

研 究 報 告 書

「腸管上皮細胞の粘膜免疫防御における腸管上皮特異的ホメオボックス蛋白質 CDX2 によるオートファジー制御機構とその役割の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年 10 月～平成27年3月

研 究 者: 青木耕史

1. 研究のねらい

近年、日本を含めた欧米諸国では、クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患への罹患率が著しく増加している。炎症性腸疾患は、小腸や大腸に炎症を発症する慢性炎症性疾患で、再発を繰り返す一方で完治することがなく、根本的治療法の開発が急務な難治性疾患である。しかし、それらの炎症性腸疾患の原因が明らかになっておらず、炎症が慢性化する機構の解明は、重要な課題の一つとなっている。

腸は、内腔と生体を腸粘膜によって隔てている。その腸粘膜において内腔に接しているのが腸上皮細胞である。これまで我々は、その腸上皮細胞に特異的に発現し、腸上皮細胞の生理的および恒常的な機能に不可欠な、ホメオボックス転写因子である CDX2 の機能解析を進めてきた。その CDX2 に結合するタンパク質を質量分析法により解析したところ、細胞内分解システムの一つであるオートファジーの必須酵素 ATG7 に CDX2 が結合することを見出した。この結果と一致して、腸上皮細胞において、CDX2 がオートファジーを活性化することが分かった。近年の研究から、オートファジーに関係する遺伝子の異常が、炎症性腸疾患の発症を促進することや、オートファジーが腸粘膜の細菌感染への防御に働くことにより腸粘膜免疫に重要な役割を果たすことが明らかになっている。そこで、本研究課題では、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス蛋白質である CDX2 の機能解析を中心にして、炎症性腸疾患の誘発や炎症の慢性化状態の維持に関わる腸上皮細胞の異常の解明を目標にする。とくに、CDX2 によるオートファジーの活性化が腸管における細菌感染に対して働く役割を明らかにすることにより、腸上皮細胞に備わる感染防御機構の解明を目指す。また、近年の研究から、腸粘膜のマクロファージなどの間質細胞において炎症性シグナルの制御にオートファジーが重要な役割を担うことが明らかになった。一方で、腸上皮細胞における炎症性シグナルの制御機構の解明は遅れている。そこで、本研究課題では、腸上皮細胞の炎症性シグナルの制御における CDX2 の役割や、CDX2 によって活性化するオートファジーの役割を明らかにする。これらの一連の解析を通じて、腸粘膜の炎症の慢性化の原因となり得る腸上皮細胞の異常の解明を進めることにより、炎症性腸疾患の原因の解明を目標にする。

2. 研究成果

(1) 概要

これまでの研究から、腸粘膜への細菌の感染に対して、腸粘膜のオートファジーが防御能の一つとして働くことや、そのオートファジーの活性が炎症性シグナルの調節に重要な役割を担うことが報告されていた。しかし、腸上皮細胞のオートファジーを制御する機構や腸上皮細胞

胞から発信される炎症性シグナルの調節機構は不明であった。本研究では、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子 CDX2 が、腸上皮細胞への細菌（赤痢菌）の感染に対して防御的に働くことを明らかにした。さらに、その細菌感染防御が、CDX2 によるオートファジーの活性化を介していることが明らかになった。

腸上皮細胞への細菌感染により、腸粘膜組織では細菌感染に対する防御反応として炎症性シグナルが惹起する。腸上皮細胞では、とくにインフラマソームの活性化により Caspase I が活性化することにより、炎症性シグナルの主要サイトカインの一つである IL18 の成熟型が産生される。本研究により、CDX2 がヒトゲノムに特異的な *ICEBERG (CARD18)* 遺伝子の発現を上昇することにより、Caspase I を抑制することが分かった。その結果、腸上皮細胞における IL18 の産生および分泌量が CDX2 により著しく減少することが分かった。また、DSS 投与により誘発される腸炎が *Cdx2* 変異マウスでは、野生型マウスに比べて著しく増悪することが分かった。これらの一連の実験結果から、CDX2 が腸上皮細胞由来の炎症シグナルの負の制御因子であることや、*ICEBERG* 遺伝子の生理的機能が初めて明らかになった。

さらに、CDX2 が炎症性ケモカインの CXCL1,2,3,5 や CXCL10 の遺伝子発現を顕著に抑制することが遺伝子発現解析により明らかになった。CXCL1 や CXCL5 は、腸粘膜の炎症部に好中球などの免疫細胞を遊走する炎症性ケモカインとして、炎症の誘導に働くことが知られている。これらの結果から、腸上皮細胞において、CDX2 はオートファジーの活性化を介して感染防御に働く一方で、インフラマソームの活性制御や炎症性ケモカインの発現調節などを介して、腸粘膜の免疫防御に働くことで、炎症反応を減弱させていると考えている。

(2) 詳細

「腸上皮細胞への細菌感染に対する CDX2 の感染防御能の解析」

CDX2 に結合するタンパク質分子を質量分析法により解析したところ、CDX2 がオートファジーの必須酵素である ATG7 に結合することや、腸上皮細胞のオートファジーを活性化することが分かった。オートファジーは細胞内の分解システムとして働く一方で、その異常が炎症性腸疾患を含む様々な病態の原因になることが明らかになっている。そこで、腸上皮細胞に感染性の赤痢菌株 YSH6000 を用いて解析を行ったところ、腸上皮細胞に感染した赤痢菌の腸上皮細胞内での生存を CDX2 が抑制することが分かった。さらに、ATG7 に対する shRNA を用いてオートファジーの活性を抑制すると、CDX2 による、細菌の増殖抑制が減弱することがわかった。これらの結果から、CDX2 がオートファジーの活性化を介して腸上皮細胞に感染した細菌の生存を抑制することにより、粘膜免疫防御を強化することが分かった(図 1)。

「腸上皮細胞から発信される炎症性シグナルの制御における CDX2 の役割の解析」

近年の研究から、腸粘膜組織のマクロファージなどにおいて、オートファジーが炎症性サイトカインである IL1 β などの産生を制御することが報告されている。CDX2 がオートファジーを活性化することから、CDX2 が腸上皮細胞由来の炎症性シグナルを調節することを仮説として解析を進めた。その結果、CDX2 が Caspase I (インフラマソーム) の活性化を抑制することや IL18 の産生を抑制することが分かった。その機序を解明するために cDNA マイクロアレイ解析を行ったところ、CDX2 が発現を最も顕著に誘導する遺伝子として *ICEBERG (CARD18)* を同定

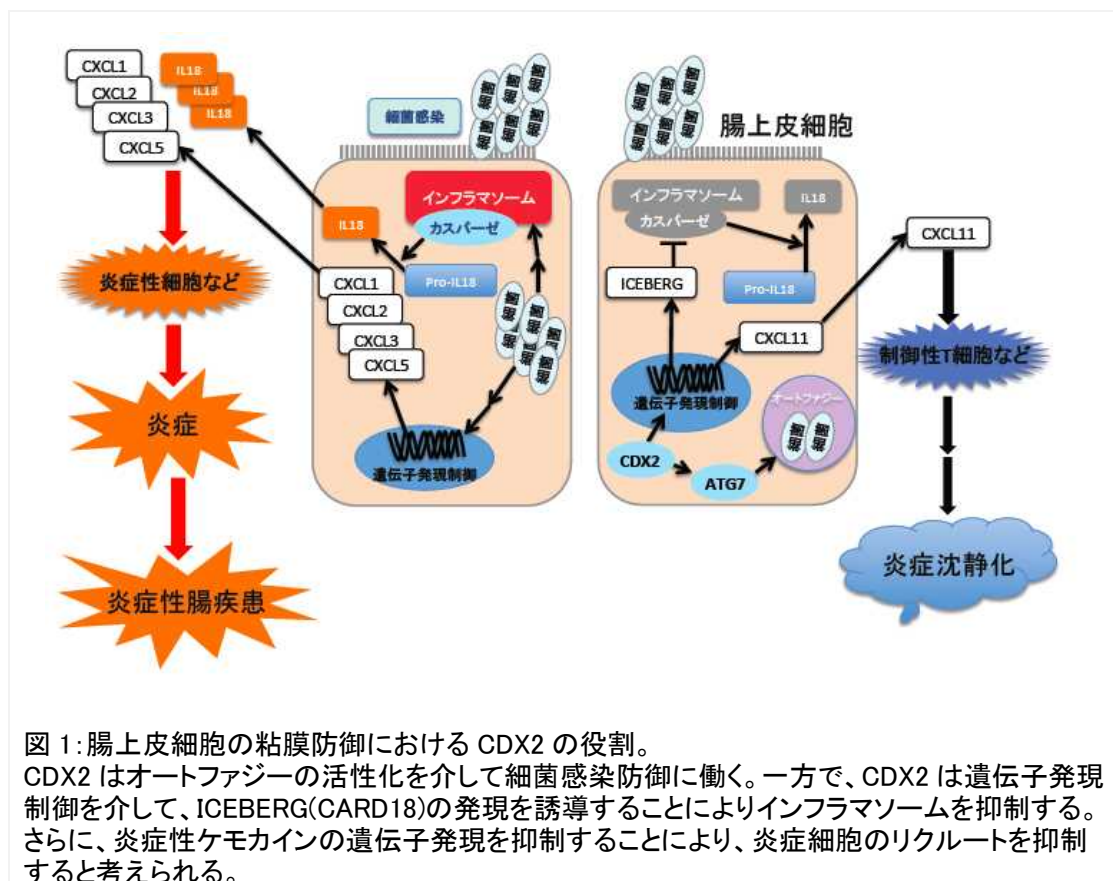
した。また、ICEBERG が腸上皮細胞における細菌感染誘導性のインフラマソームの活性化を抑制することが分かった。ICEBERG 遺伝子は、ヒトゲノムに特異的な遺伝子であり、Caspase 1 の CARD ドメインのホモロジーサーチにより同定された遺伝子であるが、これまでその生理的機能は全く明らかになっていなかった。これらの解析から、ヒトの腸粘膜において、CDX2 は、ICEBERG の発現調節を介してインフラマソームの活性を制御することにより腸上皮細胞由来の IL18 の産生量を制御することが分かった(図 1)。

また、細菌を腸上皮細胞に感染させた場合の遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイにより解析したところ、腸上皮細胞由来として重要な炎症性ケモカインの発現が CDX2 により調節されていることが分かった。とくに CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 などの遺伝子発現が CDX2 により顕著に抑制されることが分かった。ヒト由来の腸上皮細胞株に加えてラット由来の腸上皮細胞株でも同様の結果が得られている。詳細な解析は今後の課題であるが、これらの結果から、CDX2 が腸上皮細胞由来の炎症性ケモカインの発現を調節することにより腸粘膜への炎症性細胞の遊走などを制御していると考えている(図 1)。

これらの結果と一致して、*Cdx1^{+/-}Cdx2^{+/-}* 複合変異マウスに DSS を投与したところ、野生型マウスに比べて短期間に、体重の減少が観察され、生存曲線が短縮されると同時に炎症が増悪することが分かった。これらの遺伝学的解析からも、CDX2 が炎症の抑制因子であると考えている。

「CDX2 によるオートファジー必須酵素 ATG7 の制御機序の解析」

CDX2 によるオートファジー及び ATG7 の活性化機序を解析するために、CDX2 が相互作用する ATG7 複合体に含まれる分子を質量分析法により解析した。その結果、ATG7 と相互作用する候補となる新規タンパク質を約 30 個同定した。それらのタンパク質の中から、ATG7 に結合するタンパク質を 3 個同定した。それらの分子には、機能が未知の分子が 2 個、オートファジーの機能に必須であることがわかっている分子が 1 個含まれていたが、いずれの分子についても、ATG7 との相互作用は報告されていない。また、これらの分子と CDX2 が相互作用することも分かった。CDX2 がこれらの分子との結合を介して ATG7 の活性を制御する可能性やその分子メカニズムの解明については、今後の課題である。



3. 今後の展開

本研究課題において、CDX2 が CARD18 の発現上昇を介してインフラマソームの活性を制御することを見出した。今後、腸上皮細胞におけるインフラマソームの活性調節における CARD18 の役割や、炎症性腸疾患の発症における CARD18 の役割を解析する。とくに CDX2 による *CARD18* の発現制御機構、炎症性腸疾患の病態における *CARD18* の発現異常の可能性を検討する。また、マウスにおける *CARD18* の機能的なホモログに相当する遺伝子の同定を進めることにより、個体レベルでの腸上皮細胞におけるインフラマソームの活性制御機構の解明を目指す。

また、本研究課題では、CDX2 が CARD18 に加えて炎症性ケモカインの発現を制御していることを見出した。これらの炎症性ケモカインには、炎症性細胞の遊走に強く関わる CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 などが多く含まれていた。そこで、CDX2 による免疫細胞遊走シグナルの制御機序の解析を通じて、CDX2 による免疫細胞遊走シグナルの制御が炎症性腸疾患の病態に関与する可能性について検討する。

さらに、本研究課題では、CDX2 によるオートファジーの活性の制御機構の解析において、ATG7 に相互作用する新規分子を同定した。今後、本解析で同定した分子の ATG7 の活性制御における役割及び、それらの分子の腸上皮細胞の粘膜免疫における役割の解明を進める。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究課題では、CDX2 がオートファジーを活性化することを見出したことに基づいて、研究課題を想起し、研究を進めた。一方で、領域総括や領域アドバイザーの助言に従って、研究戦

略を修正し、実験を進めたところ、CDX2 が細菌感染の粘膜防御に働くだけではなく、腸上皮細胞における炎症性のシグナルを強く抑制することなどが分かった。現段階では仮説だが、CDX2 が腸上皮細胞から発信される炎症性シグナルの負の制御において主要な役割を担っていると考えている。これらの仮説が解明できれば腸粘膜における慢性炎症の機序解明に貢献できると考えている。これらのことから、研究のねらいを十分に達成する進捗があったと考えている。ただし、研究全体の進捗が課題提案時の予定よりも遅れており、論文報告を行えていないことから、総合的には評価が低い。今後も本研究課題を進めることにより、課題提案時の目標を達成できるように努める。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

腸管上皮に特異発現するホメオボックス転写因子 CDX2 が、ATG7 に結合してオートファジーを活性化し赤痢菌の細胞内での生存を抑制するほか、転写因子として ICEBERG (CARD18) の発現を上昇させることによりインフラマソームの活性化を抑制して炎症を制御すること、さらには CDX2 変異マウスでは DSS 誘導マウス大腸炎が著しく増悪することを見出している。本研究により、初めて ICEBERG の炎症抑制機能が明らかとなったが、この分子はヒトゲノム特異的な遺伝子であり、CDX2 のより詳細な炎症制御への関与を検討するためには、新たな実験系の工夫などが必要と考えられる。さきがけ研究期間中に異動したにも関わらず、非常に丁寧で着実な研究を継続してきており、今後も残された課題を解決すればさらなる発展が期待できる

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yukiko Nambu, Tatsunari Hayashi, Kyoung-Jin Jang, Koji Aoki, Hiroto Mano, Keiko Nakano, Motomi Osato, Katsu Takahashi, Katsuhiko Itoh, Satoshi Teramukai, Toshihisa Komori, Jun Fujita, Yoshiaki Ito, Akira Shimizu, Manabu Sugai; In situ differentiation of CD8 $\alpha\alpha$ T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. *Scientific Reports*, 2012; 2: 642.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 青木 耕史、谷田 以誠

発明の名称: ATG7 変異体を用いたオートファジーの抑制方法

出 願 人: 福井大学

出 願 日: 2012/12/21

出 願 番 号: 2012-280082

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Roles of intestine-specific homeoprotein CDX2 in the intestinal epithelial barrier

Koji Aoki, Shun-ichiro Iemura, Katsuya Okawa, Isei Tanida, Taira Kobayashi, Hitomi Mimuro, Sanada Takahito, Chihiro Sasakawa, Tohru Natume, Makoto M Taketo and Manabu Sugai;

Poster presentation【2LBA-20】第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 26 日 横浜(パシ

フィコ横浜)

Roles of intestine-specific homeoprotein CDX2 in the intestinal epithelial barrier

Koji Aoki and Mako Nakaya; Poster presentation (2-E-W25-11-P (2014E-0658)) 第43回日

本免疫学会 2014年12月11日 京都