



Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infection

井上, 潤

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5618

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005618>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infection

腸管上皮のオートファジーによる
Citrobacter rodentium 感染の制御

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)

井上 潤

腸管上皮のオートファジーによる *Citrobacter rodentium* 感染の制御

A. 研究目的

オートファジーとは細胞内のタンパクやオルガネラなどの大分解機構であり、主に飢餓応答におけるアミノ酸確保において重要な役割を担っている。この進化的に保存されたプロセスは、オートファゴソームという 2 重の膜構造の形成により開始され、細胞質の内容物を取り囲んだのちにリソソームと融合する。オートファジーにおける必須遺伝子である Atg5 や Atg7 を欠損したマウスは、生後 24 時間以内に死に至ることが知られている。また、オートファジーは細胞増殖、アンチエイジング、抗原提示、ゲノムの安定化、ネクロシスの制御など多くの生理的なプロセスに関与することが報告されている。さらに、オートファジーの機能異常は、がんや神経変性疾患、心筋症、肝疾患、自己免疫性疾患、糖尿病など様々な疾患に関連していることが報告されている。オートファジーはまた、炎症制御においても重大な役割を担っていると考えられている。近年、遺伝子の網羅的解析において、オートファジー関連遺伝子である IRGM1、NOD2、ATG16L1 がクローン病の感受性遺伝子として同定され、腸管の炎症においてオートファジーが重要である可能性が示された。我々はこれまでに、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに対する LPS 刺激によって、腸管における TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現が NF- κ B の活性化を介して亢進することを明らかにした。このことにより、腸管のオートファジーは腸管内のバクテリアなどに対する免疫的な反応を制御している可能性が示唆された。そこで我々は、マウス病原性大腸菌モデルである *Citrobacter rodentium* を腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに感染させることで、細菌感染に対する防御機構において腸管上皮のオートファジーが果たす役割を解析した。

B. 研究方法

Atg7 Flox/Flox マウスと Villin-cre マウスを交配させ、Cre/loxP システムによって腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製した。コントロールマウスとして Atg7 Flox/Flox マウスを用いた。*C. rodentium* を経口ゾンデを用いて 4 週齢のマウスに経口感染させ、体重の変化、および、便中の菌量を経時的に測定した。菌量の測定は、PBS に便を溶解し 100 mg/ml となるように調製したものを MacConkey agar 培地に供し、24 時間培養することで定量した。感染後 7、14、21 日目で直腸を取り出し、10%ホルムアルデヒドで固定し切片を作製した。作製した切片の H/E 染色を行い、腸炎の程度を病理学的スコアにて評価した。病理学的スコアは、hypervascularization、単球浸潤、上皮過形成、上皮障害、顆粒球浸潤の 5 項目を点数化したものの合計とした。また、感染後 14 日目で取り出した大腸の粘膜上皮を採取し、TRIzol に溶解させ RNA を抽出した。抽出した RNA を Reverse Transcription Kit を用い cDNA に逆転写させ、real-time PCR によって TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の mRNA レベルの発現量を解析した。また、感染後 7、14、21 日目で血液を採取し、血中抗 *C. rodentium* IgG 抗体濃度を

ELISA 法にて解析した。さらに、GFP を発現した *C. rodentium* を感染させたマウスの腸管を取り出し、凍結切片を作製し共焦点顕微鏡によって観察を行った。

C. 研究結果

1) 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの *C. rodentium* 感染に対する感受性の解析

C. rodentium に対する感染防御における腸管のオートファジーの役割を検討するため、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスとコントロールマウスに *C. rodentium* を経口感染させた。その結果、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで感染後 10、14、16、21 日後においてコントロールマウスと比べ有意な体重の減少を認めた。また、病理学的には感染後 14 日目、および、21 日目で、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで有意に炎症の増悪を認めた。さらに、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、感染後 14 日目の糞便中の菌量が有意に多く、7 日目でも有意な差は認められなかったものの高値を示した。これらのことから、腸管上皮でオートファジーが欠損することで、*C. rodentium* 感染が増悪することが示唆された。

2) *C. rodentium* 感染時の炎症性サイトカイン発現に対するオートファジーの影響の解析

腸管のオートファジーの欠損が *C. rodentium* に対する炎症反応に影響するの否かを検討するため、感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの腸管上皮から RNA を抽出し、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の mRNA レベルの発現量を real-time PCR にて解析した。その結果、*C. rodentium* 感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの腸管上皮において TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の mRNA レベルの発現亢進を認めた。これらのことから、腸管上皮のオートファジーの欠損によって腸管での *C. rodentium* に対する炎症反応が亢進することが示唆された。

3) 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの血中抗 *C. rodentium* IgG 抗体の測定

我々は、次に、腸管上皮のオートファジーの欠損が *C. rodentium* に対する血中抗体の産生に影響するの否かを検討するため、*C. rodentium* 感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの血清中抗 *C. rodentium* IgG 濃度を ELISA 法によって解析した。その結果、感染 21 日後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、有意に血清中の抗 *C. rodentium* IgG 抗体の産生が亢進していることが観察された。

4) GFP-*C. rodentium* 用いた腸管オートファジー欠損マウスにおける菌の感染局在の観察

腸管のオートファジーの欠損が *C. rodentium* 感染の局在に影響するの否かを検討するため、GFP を発現した *C. rodentium* を感染させ、腸管の切片を共焦点顕微鏡によって観察した。その結果、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウス、ならびに、コントロールマウスともに腸管の粘膜表層に感染局在が観察されたが、両者で大きな差は認められなかった。

D. 考察

近年、臓器特異的オートファジー欠損マウスを用いた研究が広く実施され、オートファジーの機能異常がさまざまな疾患と関連があることが明らかとなってきた。本研究では、腸管のオートファジーが細菌感染に対する防御機構に影響を与えているの否かを検討するため、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに *C. rodentium* を感染させ解析を実施した。腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、*C. rodentium* 感染による腸炎が病理学的に悪化し、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ などの炎症性サイトカインの発現が mRNA レベルで亢進することが明らかとなった。これらのことから、*C. rodentium* に対する炎症反応は腸管上皮のオートファジーによって制御されている可能性が示された。我々のこれまでの研究で、この腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに対して LPS 刺激を行うと、mRNA レベルで腸管の TNF- α 、IL-1 β の発現が NF- κ B の活性化を介して亢進することが確かめられており、オートファジーは、NF- κ B を負に制御することで、*C. rodentium* などの病原体に対する炎症反応を軽減している可能性が示唆されている。

また、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、糞便中の *C. rodentium* の菌量が多く、血中の抗 *C. rodentium* IgG 抗体濃度が上昇していることが明らかとなった。これらのことから、腸管のオートファジーは *C. rodentium* のクリアランスにおいても重要な役割を演じている可能性が示唆された。*C. rodentium* の排除のメカニズムは様々な報告がなされているものの、いまだ解明されていない。*C. rodentium* の排除に重要とされる T リンパ球の動員、INF- γ や TNF- α などの発現上昇は、本研究における *C. rodentium* に感染した腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスでも観察された。オートファジー阻害剤の腹腔内投与によって、*C. rodentium* の排除能が低下したという報告もあるものの、臓器特異的なオートファジー欠損マウスでの報告はこれまでになく、腸管のオートファジーの役割を理解する上で我々の示した結果は非常に重要であると考えられた。

E. 結論

我々の結果は、腸管上皮のオートファジーが *C. rodentium* 感染に対する防御機構において重要な役割を担い、また、*C. rodentium* 感染による腸管の炎症制御においてもオートファジーが重要であることを示した。細菌に対する宿主の防御機構における腸管のオートファジーの役割を理解することは、感染性腸炎の病態の解明や治療法の開発において意義のあることであると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2272 号	氏 名	井上 潤
論文題目 Title of Dissertation	Autophagy in the intestinal epithelium regulates <i>Citrobacter rodentium</i> infection 腸管上皮のオートファジーによる <i>Citrobacter rodentium</i> 感染の制御		
審査委員 Examiner	主 査 田 崎 尚 Chief Examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner 副 査 森 康子 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

[背景・目的]

オートファジーは細胞内のタンパクやオルガネラなどの大分解機構であり、主に飢餓応答におけるアミノ酸確保において重要な役割を担っている。近年、複数のオートファジー関連遺伝子がクローン病の感受性遺伝子として同定され、腸管の炎症においてオートファジーが重要である可能性が示されている。さらに、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、LPS 刺激による炎症性サイトカインの発現量の上昇が認められ、腸管のオートファジーが腸管内の細菌などに対する免疫的な反応を制御している可能性が示唆されている。そこで本研究では、細菌感染に対する防御機構において腸管上皮のオートファジーが果たす役割を解析した。

[方法]

1. 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの作製

オートファジー関連遺伝子 Atg7 の Floxed マウス (Atg7 Flox/Flox マウス) と Villin-cre マウスを交配させ、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製し、コントロールマウスとして Atg7 Flox/Flox マウスを用いた。

2. *C. rodentium* 感染に対する防御機構の解析

C. rodentium を4週齢のマウスに経口感染させ、体重の変化、便中の菌量を経時的に測定した。感染後7、14、21日目まで直腸を採取し、H/E染色を行い、腸炎の程度を病理学的スコアにて評価した。感染後14日目の大腸粘膜上皮を採取し、real-time PCR によって TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の mRNA レベルの発現量を解析した。また、感染後7、14、21日目まで血液を採取し、血中抗 *C. rodentium* IgG 抗体濃度を ELISA 法にて解析した。さらに、GFP 発現 *C. rodentium* を感染させたマウスの腸管を取り出し、凍結切片を作製し共焦点顕微鏡にて観察を行った。

[結果]

1. 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの *C. rodentium* 感染に対する感受性の解析

腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスでは、コントロールマウスに比べ *C. rodentium* 感染により有意な体重減少を認め、病理学的解析から有意な炎症の増悪が認められた。また、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスでは、感染後14日目の糞便中の菌量が有意に多く、7日目でも高値を示した。

2. *C. rodentium* 感染時の炎症性サイトカイン発現に対するオートファジーの影響の解析

C. rodentium 感染14日後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの腸管上皮では、コントロールマウスと比べ TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の mRNA の発現亢進が認められた。

3. 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの血中抗 *C. rodentium* IgG 抗体の測定

C. rodentium 感染 21 日後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスでは、有意に血清中の抗 *C. rodentium* IgG 抗体の産生亢進が認められた。

4. 腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおける *C. rodentium* の感染局在の観察

腸管上皮特異的オートファジー欠損マウス、ならびに、コントロールマウスにおいて、GFP 発現 *C. rodentium* の腸管粘膜表層への感染局在がともに観察されたが、両者で大きな差は認められなかった。

[考察ならびに結論]

本研究では、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、*C. rodentium* 感染による腸炎の増悪化、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ などの炎症性サイトカインの発現の mRNA レベルでの亢進が認められ、*C. rodentium* に対する炎症反応が腸管上皮のオートファジーによって制御されている可能性が示された。また、糞便中の *C. rodentium* の菌量の増加、血中の抗 *C. rodentium* IgG 抗体濃度の上昇が腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて認められたことから、腸管のオートファジーは *C. rodentium* のクリアランスにおいても重要な役割を演じている可能性が示唆された。これらのことから、*C. rodentium* 感染に対する防御機構のみならず、*C. rodentium* 感染による腸管の炎症制御においてもオートファジーが重要であることが示された。従って、今後、細菌に対する宿主の防御機構における腸管のオートファジーの役割を理解することは、感染性腸炎の病態の解明や治療法の開発において意義のあることであると考えられた。

本研究は、細菌感染に対する防御機構において腸管上皮のオートファジーが果たす役割について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。

The candidate, having completed studies on “Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infection”, with a specialty in gastroenterology, and having advanced the field of knowledge in the area of mucosal immunology in the intestine, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph. D. (Medicine).