

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790460

研究課題名 (和文) 腸管免疫の恒常性維持におけるMAP3Kの役割

研究課題名 (英文) Role of MAP3Ks in the maintenance of mucosal immune homeostasis

研究代表者

佐藤 慎太郎 (SATO SHINTARO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80447333

研究成果の概要 (和文)：

MAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAP3K) はMAPキナーゼ (MAPK) の上流で働くキナーゼで、ファミリーを形成しており、その中でTAK1とMEKK3はJNK、p38といったMAPKの活性化以外にも、種々の刺激によるNF- κ Bの活性化に関わっていることが明らかにされている。申請者らは、部位特異的TAK1欠損マウスを作製し、腸管上皮細胞を含む種々の細胞におけるTAK1の*in vivo*における機能について報告してきた。本研究では腸管上皮細胞特異的MEKK3欠損 (MEKK3^{IEC-KO}) マウスを作製し、TAK1^{IEC-KO}マウスと比較検討を行った。その結果、TAK1とは異なり、腸管上皮細胞におけるTNF刺激によるNF- κ B活性化にはMEKK3は必須ではないことが明らかとなった。また、急性大腸炎誘導モデルを用いた検討から、MEKK3は腸管上皮細胞の恒常性維持に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

MAP3K family members act at upstream of MAPK such as JNK and p38. Among them, it has been reported that TAK1 and MEKK3 are also involved in the activation of NF- κ B in response to several stimuli. We made conditional TAK1-deficient mice including intestinal epithelial cell-specific one (TAK1^{IEC-KO}), and reported the role of TAK1 *in vivo*. In this study, to elucidate the *in vivo* role of MEKK3 at IEC, we made and analyzed MEKK3^{IEC-KO} mice, and compared them with TAK1^{IEC-KO} mice. As a result, it was revealed that MEKK3, but not TAK1, was not involved in the activation of NF- κ B in IEC. In addition, it was suggested that MEKK3 participated in maintenance of homeostasis of IEC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫、腸管上皮細胞、MAP3K、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

小腸、大腸といった腸管に代表される粘膜

組織は常に外界に曝されており、種々の外来抗原や病原体などと最前線で対峙している。

中でも腸管上皮細胞 (IEC) は物理的なバリアを形成して腸内細菌と免疫細胞を隔て、また抗菌ペプチドなどを産生することで腸管内の恒常性維持に深く寄与している。この恒常性、および腸管免疫の破綻は炎症性腸疾患 (IBD) の原因と考えられている。

近年、転写因子 NF- κ B の活性化経路に必須である NEMO の腸管上皮細胞特異的欠損マウス (NEMO^{IEC-KO} マウス) が作製、解析された。NEMO^{IEC-KO} マウスは正常に生まれてくるものの、生後数週間で大腸炎を自然発症する。アダプター分子 MyD88 との二重欠損マウスではこの炎症所見が認められなくなることから、NEMO^{IEC-KO} マウスが示す大腸炎は Toll 様受容体 (TLR) を介した腸内細菌の認識が引き金になっていることが予想される。NEMO の欠損は主要壊死因子 (TNF) によるアポトーシスを亢進することが知られているが、TNF 受容体-I (TNFRI) を欠損する NEMO^{IEC-KO} マウスでは大腸炎が認められない。このことは、TNFRI を介したアポトーシス誘導シグナルもまた NEMO^{IEC-KO} マウスマウスの大腸炎発症に重要であることを示しており、腸上皮での NF- κ B 活性化に到るシグナル伝達が腸管免疫の恒常性維持に重要であることを意味している。

MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAP3K) は MAP キナーゼ (MAPK) の上流で働くキナーゼで、ファミリーを形成しており、現在までのところ 15 種類が知られている。その中で、TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) と MEKK3 は JNK, p38 といった MAPK の活性化以外にも、種々の刺激による NF- κ B の活性化に関わっていることがそれぞれを欠損するマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いた解析から明らかにされている。両分子の MAPK, NF- κ B 活性化への寄与は刺激によって異なるが、それぞれの欠損 MEF で同じ表現型を示す場合もあり (例: TNF 刺激による NF- κ B の活性化)、関係性や使い分けに関してはよくわかっていない。また、TAK1 欠損マウス、MEKK3 欠損マウス共に早期胎生致死であることから、*in vivo* での機能に関しても不明な点が多い。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、部位特異的 TAK1 欠損マウスを作製し、腸管上皮細胞を含む種々の細胞における TAK1 の *in vivo* における機能について報告してきた。興味深いことに、NEMO^{IEC-KO} マウスと異なり、腸管上皮細胞特異的 TAK1 欠損マウス (TAK1^{IEC-KO} マウス) は生後すぐに腸管全域にわたる激しい上皮細胞死を認め、1 日以内に死亡する。また、誘導型腸管上皮細胞特異的 TAK1 欠損マウス (inducible-TAK1^{IEC-KO} マウス) を用いて、4 週齢のマウスで TAK1 を欠損させた場合も数日で激しい細胞死が見られる。さらに、TNFRI との二重欠損マウスにおいても、生後数週間

で大腸炎のみならず回腸炎を発症する。これらの結果は、TAK1 が腸管上皮、腸管免疫の恒常性維持に関して、NF- κ B 以上に多段階で関与していることを示唆している。

最近、理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合センター・分化制御研究グループ (黒崎知博グループディレクター) で、部位特異的に MEKK3 を欠損させることができる floxed-Map3k3 マウスが作製され、MEKK3 についても *in vivo* 解析が可能になった。本研究では、このマウスを用いて腸管上皮細胞特異的 MEKK3 欠損マウス (MEKK3^{IEC-KO} マウス) を作製、解析し、NEMO や TAK1 欠損マウスの表現型と比較検討することで、MEKK3 の腸管免疫恒常性維持における機能や位置づけを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Cre-loxP システムに準じた floxed-Map3k3 マウスは理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合センター・分化制御研究グループ (黒崎知博グループディレクター) から分与頂いた。このマウスと、腸管上皮細胞特異的に Cre タンパクを発現するマウス (Villin1-Cre) を掛け合わせ、腸管上皮細胞特異的 MEKK3 欠損マウスを作製する。TAK1^{IEC-KO} マウスのように、生後すぐに死亡してしまう可能性もあるため、誘導型腸管上皮細胞特異的 MEKK3 欠損マウスの作製も進める。このマウスの作製に必要な Vil^{ERT2}-Cre マウスはフランス Institut Curie-CNRS の Dr. Sylvie Robine から供与頂いた。Villin1-Cre, Vil^{ERT2}-Cre マウス共に体外受精・胚移植によるクリーンアップを行い、SPF 実験動物施設に搬入する。また、可能になり次第 MyD88, TNFRI または TNF との二重欠損マウスの作製も開始する。

MEKK3^{IEC-KO} マウスから小腸上皮細胞を調整し、各種プロットティングを行い、MEKK3 の欠損を確認する。

MEKK3 は少なくとも MEF において TLR リガンドや TNF が惹起する NF- κ B の活性化に必要であることが報告されている。したがって、MEKK3^{IEC-KO} マウスの腸管上皮細胞においてもアポトーシスが亢進している可能性が高い。そこで、小腸、大腸の組織切片を調整し、TUNEL アッセイや抗 Caspase-3 抗体を用いた免疫組織染色を行い、上記の可能性について検討する。また、上記の実験と平行して、MEKK3^{IEC-KO} マウスが腸炎症状を呈するかを確認するために、組織切片を病理学的に判断する。リンパ球浸潤が認められる場合は、適切な標識抗体を用いて免疫組織染色を行う。また、MEKK3^{IEC-KO} マウスとコントロールマウスから腸管上皮細胞を調整し、炎症性サイトカインの発現量を定量的 PCR 法を用いて測定し比較する。

MyD88 もしくは TNF との二重欠損マウスに

対して、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 経口投与による急性大腸炎誘導モデルを採用し、腸炎発症時の MEKK3^{IEC-KO} マウスの表現型を観察する。野生型との差が認められた場合は、大腸炎誘導時における腸管上皮細胞の感受性や、上皮細胞再生時における細胞分化能を中心に解析し、バリア機能も含めた MEKK3 の腸管免疫恒常性維持における機能や位置づけを明らかにする。

4. 研究成果

MEKK3^{IEC-KO} マウスから小腸、および大腸上皮細胞を調整し、サザン、ウェスタンブロッティングを行い、両細胞での MEKK3 の欠損を確認した。腸管上皮細胞特異的 TAK1 欠損マウスと同様に腸炎を自然発症するとして当初の予想とは異なり、MEKK3^{IEC-KO} マウスはメンデルの法則に従って正常に生まれ、少なくとも生後1年間は腸炎を自然発症することはなかった。MEKK3^{IEC-KO} マウスから調整した小腸・大腸組織切片を病理学的に判定したが、同腹仔のコントロールマウスとの差異は認められなかった。この結果は、マウス胎児繊維芽細胞とは異なり、MEKK3 が腸管上皮細胞においては TNF が惹起する NF- κ B の活性化に必須ではないことを示唆している。

そこで次にこの仮説の検証を行った。野生型と MEKK3^{IEC-KO} マウスに TNF を静脈投与し、腸管上皮細胞におけるアポトーシス亢進を比較・検討した。その結果、MEKK3^{IEC-KO} マウスにおいても野生型マウスと同様に TNF 投与によるアポトーシス亢進が認められなかった。この結果は TNF 刺激により NF- κ B が活性化することで抗アポトーシス反応が起きていることを意味する。また、両マウスを TNF 欠損のバックグラウンドにして同様の実験を行ったが、同様の結果を得た。したがって、腸管上皮細胞における TNF 刺激による NF- κ B 活性化には MEKK3 は必須ではないことが明らかとなった。

次に、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 経口投与による急性大腸炎誘導モデルを採用し、腸炎発症時の MEKK3^{IEC-KO} マウスの表現型を観察した。野生型マウス群と比較した場合、MEKK3^{IEC-KO} マウス群では、DSS 投与5日目から大腸上皮層の脱落とリンパ球浸潤が認められ、顕著な体重減少を呈した。また、MEKK3^{IEC-KO} マウスでは DSS 投与3日目から上皮細胞のアポトーシスが亢進していた。これらの結果は、腸管上皮細胞の恒常性維持において、MEKK3 が何らかの形で関与していることを示すものであり、そのメカニズムの解明に向けて現在も解析を継続中である。

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6件)

- 1) Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuiji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K. Inflammatory Mediator TAK1 Regulates Hair Follicle Morphogenesis and Anagen Induction Shown by Using Keratinocyte-Specific TAK1-Deficient Mice. PLoS ONE. 5: e11275, 2010.
- 2) Obata T, Goto Y, Kunisawa J, Sato S, Sakamoto M, Setoyama H, Matsuki T, Nonaka K, Shibata N, Gohda M, Kagiya Y, Nochi T, Yuki Y, Fukuyama Y, Mukai A, Shinzaki S, Fujihashi K, Sasakawa C, Iijima H, Goto M, Umesaki Y, Benno Y, Kiyono H. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:7419-7424, 2010.
- 3) Halaas O, Steigedal M, Haug M, Awuh JA, Ryan L, Brech A, Sato S, Husebye H, Cangelosi GA, Akira S, Strong RK, Espevik T, Flo TH. Intracellular Mycobacterium avium Intersect Transferrin in the Rab11(+) Recycling Endocytic Pathway and Avoid Lipocalin 2 Trafficking to the Lysosomal Pathway. J Infect Dis. 201:783-792, 2010.
- 4) Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:1512-1517, 2010.
- 5) Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Goda K, Igarashi O, Sato S, Nochi T, Sagara H, Yokota Y, Jetten AM, Kaisho T, Akira S, Mimuro H, Sasakawa C, Fukui Y, Fujihashi K, Akiyama T, Inoue J, Penninger JM, Kunisawa J, Kiyono H. Id2-, ROR γ t-, and LT β R-independent initiation of lymphoid organogenesis in ocular immunity. J Exp Med. 206:2351-2364, 2009.
- 6) Garcia M, Dogusan Z, Moore F, Sato S, Hartmann G, Eizirik DL, Rasschaert J.

Regulation and function of the cytosolic viral RNA sensor RIG-I in pancreatic beta cells. Biochim Biophys Acta. 1793:1768-1775, 2009.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：炎症性腸疾患の検査方法及び検査用キット

発明者：清野 宏、佐藤 慎太郎、小幡 高士、飯島 英樹

権利者：清野 宏、佐藤 慎太郎、小幡 高士、飯島 英樹

種類：特願

番号：2010-72790

出願年月日：平成22年3月26日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 慎太郎 (SATO SHINTARO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80447333

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：