

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23990

研究課題名（和文）炎症性腸疾患におけるユビキチン様分子UBDの蛋白制御機能を介した新規病態の解明

研究課題名（英文）Analysis of the role of UBD-dependent intracellular protein regulation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

研究代表者

河本 亜美（Kawamoto, Ami）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70849124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト腸上皮における新たな細胞内蛋白分解系である「UBD依存のUBL-PSM系」について、iTRAQ法により標的候補となる62種の蛋白を同定した。また免疫沈降法によりUBDと結合する蛋白としてp62蛋白を確認したほか、2つの候補分子を併せて同定した。これら結果より、ヒト腸上皮細胞に於いて炎症環境で発現誘導される分子UBDは、複数の標的分子を有する可能性が明らかとされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果より、ヒト腸上皮細胞に於いて炎症環境で発現誘導される分子UBDは、複数の標的分子を有する可能性が示された。同標的分子群の蛋白分解制御を介し腸上皮機能を調節するという新たな炎症性腸疾患の病態の可能性も提示した。標的分子のさらなる探索等を通じ、炎症性腸疾患における「UBD依存のUBL-PSM系」の理解が一層進展し、新規治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Our present study regarding the newly identified intracellular proteolysis system, UBD-dependent UBL-PSM system, identified 62 candidate target proteins by iTRAQ analysis. Also, in addition to p62, two additional candidate target proteins of the UBL-PSM system were revealed by immunoprecipitation analysis. These findings suggest that UBD, a protein induced under an inflammatory environment in human intestinal epithelial cells, may exhibit its function through multiple target proteins.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 ユビキチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎・クローン病)は腸管に慢性持続性の炎症と潰瘍を起こす「難病」であるが、本邦における患者数は増加の一途である。炎症性腸疾患の疾患成立要因は未だ不明であるが、遺伝的素因・環境因子・腸内細菌の異常等に加え、「腸上皮」における機能的異常が病態に深く関わっていることが近年の研究で示されている。この為、研究代表者らは炎症性腸疾患における「腸上皮」機能の役割に着目し、患者由来腸上皮オルガノイド等を用いた独自の病態解明研究を展開してきた(J Gastroenterol 2018, Stem Cell Reports 2017, Biochem Biophys Res Commun 2016, Sci Rep 2016)。

健全な腸上皮機能の維持には「オートファジー」や「ユビキチン・プロテアソーム系(Ub-PSM系)」等の「細胞内蛋白分解系」を介した蛋白の量的・質的管理が重要であることは、研究代表者らのグループ(Autophagy 2015, Autophagy 2018)等により明らかとされている。また、特定の腸上皮における「オートファジー」や「Ub-PSM系」の破綻が炎症性腸疾患の発症・進展に極めて重要な役割を果たしていることも示されている(Nature, 2008等)。

細胞内の蛋白分解・管理には更に「ユビキチン様蛋白・プロテアソーム系(UBL-PSM系)」が関わり(図1)、プロテアソーム依存的に細胞外環境の変化に対応している(Nat Rev Drug Discov, 2011等)。しかしながら腸上皮における「UBL-PSM系」が恒常性維持や炎症性腸疾患の発症・進展に如何なる機能的役割を担っているか、その詳細は不明である(図1)。研究代表者らは「腸上皮機能を司る分子経路に関する研究」を追求した結果、炎症粘膜環境において、1)TNF- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B 経路と Notch 経路が共役し特定遺伝子群の発現を調節すること、2)クローン病・潰瘍性大腸炎患者に於いて「UBL-PSM系」を司る主要分子である UBD (UbiquitinD)が腸上皮細胞内に蓄積すること、3)抗 TNF- $\alpha$ 抗体が有効であった患者に於いては腸上皮細胞内の UBD 蓄積が速やかに解除され良好な予後の指標となり得ること、を明らかにした(J Crohns Colitis, 2019)。これらは「UBL-PSM系」もまた腸上皮の恒常性と炎症性腸疾患の病態に深く関わる蛋白分解経路である事を示した、研究代表者ら独自の極めて重要な知見であると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究は研究代表者らが独自に見出したヒト腸上皮における新たな細胞内蛋白分解系である「UBD 依存的 UBL-PSM系」の全体像及び機能的意義を明らかとする事を目指すものである。近年の研究により腸上皮における「オートファジー」や「Ub-PSM系」を介した細胞内蛋白分解が炎症性腸疾患の発症・成立要因として極めて重要である事が示されているが、腸上皮における「UBL-PSM系」に着目した病態解明研究は研究代表者ら独自のものである。加えて「オートファジー」や「Ub-PSM系」等の既知の蛋白分解系がいずれも生体内の多彩な臓器・細胞腫で広く共有される「ユビキタス」な系であるのに対し、「UBL-PSM系」は腸管・腎臓等の一定の臓器に限局して機能を発揮する「臓器特異性」を有し、従って腸上皮特異的な蛋白分解・管理系による恒常性維持、並びにその破綻による炎症性腸疾患の発症・成立という、従来とは異なる腸上皮機能・疾患の理解に繋がる事が十分期待できる。

## 3. 研究の方法

1)ヒト腸上皮内「UBD 依存的 UBL-PSM系」標的分子の網羅的探索・同定:ヒト腸上皮細胞に於いて「UBD 依存的 UBL-PSM系」が分解・機能を制御する標的蛋白を同定するため、ヒト腸上皮 UBD 過剰発現系(UBD-OE 細胞)及びヒト腸上皮 UBD 欠損系(UBD-KO 細胞)を構築する。これら細胞で Notch 活性化と TNF- $\alpha$ 刺激を誘導する事により「UBD 依存的 UBL-PSM系」を活性化する。複数の条件で細胞内蛋白を回収し、質量分析を用いた網羅的解析(iTRAQ 法等)により、UBD 存在下・非存在下で発現量が変化する標的蛋白の同定を試みる。

2)ヒト腸上皮内「UBD 依存的 UBL-PSM系」の標的分子を介した機能の解析:研究代表者らは炎症性腸疾患患者等の内視鏡生検組織から樹立した「腸上皮オルガノイド・ライブラリ」を有しており、100例以上の患者由来オルガノイドを用いた解析が可能である。同ライブラリに保存されている腸上皮オルガノイドを基に Piggybac システム等を用いて、1)にて同定した標的蛋白の UBD 依存的分解に抵抗性の変異体を過剰発現する腸上皮オルガノイド(UBD 標的 OE オルガノイド)を樹立する。また CRISPR-CAS9 システムを用いて UBD 標的分子を欠損した腸上皮オルガノイド(UBD 標的 KO オルガノイド)を樹立する。樹立した各遺伝子改変ヒト腸上皮オルガノイドについて、幹細胞機能・分化・サイトカイン応答等を指標とした表現型解析を行う。

## 4. 研究成果

(1)ヒト腸上皮内 UBD 依存的 UBL-PSM系標的分子の網羅的探索・同定:Notch 活性化と TNF- $\alpha$ 刺激を誘導する事により「UBD 依存的 UBL-PSM系」を活性化する複数の条件下で細胞内蛋白を回収し、質量分析を用いた網羅的解析(iTRAQ 法)等により、UBD 存在下・非存在下で発現量が変化する標的蛋白の同定を試みた。その結果、以下の様な成果を得ている。

1. iTRAQ 法により Notch 活性化と TNF- $\alpha$ 共刺激を加えた際に培養したヒト腸上皮オルガノイド

について、発現量が 50%以上低下し得る遺伝子群として 62 種の蛋白を同定した。この内、蛋白量の減少が最も著しいと予想された 3 種の蛋白 (AGR2, SOX9, Annexin A1) について Western Blot 法で解析したところ、有意なタンパク量の変化は再現されなかった。

2. 免疫沈降法により UBD と結合する蛋白について解析を試みたところ、オートファジー等におけるアダプター蛋白である p62 蛋白と結合することが示された。しかしながら、UBD の高発現誘導や UBD 欠損細胞株における Notch 活性化と TNF- $\alpha$  共刺激により蛋白発現量の変化がみられなかったことから、UBD の標的蛋白とは異なる未知の役割があるものと考えられた。
3. Flag タグ付き UBD 発現株と野生型細胞株において Notch 活性化と TNF- $\alpha$  共刺激下における蛋白発現量の変化を FLAG タグ免疫沈降後の銀染色ゲル等で解析したところ、少なくとも 4 種のバンド(40kD, 45kDa, 48kD, 62kD)に量的増加が認められ、UBD の新規標的分子候補と考えられたため、質量分析による蛋白同定解析を実施する方針とした。

(1) ヒト腸上皮内 UBD 依存的 UBL-PSM 系の標的分子を介した機能の解析：ヒト腸上皮細胞に於いて「UBD 依存的 UBL-PSM 系」が分解・機能を制御する標的蛋白を同定するため、ヒト腸上皮 UBD 過剰発現系(UBD-OE 細胞)及びヒト腸上皮 UBD 欠損系(UBD-KO 細胞)を構築した。これら細胞で Notch 活性化と TNF- $\alpha$  刺激を誘導する事により「UBD 依存的 UBL-PSM 系」を活性化したモデルを作成した。また、複数の条件で細胞内蛋白を回収し、質量分析を用いた網羅的解析等により、UBD 存在下・非存在下における発現量変化を指標に腸上皮における UBD 標的蛋白の同定を試みた。その結果、以下の知見を得ている。

1. iTRAQ 法を用いた網羅的解析により、2 種の標的候補蛋白の同定に成功した。
2. Flag タグ付き UBD 発現系(UBD-OE 細胞)を用いた免疫沈降を行い、UBD と分子間結合能を有する分子の探索・同定を行った。また UBD-KO 細胞を用いた解析から複数の候補バンドを同定し、質量分析による解析を行った結果、既知の p62 のみならず 2 つの新規候補分子を同定した。

これら結果より、ヒト腸上皮細胞に於いて炎症環境で発現誘導される分子 UBD は、複数の標的分子を有する可能性が明らかとされた。さらに同標的分子群の蛋白分解制御を介し腸上皮機能を調節することで、炎症性腸疾患の病態に機能的な役割を有する可能性が考えられた。今後、標的分子のさらなる探索等を行うことで炎症性腸疾患における「UBD 依存的 UBL-PSM 系」の理解が一層進展することが期待できる結果と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Ryuichi Okamoto, Hiromichi Shimizu, Kohei Suzuki, Ami Kawamoto, Junichi Takahashi, Mao Kawai, Sayaka Nagata, Yui Hiraguri, Sayaka Takeoka, Hady Yuki Sugihara, Shiro Yui, Mamoru Watanabe	4. 巻 13
2. 論文標題 Organoid-based regenerative medicine for inflammatory bowel disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.11.004	査読の有無 無
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 Tsuchiya M, Ito G, Hama M, Nagata S, Kawamoto A, Suzuki K, Shimizu H, Anzai S, Takahashi J, Kuno R, Takeoka S, Hiraguri Y, Sugihara HY, Mizutani T, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Watanabe M, Okamoto R.	4. 巻 542
2. 論文標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 40-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.021.	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 Kuno R, Ito G, Kawamoto A, Hiraguri Y, Sugihara HY, Takeoka S, Nagata S, Takahashi J, Tsuchiya M, Anzai S, Mizutani T, Shimizu H, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Watanabe M, Okamoto R.	4. 巻 25
2. 論文標題 Notch and TNF- signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 100906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100906.	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 -

〔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
---------	---------