



AUTOPHAGY IN THE INTESTINAL EPITHELIUM REDUCES ENDOTOXIN-INDUCED INFLAMMATORY RESPONSES BY INHIBITING NF- κ B ACTIVATION.

藤島, 佳未

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5206

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005206>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	藤島 佳未
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5206 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

AUTOPHAGY IN THE INTESTINAL EPITHELIUM REDUCES ENDOTOXIN-INDUCED
INFLAMMATORY RESPONSES BY INHIBITING NF- κ B ACTIVATION.(腸管上皮のオートファジ
ーは、NF- κ B 活性化を抑制することで、エンドトキシン誘発性炎症反応を軽減させる)

審 査 委 員

主 査	教 授	匂坂 敏朗
	教 授	横崎 宏
	教 授	西 慎一

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

AUTOPHAGY IN THE INTESTINAL EPITHELIUM REDUCES ENDOTOXIN-
INDUCED INFLAMMATORY RESPONSES BY INHIBITING NF- κ B ACTIVATION.

腸管上皮のオートファジーは、NF- κ B活性化を抑制することで、
エンドトキシン誘発性炎症反応を軽減させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
消化器内科学
(指導教員：東 健 教授)

藤島 佳未

学位論文の内容要旨

腸管上皮のオートファジーは、NF- κ B 活性化を抑制することで、
エンドトキシン誘発性炎症反応を軽減させる

背景と目的

オートファジーは細胞内の大規模分解系の一つであり、生命の維持、分化、成長、ホメオスタシスの保持に不可欠とされている。細胞がある種のストレスにさらされると、細胞質の中で隔離膜が形成され、老廃物や不要なオルガネラなどを取り囲み、オートファゴソームと呼ばれる二重膜が形成される。その後ライソソームと融合し、内容物はアミノ酸やペプチドに分解されて、再利用される。実際、オートファジー関連遺伝子である Atg5、Atg7 のノックアウトマウスは出生後 24 時間以内に死亡することが報告されている。また、神経特異的 Atg5、Atg7 欠損マウスでは、ハンチントン病やパーキンソン病に似た症候を発症し、心臓特異的 Atg5 欠損マウスでは心肥大や収縮不全が認められており、オートファジーと疾患との関与が示唆されている。さらに、Atg5 欠損胎芽ではアポトーシス細胞のクリアランスが障害されることによる組織の炎症が確認され、オートファジー関連遺伝子である beclin1 変異マウスの肝組織ではアポトーシスや組織の障害だけでなく、炎症が確認されていることから、オートファジーの機能不全が炎症の増悪を惹起している可能性も考えられる。

ところで、炎症疾患の病因として、Nuclear factor- κ B (NF- κ B) がよく知られており、非刺激下では NF- κ B は細胞質で inhibitors of NF- κ B (I κ B) と結合している。刺激下では、遊離した NF- κ B が核内に移行することで転写因子として作用し、TNF- α といった炎症性サイトカインの遺伝子を活性化させる。オートファジーと NF- κ B の関係は十分に解明されていないが、heat shock protein 90 (Hsp90) 活性が欠乏している状態では、NF- κ B の賦活化物質である I κ B kinase (IKK) の選択的分解がオートファジー経路を介して行われるという報告があり、オートファジーは NF- κ B シグナルに関与している可能性が示唆される。近年、オートファジーの誘導に必要な遺伝子である Atg16L1 と IRGM1 が炎症性腸疾患 (IBD) の一つであるクローン病の感受性遺伝子として同定され、オートファジーを介した自然免疫がクローン病の感受性に影響を与えている可能性がある。

そこで、我々は腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製して、腸管上皮のオートファジーが、腸管における炎症反応に影響を与えるのかどうかについて検討した。細菌性内毒素の主成分である Lipopolysaccharide (LPS) は Toll-like receptor 4 (TLR4) を介して NF- κ B シグナルを誘導するため、LPS を腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに投与し、NF- κ B シグナルと

オートファジーとの関与を解明しようとした。さらに、上皮細胞由来であるヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞を用いて、上皮細胞における炎症反応にオートファジーが影響を与えるかどうか検討した。

方法

1. オートファゴゾームのマーカーとして使用できる GFP-LC3 を移入した GFP-LC3 トランスジェニックマウスを絶食 24・48 時間後、LPS (100 μ g/mouse) を 7 日間経口投与後、LPS (250 μ g/kgBW) 腹腔内投与後 24 時間後に小腸および大腸を摘出し、抗 GFP 抗体で免疫染色を行った後、腸管上皮におけるオートファジー発現の程度を観察した。また、小腸上皮からはタンパクを抽出し、western blotting 法でオートファゴゾームに発現している LC3-II を確認した。
2. Atg7flox/flox マウスと villin-cre マウスを交配して、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製し、LPS (100 μ g/mouse) を 7 日間経口投与後、LPS (250 μ g/kgBW) 腹腔内投与後 24 時間後に小腸を摘出した。ホルマリン固定後のパラフィン包埋から切片を作製し、HE 染色を行った後、組織学的変化を観察した。また、凍結切片を作製し、上皮細胞以外の細胞 (マクロファージ、T-cell、B-cell、好中球、NK cell) を免疫染色で観察した。さらに、摘出した腸管上皮から RNA および核内タンパクを抽出し、RNA からは炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β) を Real-time PCR 法で測定し、核内タンパクからは NF- κ B の DNA 結合活性を測定した。
3. SW480 細胞にオートファジー阻害作用のある 3MA (10mM) を 3 時間処理後、LPS 100ng/ml を 1 時間投与し、核タンパクを抽出して NF- κ B の DNA 結合活性を測定した。また、オートファジー誘導作用のある rapamycin (5 μ M) を 2 時間処理後、LPS 100ng/ml を 1 時間投与し、同様に NF- κ B の DNA 結合活性を測定した。

結果

1-1. 絶食により腸管でオートファジーが誘導された。

絶食により、腸管上皮の管腔側である絨毛にオートファジーが誘導され、24 時間後より 48 時間後の方が顕著であった。また、大腸よりも小腸の方が優位であった。

1-2. LPS 投与により小腸でオートファジーが誘導された。

ヒトやマウスのマクロファージ細胞では LPS によりオートファジーが誘導されるという報告があり、腸管上皮でも誘導されるかを検討したところ、経口投与および腹腔内投与のどちらでも腸管上皮の絨毛にオートファジーがまばらに誘導されるのが観察できた。

2-1. 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの小腸では組織学的変

化を認めなかった。

HE 染色では、LPS 経口投与、LPS 腹腔内投与後ともにコントロールマウスと比較して、大きな変化は認められなかった。また、オートファジー欠損により自然免疫の異常が引き起こされるかどうかを検討するために、リンパ球、単球、顆粒球、NK cell に発現している CD11b の免疫染色を行ったが、コントロールマウスと比較して、大きな変化は認められなかった。

2-2. LPS 刺激により、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで腸管上皮の TNF- α および IL-1 β の mRNA 発現は亢進していた。

マウスの血球系細胞で Atg16L1 が LPS による炎症反応を制御するという報告があり、腸管上皮細胞での炎症反応を検討した。LPS 投与後、腸管上皮の TNF- α 、IL-1 β は mRNA レベルでコントロールより有意に上昇しており、オートファジーは腸管上皮において炎症反応を制御していることが示唆された。

2-3. LPS 刺激により、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで腸管上皮の NF- κ B の DNA 結合活性は亢進していた。

LPS は TLR4 を介して NF- κ B を活性化させ、様々な炎症性サイトカインの発現を引き起こすことが知られており、オートファジーと NF- κ B の DNA 結合活性との関与を検討した。欠損マウスでは有意に NF- κ B の DNA 結合活性が亢進しており、腸管上皮のオートファジーは NF- κ B シグナル経路を介して、LPS による炎症反応を軽減させることが示唆された。

3. オートファジー阻害下では、SW480 細胞に LPS 処理後の NF- κ B の DNA 結合活性は亢進し、オートファジー誘導下では、軽減していた。

上皮細胞でも、マウスの腸管上皮と同じ結果が認められたことより、オートファジーは NF- κ B シグナル経路を介して、炎症反応を制御していることが強く示唆された。

考察

オートファジーは生体内でホメオスタシスを維持するための分解機構である。最近の組織特異的ノックアウトマウスの研究により、オートファジーが多様な疾患の病因と関連があり、組織での異常タンパク質の蓄積とある疾患類似の症候が確認されるようになってきた。腸管上皮は消化管のホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしており、腸管上皮細胞は機械的バリアーを形成したり、defensin といった抗菌ペプチドを産生したりすることで、粘膜内に侵入しようとする常在細菌を防御していることから、我々は腸管上皮のオートファジーに着目した。本研究で、小腸は大腸よりもオートファジーが誘導されやすいこと、Atg7 欠損マウスの小腸では LPS 刺激により TNF- α や IL-1 β の産生が増強すること、また NF- κ B の活性化も亢進していることを見出し、オートファジーは腸管上皮において、LPS による炎症反応を減少させることが考えられた。

Atg16L1 変異マウスを使用した論文では、LPS 刺激後のマクロファージは IL-1 β の産生が増強していたが、TNF- α の産生は増強していなかったと報告されている。我々の研究では、TNF- α および IL-1 β は共に亢進していたことから、オートファジーシグナルと炎症反応との関係は、腸管上皮細胞とマクロファージ細胞で異なることが予想される。

NF- κ B は、LPS 刺激後 MyD88 依存性シグナル経路を介して活性化される。そのため、腸管上皮のオートファジーは MyD88 依存性シグナル経路を介して NF- κ B 活性化を制御しており、その結果、TNF- α や IL-1 β といった炎症性サイトカインの産生が軽減すると考えられる。Beclin1 変異マウスの肝臓では NF- κ B 活性化と TNF- α 産生が亢進していること、線維芽細胞でオートファジーが NF- κ B inducing kinase (NIK)の発現を選択的に低下させ、NF- κ B 活性化が緩和されていることなどから、NF- κ B 関連シグナルとオートファジーシグナルはマクロファージ以外の様々な細胞で、双方向性に巧みに関与していると考えられる。

結論として、我々は、オートファジーが腸管上皮において生物学的作用を示し、小腸のオートファジーは NF- κ B 経路を介して、炎症反応を制御することを明らかにした。腸管上皮特異的 Atg7 欠損マウスを用いた我々の研究は、オートファジーが NF- κ B 活性化制御と関係しているメカニズムを初めて説明したものである。NF- κ B は IBD を含む炎症性疾患の病因の一つと考えられており、IBD 患者の粘膜では NF- κ B 活性化が検出されていることから、オートファジーが IBD に関与していると考えられる。以上より、NF- κ B 依存性の炎症反応におけるオートファジーの役割を理解することは、まだ原因不明とされる IBD の病因のメカニズムを解明するのに有用であり、将来オートファジーが IBD を含む腸管炎症性疾患に対する治療戦略のターゲットとなりうる可能性を含んでいる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2173 号	氏 名	藤島 佳未
論文題目 Title of Dissertation	AUTOPHAGY IN THE INTESTINAL EPITHELIUM REDUCES ENDOTOXIN-INDUCED INFLAMMATORY RESPONSES BY INHIBITING NF- κ B ACTIVATION. 腸管上皮のオートファジーは、NF- κ B活性化を抑制することで、 エンドトキシン誘発性炎症反応を軽減させる		
審査委員 Examiner	主 査 匂坂 敏朗 Chief Examiner 副 査 横崎 希 Vice-examiner 副 査 西 慎一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】オートファジーは細胞内の大規模分解系の一つであり、生命の維持、分化、成長、ホメオスタシスの保持に不可欠とされている。近年、オートファジーの誘導に必要な因子である Atg16L1 と IRGM がクローン病の感受性遺伝子として同定され、オートファジーを介した自然免疫がクローン病の感受性に影響を与えている可能性がある。最近では、血球系細胞で Atg16L1 が欠損したマウスにおいて、DSS 腸炎を誘発させると増悪するという論文が注目を集めており、腸管の炎症制御におけるオートファジーの関与が指摘されているが、オートファジーの腸管上皮における炎症制御機構は詳しくは解明されていない。そこで、我々は腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製し、LPS により誘導された腸管上皮の炎症に対してオートファジーが制御的に作用するか否かを検討する事を目的とした。

【方法】1. オートファゴソームのマーカーとして使用できる GFP-LC3 を移入した GFP-LC3 トランスジェニックマウスを絶食 24・48 時間後、LPS (100 μ g/mouse) を 7 日間経口投与後、LPS (250 μ g/kgBW) 腹腔内投与後 24 時間後に小腸および大腸を摘出し、腸管上皮におけるオートファジー発現の程度を免疫染色および western blotting 法で観察した。2. Atg7flox/flox マウスと villin-cre マウスを交配して、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製し、組織学的変化を観察した。次に、LPS 刺激による腸管上皮内の炎症反応を、腸管上皮の RNA より炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β) を Real-time PCR 法で測定することで検討した。さらに、腸管上皮の核内タンパクを抽出し、重要な炎症シグナル経路の一つである NF- κ B の DNA 結合活性を測定することで、オートファジーが炎症制御のシグナル経路に関わるか否かを検討した。3. ヒト大腸癌由来細胞である SW480 細胞にオートファジー阻害作用のある 3MA (10mM) を 3 時間処理後、もしくは、オートファジー誘導作用のある rapamycin (5 μ M) を 2 時間処理後 LPS 100ng/ml を 1 時間投与し、核タンパクを抽出して NF- κ B の DNA 結合活性を測定し、マウスの結果と同様な結果が得られるかを検討した。

【結果】1. 絶食 48 時間後および LPS 投与後に腸管上皮の管腔側にオートファジーが誘導され、誘導の程度は、小腸の方が大腸よりも優位であった。2. 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの腸管上皮は、通常状態および LPS 投与後でも形態学的に異常を認めなかった。LPS 投与後、腸管上皮の TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現は、欠損マウスの方がコントロールより有意に上昇しており、オートファジーは腸管上皮において炎症反応を制御していることが示唆された。また、欠損マウスでは核内の NF- κ B の DNA 結合活性も有意に上昇していたことから、腸管上皮のオートファジーは NF- κ B シグナル経路を介して、LPS による炎症反応を軽減させることが示唆された。3. オートファジー阻害下では、SW480 細胞に LPS 処理後の NF- κ B の DNA 結合活性は亢進し、オートファジー誘導下では、軽減していたことから、*in vitro* でもオートファジーは NF- κ B シグナル経路と関与していることが示唆された。

【結論】我々は、オートファジーが腸管上皮において生物学的作用を示し、小腸上皮のオートファジーは NF- κ B 経路を介して、LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生を抑制する方向に作用することを明らかにした。つまり、腸管上皮のオートファジーは NF- κ B 経路を介して腸管内のホメオスターシスを保持しようとしている可能性がある。腸管上皮特異的 Atg7 欠損マウスを用いた我々の研究は、オートファジーが NF- κ B 活性化制御と関係しているメカニズムを初めて説明したものである。NF- κ B はクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) を含む炎症性疾患の病因の一つと考えられており、IBD 患者の粘膜では NF- κ B 活性化が検出されていることから、オートファジーが IBD に関与していると考えられている。以上より、NF- κ B 依存性の炎症反応におけるオートファジーの役割を理解することは、まだ原因不明とされる IBD の病因のメカニズムを解明するのに有用であり、将来オートファジーが IBD を含む腸管炎症性疾患に対する治療戦略のターゲットとなりうる可能性を含んでいる。

本研究は、腸管上皮の炎症制御機構におけるオートファジーの役割を研究したものであるが、クローン病などの炎症性腸疾患の病因を明らかにする上で重要な示唆を与えるものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。