

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790671

研究課題名(和文)腸管組織におけるオートファジーの機能および腸管炎症病態との関連性の解明

研究課題名(英文)The elucidation about the relevance between the function of autophagy in the intestinal tract tissues and the intestinal tract inflammation pathology

研究代表者

稲場 勇平 (Inaba, Yuhei)

旭川医科大学・医学部・その他

研究者番号：30447099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：腸管組織におけるオートファジーの機能及び腸管炎症の病態を解明を目的とし、細胞株レベルとin vivoのマウスレベルでのオートファジー発現の検討を実施した。細胞株レベルでは、炎症性サイトカインの投与によりオートファジーの誘導を確認した。様々な抗炎症性物質の投与におけるオートファジーの発現について検討を予定している。マウスレベルでは、DSSを内服させた腸炎モデルにおいて、有意にオートファジーが誘導されていることを確認した。またIL-10欠損マウス腸管においてオートファジー発現が低下していることを見出した。機能解析を目的としてオートファジーノックアウトマウスを作成し腸炎モデルの実験を開始している。

研究成果の概要(英文)：The expression of autophagy on cell line level and mouse level was used for the purpose of the elucidation of the relevance between the function of autophagy in intestinal tract tissues and the pathology of intestinal tract inflammation. In cell line level, the expression of autophagy was checked by induction of inflammatory cytokines. Examination is under continuation about the time course and dose dependency which the expression of autophagy increase by several cytokines. I plan to study about the expression of autophagy by induction of various anti-inflammatory substances. In the mouse level, I checked that the expression of autophagy was increased significantly in the DSS colitis models. And the expression of autophagy decreased in IL-10 knockout mice compared with wild type mice. I created the autophagy knockout mouse which had used for purpose of functional analysis.

研究分野：医歯薬学系

科研費の分科・細目：内科系臨床医学区、消化器内科学

キーワード：オートファジー 腸管上皮 炎症性腸疾患 腸管炎症 サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、不要となった自己の蛋白や細胞内に侵入した菌体、攻撃因子をオートファゴソーム内に取り込んで分解・排除する生体防御システムである。最近、このオートファゴソーム形成に必須の分子をコードする ATG16L1 遺伝子に、炎症性腸疾患患者に高感受性の遺伝子多型が発見され、その病態との関連性が示唆された。さらに、オートファゴソーム形成に必須の蛋白である ATG16L1 および ATG5 はいずれもパネート細胞に発現し、顆粒分泌機構に関与している可能性が示唆され (Cadwell et al, Nature, 2009), オートファジーと腸管自然免疫システムとの密接な関係が想定されている。我々もこれまでの研究成果から、炎症性腸疾患患者や IL-10 欠損マウスで腸パネート細胞由来の抗菌ペプチドの機能異常が認められること (Maemoto, et al. Hokkaido Igaku Zasshi, 2004)(Wehkamp, et al. PNAS USA, 2005)(Inaba et al, Inflamm Bowel Dis, 2010), 腸管上皮のオートファジー誘導を介して腸管保護作用を発揮すること (Inaba Y, et al. AGA, 2011), プロバイオティクス由来活性物質 (competence and sporulation factor およびポリリン酸) の腸管保護効果はを明らかにしてきた (Fujiya, et al. Cell Host & Microbe, 2007)(Okamoto, Inaba, et al. in Int J Colorectal Dis., 2012)(Segawa, et al. PLoS One, 2011)。

### 2. 研究の目的

腸管自然免疫には、オートファジーによる異物排泄機構とパネート細胞由来の機能性ペプチド分泌機構、さらには腸内微生物が相互に協調し合う新しい腸管防御のメカニズムが存在するものと考えられる。また、プロバイオティクスによるオートファジー誘導が腸管障害の改善を促す可能性が推測される。そこで本研究では次の3点について明らかにすることを目的とした。

- (1) 炎症関連サイトカインおよび菌由来成分による腸管上皮細胞のオートファジーの発現や機能の変化を明らかにする。
- (2) ATGs 過剰発現あるいは発現抑制モデルによる腸管上皮の細胞生理学的変化、抗菌ペプチドの発現・機能の変化を明らかにする。
- (3) 腸管炎症モデルにおけるオートファジーや抗菌物質の機能異常および菌由来腸管保護活性物質による改善効果を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)- 種々の腸管上皮細胞におけるオートファジーの発現や機能の解析  
腸管上皮細胞 (ラット小腸上皮細胞 IEC18 細胞やヒト大腸癌細胞 Caco2) などの細胞株に対して、炎症性サイトカインの TNF・IFN や菌由来成分の投与を行い、組織標本を用いてオートファジーの発現マーカーである LC3B 抗体を免疫染色することにより評価す

る。またマウス腸管上皮由来細胞に炎症性サイトカインや菌由来成分の投与を行い同様にオートファジーの発現を検討する。

(1)- 腸管上皮細胞におけるオートファジー-ATG16L1 遺伝子の発現メカニズムの解明

種々の腸管上皮細胞における ATG16 の mRNA および蛋白発現を、RT-PCR、western blots にて検討する。Atg16L1 は、恒常的に Atg12、Atg5 と複合体 (Atg12-5/16L1 複合体) を形成し、隔離膜伸長に必須な役割を果たしていることから (Mizushima et al. J. Cell Sci. 2003)、この Atg12、Atg5 の mRNA 及び蛋白の発現についても同様の検討を行う。

(2)- ATG16L1、ATG5 の発現と細胞の生理学的変化

IEC 細胞株を用いて ATG5 や ATG16L1 の siRNA を導入し、オートファジーの発現抑制を行い、細胞内シグナル伝達系 [特にオートファジーと関係の深い MAPK (mitogen-activated protein kinase)] や Heat Shock Protein の発現、細胞株から誘導されるサイトカインやケモカイン発現について検討する。また、各種炎症関連サイトカインを細胞株に投与して同様の検討を行い、炎症下における ATG5 や ATG16L1 の役割を明らかにする。サイトカインやケモカインについては protein array にて検討を行い、抗菌ペプチドの mRNA および蛋白発現に関しては RT-PCR、western blots にて評価する。さらに、ATG16L1 の過剰発現細胞を作成し同様の検討を行う。過剰発現は、ATG16L1 の cDNA を腸管上皮細胞に transfection し、一時的な遺伝子の過剰発現を誘導により検討を行う。

(2)- ATG16L1、ATG5 の発現と抗菌ペプチドの発現・機能の変化

の検討と同様の処理をした細胞株における抗菌ペプチドの mRNA および蛋白発現を、RT-PCR、western blots にて検討する。これらの結果から ATG16L1 と抗菌ペプチドの関係を明らかにする。さらに、サルモネラ等の病原菌を用いて bactericidal test を行い、抗菌ペプチドの機能についても解析する。

(3) 各種腸炎モデルにおける炎症とオートファジーの発現

クローン病類似の慢性腸炎モデルである IL10 欠損マウスを用いて腸管における ATG16L1 の発現やオートファジーの機能異常に関して検討し、すでに報告している抗菌ペプチド発現の変化を比較する。腸管炎症を発症したマウスおよび発症のないマウスの小腸・大腸を採取し、mRNA・蛋白および組織標本のサンプルから、RT-PCR、western blots および免疫染色によって検討する。また菌由来腸管保護活性物質 (competence and sporulation factor およびポリリン酸) の腸管への投与により ATG16L1 の発現やオートファジーの機能異常の改善効果、抗菌ペプチドの発現変化についても検討する。Atg7 欠損マウスと villin-Cre マウスを交配させ腸管上

皮においてのみオートファジー欠損マウスを作成しDSS、TNBSなどの薬剤誘導腸炎モデルとして同様に検討を行う

#### 4. 研究成果

(1)腸管上皮細胞である IEC18(ラット小腸細胞)と Caco2(ヒト大腸癌細胞)に対して炎症性サイトカインの TNF や IFN を投与して採取したタンパクを LC3B の抗体を用いたウエスタンブロット法による検討でオートファジーの誘導を確認した。また細胞株を用いた蛍光免疫染色でも同様の結果が得られた。また腸管上皮から採取した mRNA を用いて ATG16L1 の発現について RealTimePCR による解析を行い、発現の上昇を確認している。(2)IEC 細胞を用いて ATG5、ATG16L1 の SiRNA を導入し、オートファジー抑制モデルを作成した。TNF や IFN を投与し炎症下において細胞内のシグナル伝達系について検討した。細胞のサバイバル経路に関連する、MAPKs (P-38、Erk1/2、JNK)や Heat Shock Protein に着目してウエスタンブロット法を用いてタンパクの発現を調べた。特に P-38、Erk1/2 について SiRNA によるオートファジー抑制群では発現に有意な変化を認めず、オートファジーの発現と大きく関連する可能性が示唆された。一方、ATG16L1 の overexpression モデルを同様に作成し検討を行った。明らかな発現の変化は認めなかった。(3)腸炎モデルとオートファジーの関係を明らかにするためにまずは DSS 腸炎を発症させ、小腸、大腸粘膜におけるオートファジーの発現を検討した。腸管粘膜より採取したタンパクを用いて LC3B の発現を調べ、炎症を伴った腸管に有意な発現の亢進を認めた。しかしながら炎症性腸疾患類似の自然腸炎を発症する IL10 欠損マウスを用いたオートファジー発現について検討を行ったところ、野生型マウスと比較してオートファジーの発現が低下していた(図1)。

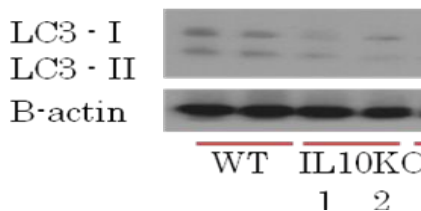


図1 IL10欠損マウス小腸のオートファジー発現(ウエスタンブロット法)

以上から炎症反応を抑制するサイトカインである IL10 とオートファジーの間には大きな関連があることが示唆された。

次に腸管におけるオートファジーの機能解析のために、腸管においてオートファジーの発現が抑制される動物モデルの作成を目指した。他施設の理研より譲渡いただいた ATG7 欠損マウスと Villin-Cre マウスを交配させ、腸管上皮において ATG7 の発現が抑制されたマウスを作製した。

本マウスは現在飼育数が少数であり、マウスの個体数がそろった段階で DSS 腸炎を含めた薬剤誘導腸炎を発症させた腸管上皮におけるサイトカインやケモカインの発現を検討予定である。

本研究で腸管における炎症病態とオートファジーの深い関連性が明らかとなり、特に IL10 がオートファジーの誘導に重要な役割を担っていることが示唆された。今後腸管におけるオートファジーの制御をターゲットとした炎症性腸疾患に対する新たな治療法の開発に道筋が得られるものと考えられる。

#### 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3件)

1. Fujiya M, Konishi H, Kamel M.K.M, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene*. 2013. 査読有
2. Nomura Y, Tanabe H, Moriichi K, Igawa S, Ando K, Ueno N, Kashima S, Tominaga M, Goto T, Inaba Y, Ito T, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Kohgo Y. Reduction of E-cadherin by Human Defensin-5 in Esophageal Squamous Cells. *Biochem Bioph Res Co*. 2013.09.13. 査読有
3. Okamoto K, Fujiya M, Nata T, Ueno N, Inaba Y, Ishikawa C, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Chang EB, Kohgo Y. Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *Int J Colorectal Dis*. 2012.08. 査読有

[学会発表](計3件)

1. Inaba Y, Fujiya M, Kohgo Y. The novel probiotic function through activation of intestinal epithelial autophagy. 16th International Congress of Mucosal Immunology. 2013.07.17. Vancouver, Canada.
2. Inaba Y, Fujiya M, Kohgo Y. Activation of intestinal epithelial autophagy as a potential and novel mechanism of probiotic action in the gut. ECCO2012. 2012.02.17. Barcelona, Spain.
3. 稲場勇平、藤谷幹浩、高後裕. 腸管オートファジー誘導による抗酸化作用、腸管バリア増強作用を応用した過敏性腸症候群の新規治療開発. 第54回日本消化器病学会大会. 2012.10.12. 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲場勇平 (INABA YUHEI)

旭川医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：30447099