

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15968

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ユビキチンリガーゼの役割

研究課題名（英文）The role of alternative autophagy-related ubiquitin ligase in the pathogenesis 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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：新規オートファジーに関連するユビキチンリガーゼの、消化管における機能解析を行った。このユビキチンリガーゼ Trim31に異常がある場合、DSS腸炎モデルで炎症の増悪がみられた。また、新規オートファジーの基質認識において、特殊なユビキチンチェーンK33鎖と、アダプタータンパク質の組み合わせが重要であることを見出した。

現在、新規オートファジーに異常を有するIBD患者の解析を通じて、新規オートファジーによって分解される基質の1つとして数種類のサイトカインを同定した。今後、新規オートファジーを調整することで、病態改善に寄与するかどうかを解析する。

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・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系と、新規オートファジー解析系を同時に有する申請者にもみ達行可能な研究であり、この標識機構の解明は今後の病態への関与の解明に資する。また、この研究は、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、新規オートファジーの機能解析として、ベッドサイドに直結する新たな側面の提供が期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the functions of ubiquitin ligases related to alternative autophagy in the gastrointestinal tract. When the ubiquitin ligase Trim31 was abnormal, exacerbation of inflammation was observed in the DSS enteritis model. We also found that the combination of a special ubiquitin chain, K33, and an adapter protein is important for substrate recognition by novel autophagy.

Through the analysis of IBD patients with defects in alternative autophagy, we have identified several cytokines as substrates degraded by de novo autophagy. In the future, we will analyze whether the regulation of novel autophagy contributes to the improvement of pathology.

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 新規オートファジー

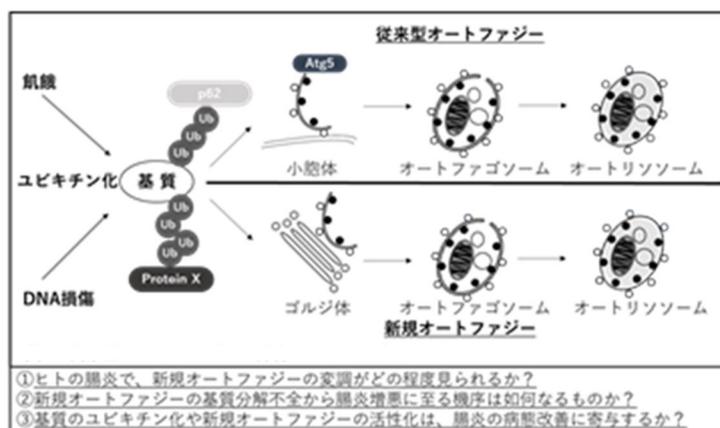
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新規オートファジーは、Atg5, Atg7, LC3 などの分子に依存しない新たなオートファジー機構で、解析系も通常のオートファジーとは異なり、特殊である。申請者の所属する研究室で独自に解析していたこれらの系に、前述のように申請者の新規ユビキチン可視化技術を応用したことで、新規オートファジーにユビキチンが関連することが示唆された。細菌感染のモデルとして使われる Polystyrene Beads や、幼若赤血球の Mitochondria が、新規オートファジーの経路に誘導される際にユビキチン化されることを解析した。また、新規オートファジーに関連する分子として、ユビキチンリガーゼである TRIM31 を同定し、すでにその欠損マウスを作成済みである。申請者は、大学院生よりユビキチン-オートファジー系の解析経験があり、さらには消化器内科医として 10 年の臨床経験から、炎症性腸疾患の増悪のメカニズムについて学会発表も含め考察してきた。腸管上皮オルガノイドや、腸管上皮の免疫染色など、消化管の病態解析にも習熟している。これらの解析技術や経験を応用した、新規オートファジーのユビキチンによる制御機構の解明は、炎症性腸疾患の増悪・発症を説明しうる新しい観点と考え、その研究を展開する。

2. 研究の目的

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。通常型オートファジーの基質認識機構は、(1)分解基質にユビキチンが結合すること、(2)ユビキチンを目印として SQSTM1/p62 というアダプター



タンパク質が結合すること、(3) オートファジーは SQSTM1/p62 を認識して基質を分解することが見出されている。例えば、SQSTM1/p62 の蓄積で肝細胞癌やハンチントン病などの神経変性疾患が増悪することから、その重要性が示唆される。一方、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)Ra からも同様の結果を発表、また、(3) 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。また、申請者が独自に開発したポリユビキチン鎖可視化系と(研究業績 2018 年度)、申請者の研究室で開発した新規オートファジーを生細胞で観察する可視化技術を組み合わせることによって、新規オートファジーとユビキチンの共局在を示した。これらの知見に立脚して以下の「問い」が提起される。

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はどのようなものか

基質のユビキチン化や新規オートファジーの制御は、DSS 腸炎の病態改善に寄与するか
本研究では、上記 2 点の問いに答えることで、A「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」B「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

ヒト炎症性腸疾患の臨床検体を用いて、基質の蓄積を調べる

Trim31 欠損マウスにおける DSS 腸炎の病態を解析

Trim31 でユビキチン化され新規オートファジーで分解される基質を同定

同定した基質の欠損マウスを作成し、DSS 腸炎の病勢が改善するか解析

新規オートファジーを誘導する化合物で腸炎病勢が改善するか検討

4. 研究成果

新規オートファジーの変調による生体の異常は、関連遺伝子欠損マウスにおいては観察されているものの、実際の疾患に関わっているか否かは不明であった。このような中、超早期発症型炎症性腸疾患 (Very Early Onset-Inflammatory Bowel Disease: VEO-IBD) 罹患者において新規オートファジー実行分子 WIPI3 の遺伝子変異が見出され、新規オートファジーの変調によるヒト疾患が実際に存在することが初めて明らかとなった。ヒト炎症性腸疾患において、①当該遺伝子変異により新規オートファジーが不全となること(図 1)、②患者病理所見では血球に炎症の責任を認めること、③IL-1 や TNF などのサイトカイン産生上昇を認めること(図 2)、④新規オートファジーを調整する可能性がある既存薬で、Cytokine の分泌が抑制されること(図 3)、を見出した。単一遺伝子異常の解析から、新規オートファジーがサイトカインの分泌調整に関与すること、また、VEO-IBD に対する新規治療ターゲットとなりうることを見出した。また、治療候補薬剤の選定にまで先鞭をつけたことは、特記すべき成果である。今後、Trim31 欠損マウス DSS 腸炎をモデルとして、これらの化合物の投与を行い、結果を解析する。

現在、当該の変異を有するマウスを CRISPR-Cas9 System を用いて作成中である。今後、このマウスを用いて、腸炎の病態解析や、選定した既存薬の効果判定を行う。一方で、WIPI3 の変異から、炎症に至るまでのメカニズムがある程度証明できたこと、また、患者血球を用いた解析では、新規オートファジーの誘導が炎症の改善に寄与する可能性があることが判明した。

解析はおおむね順調といえるが、患者の状態は刻一刻と変化しており、長期の治療にわたる合併症により全身状態が悪化してきている。本年度の研究成果で、この患者の病態の責任となりうる細胞は、上皮ではなく血球系であることが証明された。これを踏まえて、今後患者の根本的な加療としては骨髄移植が提案されている。しかし、患者における遺伝子変異は、程度の差はあれど全身で起こっており、腸炎の病態が改善後も、引き続き新規オートファジーを調整する薬剤の探索が望まれる

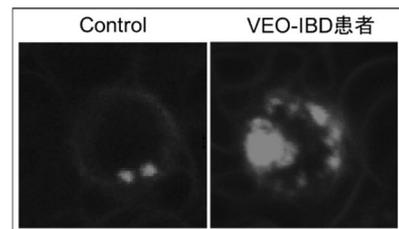


図 2 新規オートファジー不全が認められた

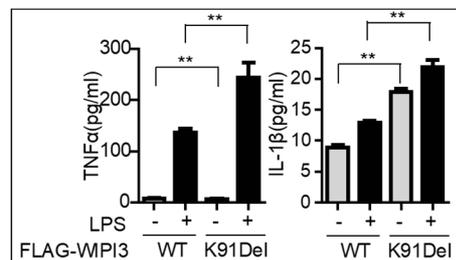


図 1 新規オートファジー不全細胞におけるサイトカインの上昇

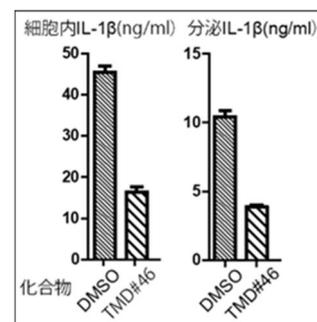


図 3 新規オートファジー亢進で、サイトカイン分泌が低下

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 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 -

1. 著者名 Matsuda Hiroki, Nibe-Shirakihara Yoichi, Tamura Akiko, Aonuma Emi, Arakawa Satoko, Otsubo Kana, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Shimizu Shigeomi, Ma Averil, Watanabe Mamoru, Uo Motohiro, Okamoto Ryuichi, Oshima Shigeru	4. 巻 592
2. 論文標題 Nickel particles are present in Crohn's disease tissue and exacerbate intestinal inflammation in IBD susceptible mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74~80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.111	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 -

〔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
---------	---------