T, Ishikawa E, Iida T, Mizutani Y, Ishikawa T, Kakushima N, Furukawa K, Ohno E, Honda T, Kawashima H, Ishigami M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Accuracy of Serum Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein in Evaluating Endoscopic Disease Activity in Crohn's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflamm Bowel Dis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izac076	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 Nakamura M, Maeda K, Yamamoto K, Yamamura T, Sawada T, Ishikawa E, Kakushima N, Furukawa K, Iida T, Mizutani Y, Ishikawa T, Ohno E, Honda T, Ishigami M, Kawashima H.	4. 巻 103 (3)
2. 論文標題 Preliminary Comparison of Endoscopic Brush and Net Catheters as the Sampling Tool to Analyze the Intestinal Mucus in the Rectum with Ulcerative Colitis Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 232-243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000521929	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 Murate Kentaro, Maeda Keiko, Nakamura Masanao, Sugiyama Daisuke, Wada Hirotaka, Yamamura Takeshi, Sawada Tsunaki, Mizutani Yasuyuki, Ishikawa Takuya, Furukawa Kazuhiro, Ohno Eizaburo, Honda Takashi, Kawashima Hiroki, Miyahara Ryoji, Ishigami Masatoshi, Nishikawa Hiroyoshi, Fujishiro Mitsuhiro.	4. 巻 26
2. 論文標題 Endoscopic Activity and Serum TNF- Level at Baseline Are Associated With Clinical Response to Ustekinumab in Crohn's Disease Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammatory Bowel Diseases	6. 最初と最後の頁 1669 ~ 1681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izaa086	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 Nishikawa Takahiro, Maeda Keiko, Nakamura Masanao, Yamamura Takeshi, Sawada Tsunaki, Mizutani Yasuyuki, Ito Takanori, Ishikawa Takuya, Furukawa Kazuhiro, Ohno Eizaburo, Miyahara Ryoji, Kawashima Hiroki, Honda Takashi, Ishigami Masatoshi, Yamamoto Tokunori, Matsumoto Seiji, Hotta Yuji, Fujishiro Mitsuhiro.	4. 巻 66
2. 論文標題 Filtrated Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Lysate Ameliorates Experimental Acute Colitis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-020-06359-3	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 Murate Kentaro, Nakamura Masanao, Yamamura Takeshi, Maeda Keiko, Sawada Tsunaki, Mizutani Yasuyuki, Ishikawa Eri, Kakushima Naomi, Furukawa Kazuhiro, Ohno Eizaburo, Honda Takashi, Kawashima Hiroki, Ishigami Masatoshi, Fujishiro Mitsuhiro.	4. 巻 14
2. 論文標題 Ustekinumab is effective against small bowel lesions in Crohn's disease: two case reports	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 129 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01242-0	査読の有無 無
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 Yamada Keisaku, Nakamura Masanao, Yamamura Takeshi, Maeda Keiko, Sawada Tsunaki, Mizutani Yasuyuki, Ishikawa Eri, Ishikawa Takuya, Kakushima Naomi, Furukawa Kazuhiro, Ohno Eizaburo, Kawashima Hiroki, Honda Takashi, Ishigami Masatoshi, Fujishiro Mitsuhiro.	4. 巻 21
2. 論文標題 Diagnostic yield of colon capsule endoscopy for Crohn's disease lesions in the whole gastrointestinal tract	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-021-01657-0	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 Hasegawa Issei, Yamamura Takeshi, Suzuki Hiroto, Maeda Keiko, Sawada Tsunaki, Mizutani Yasuyuki, Ishikawa Eri, Ishikawa Takuya, Kakushima Naomi, Furukawa Kazuhiro, Ohno Eizaburo, Kawashima Hiroki, Nakamura Masanao, Fujishiro Mitsuhiro.	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of colorectal neoplasms using linked color imaging: A prospective, randomized, tandem colonoscopy trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cgh.2021.04.004	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 Keisaku Yamada, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Keiko Maeda, Tsunaki Sawada, Yasuyuki Mizutani, Takuya Ishikawa, Kazuhiro Furukawa, Eizaburo Ohno, Ryoji Miyahara, Hiroki Kawashima, Naoki Hotta, Yoshiki Hirooka.	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinical Factors Associated With Missing Colorectal Polyp on Colon Capsule Endoscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000498942	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 Nishikawa T, Nakamura M, Yamamura T, Maeda K, Sawada T, Mizutani Y, Ishikawa T, Furukawa K, Ohno E, Miyahara R, Kawashima H, Hirooka Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Lewis Score on Capsule Endoscopy as a Predictor of the Risk for Crohn's Disease-Related Emergency Hospitalization and Clinical Relapse in Patients With Small Bowel Crohn's Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterol Res Pract	6. 最初と最後の頁 425-427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15366	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 前田啓子、中村正直、藤城光弘
2. 発表標題 PARD6Bによる腸管上皮細胞の新たな防御機構の同定
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Maeda, Masanao Nakamura, Mitsuhiro Fujishiro
2. 発表標題 PAR6B regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease
3. 学会等名 DDW (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------