

氏 名	窪田 美紀
(ふりがな)	(くぼた みのり)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 1122 号
学位審査年月日	令和2年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Autophagy deficiency exacerbates colitis through excessive oxidative stress and MAPK signaling pathway activation (オートファジー欠損は酸化ストレスの増加と MAPK シグナル伝達経路の活性化を介して大腸炎を悪化させる)
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 田中 慶太郎 教授 高井 真司

学位論文内容の要旨

《背景と目的》

クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される炎症性腸疾患は、消化管に慢性炎症を引き起こす難治性腸疾患である。ゲノムワイド関連解析による炎症性腸疾患の発症メカニズムの解明に関する研究から、オートファジーに関連する遺伝子が疾患感受性遺伝子として同定された。オートファジーは細胞内分解システムの一つであり、細胞死や発生分化、免疫の制御といった様々な生体内現象と関連している。また腸上皮細胞は腸内細菌叢や食事抗原に対する免疫応答を制御するバリア機能の役割を担っている。腸上皮細胞におけるオートファジーは、腸の恒常性を維持するため重要であり、オートファジー不全では消化管の炎症が増悪することが報告されているが、その機序は未だ解明されていないことも多い。今

我々は、腸上皮細胞におけるオートファジーと炎症との関連を明らかにすることを目的として、腸上皮細胞特異的にオートファジー遺伝子である *Atg5* をノックアウトしたマウス、および *Atg5* をノックダウンした小腸上皮細胞を用いて検討を行った。

《方 法》

1. *Atg5* 遺伝子ノックアウトマウスおよび腸炎の作製

Atg5 flox マウスと *vilin-Cre* 発現マウスを交配させ、雄の *Atg5 flox/flox* mice を作製し、腸管上皮特異的 *Atg5* KO mice とした。8-10 週齢の wild type mice (WT) と *Atg5 flox/+* mice、*Atg5 flox/flox* mice に対し、6 日間、2.5% dextran sulfate sodium (DSS) を飲水させ、腸炎を作製した。DSS 投与してから 8 日目にマウスを sacrifice して、大腸組織を採取し、腸炎の評価を行った。

2. *Atg5* 遺伝子ノックダウン細胞の作製および in vitro 実験

Atg5 をノックダウンしたラット腸上皮細胞 IEC-6 (IEC6sh*Atg5* cells) は、3 つの shRNA 発現プラスミドを移入して作製した。これらの細胞を用い、過酸化水素(H_2O_2) 刺激による cell viability およびアポトーシスの変化を検討した。また RT-PCR 法を用い、オートファジー抑制による炎症性サイトカイン遺伝子の発現変化を検討した。さらに、活性酸素(ROS) 除去剤である N-Acetyl-L-cysteine (NAC)、および mitogen activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路の阻害薬である MEK 阻害剤を添加し、western blot 法にて NF- κ B p65 のリン酸化を評価することで、オートファジー抑制と炎症性サイトカイン遺伝子発現との関連を検討した。

《結 果》

1. DSS 腸炎の評価

Atg5 flox/+ mice では WT と同程度の体重減少であったが、*Atg5 flox/flox* mice では有意に体重減少が増悪した。WT と比較して *Atg5 flox/flox* mice では腸管長が有意に短縮し、組織学的スコアが上昇し、炎症性サイトカイン遺伝子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α) の発現が有意

に上昇した(RT-PCR 法)。これらの結果より腸上皮細胞の *Atg5* をノックアウトしてオートファジーを抑制すると、腸炎が悪化することが示された。

2. Cell viability とアポトーシス

IEC-6 と IEC6shAtg5 に H₂O₂ を添加して cell viability を測定したところ、IEC-6 と比較して shAtg5IEC-6 では cell viability が H₂O₂ 濃度依存的に著明に低下した。また caspase-3 の基質である PARP1 の cleavage を Western blot 法にて調べたところ、H₂O₂ 濃度依存的に PARP1 の cleavage が著明に増強した。これらの結果よりオートファジーを抑制すると apoptosis が増強することにより、cell viability が低下することが示唆された。

3. 炎症性サイトカインと NF-κB

IEC6shAtg5 cells における炎症性サイトカイン遺伝子の発現を RT-PCR 法で測定したところ、IEC-6 cells と比較して IL-1β、IL-6、TNFα の mRNA 発現が著明に上昇していた。また IEC-6 cells と IEC6shAtg5 cells をそれぞれ LPS で刺激したところ、両者とも LPS 濃度依存的に炎症性サイトカイン遺伝子の発現が上昇した。オートファジーの関与をさらに確実にするため、IEC-6 cells に 3-Methyladenine (3-MA) を添加して薬剤的にオートファジーを抑制したところ、IL-1β、IL-6、TNFα の mRNA 発現が著明に上昇した。さらに NF-κB p65 のリン酸化を western blotting にて検討したところ、IEC6shAtg5 cells では、NF-κB p65 のリン酸化が著明に亢進していた。

4. ROS と MAPK シグナル伝達経路

オートファジー抑制による ROS の蓄積と、炎症性サイトカイン発現上昇との関連を検討するため、IEC6shAtg5 cells に ROS 除去剤である NAC を添加したところ、有意に IL-1β、IL-6、TNFα の mRNA 発現が低下した。

また MAPK シグナル伝達経路は酸化ストレスの刺激によって活性化され、NF-κB 伝達経路を活性化する。IEC6shAtg5 cells に MEK 阻害剤を添加して MAPK シグナル伝達経路を阻害したところ、IL-1β、IL-6、TNFα の mRNA 発現は有意に抑制され、オートファジー抑制による ROS の蓄積が、MAPK シグナル及び NF-κB 伝達経路を介して炎症性サイトカイン発現を上昇させることが示された。

《考 察》

今回我々は、消化管における自然免疫応答の生体バリア機構として重要な腸上皮細胞におけるオートファジーが、腸炎に及ぼす影響について検討を行った。マウスにおいて腸上皮細胞特異的に *Atg5* をノックアウトすると、DSS 腸炎は著明に悪化した。その機序として、オートファジーが抑制されると細胞内に酸化ストレスが蓄積し、MAPK シグナル伝達経路を介して、NF- κ B p65 のリン酸化を亢進させることが示唆された。またオートファジーの抑制によりアポトーシスが亢進することも関与していると考えられた。腸上皮細胞においてオートファジー不全は炎症と密接に関与しており、今後、オートファジーをターゲットとした炎症性腸疾患の治療法の開発が期待される。

論文審査結果の要旨

炎症性腸疾患の発症メカニズムの解明に関する研究から、オートファジーに関連する遺伝子 *ATG16L1* と *IRGM* が疾患感受性遺伝子として同定された。オートファジーは、ユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内分解システムの一つであり、細胞内の不要なタンパク質を分解し、生体の恒常性を維持している。オートファジーは炎症性腸疾患の発症に深く関わっているが、炎症性腸疾患の腸上皮細胞におけるオートファジーの役割は未だ解明されていない点が多い。今回、申請者らは、腸上皮細胞特異的に *Atg5* をノックアウトしたマウス (*Atg5 flox/flox mice*) を用い、腸炎における腸上皮細胞のオートファジーの役割を検討した。さらにオートファジーがどのような分子メカニズムで炎症に関わっているのか明らかにするため、*Atg5* をノックダウンした小腸上皮細胞を用いて検討した。

結果として、*Atg5 flox/flox mice* では、wild type mice と比較して DSS 腸炎が著明に悪化した。ラット小腸上皮細胞株である IEC-6 の *Atg5* をノックダウンすると (IEC6sh*Atg5* cells)、アポトーシスが亢進し、cell viability が有意に低下した。またオートファジーの抑制により炎症性サイトカイン遺伝子の発現が著明に上昇した。さらに、腸上皮細胞のオートファジー不全により炎症が惹起される分子機構として、オートファジーが抑制されると、細胞内に活性酸素種が蓄積することで MAPK シグナルが活性化し、NF- κ B p65 のリン酸化が亢進することが明らかとなった。

本研究の結果より、腸上皮細胞におけるオートファジー不全が炎症を惹起する新たな機序が明らかとなった。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

PLoS One. 14(11): e0225066, 2019 Nov

doi: 10.1371/journal.pone.0225066.