

146. 炎症性腸疾患に関わる CDX2 を介した粘膜防御機構の解明

中谷 真子

福井大学 医学部 生命情報医科学講座 薬理学領域

Key words : オートファジー, 腸上皮細胞, 炎症性腸疾患

緒言

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患は、小腸や大腸粘膜に慢性炎症を引き起こす難治性疾患である。これらの疾患への罹患率が著しく増加している一方で、対症療法はあるものの根本的治療法は確立されておらず、有効な治療法の開発が不可欠となっている。近年、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) 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、細胞内分解システムの一つであるオートファジーが発症原因に関与していることが明らかとなった^{1,2)}。これまでに腸管の粘膜免疫において免疫細胞が炎症抑制に主要な役割を果たすことは知られているが、上皮細胞による粘膜免疫防御については未解明である。私たちは、腸上皮細胞に特異的に発現する CDX2 の機能解析を通して、細菌感染において CDX2 がオートファジーの活性調節に重要な役割を有することを見出した。これまでに、CDX2 は哺乳類の腸上皮細胞に特異的に発現するホメオボックス転写因子であり、腸上皮細胞の発生、分化、恒常的機能に不可欠な因子であるとともに、大腸がんの抑制因子であることが報告されている。本研究において CDX2 の転写機能以外のユニークな機能に着目し、腸管の上皮細胞によるオートファジーの活性制御機構について解析したので報告する。

方法および結果

1. CDX1 と CDX2 は caudal-related homeobox 遺伝子ファミリーのメンバーであり、ホメオドメイン転写因子をコードしている。いずれも腸上皮細胞に特異的に発現し、腸上皮細胞の発生、分化、恒常的維持に不可欠な因子であるとともに、大腸癌抑制因子である。*Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスでは、*Cdx2*^{+/-}マウスに比べて CDX2 の発現量がより低下していた (data not shown)。CDX2 と腸炎の関係について調べるため、*Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスを用いて、潰瘍性大腸炎モデルである DSS 腸炎を用いて腸炎を誘導した。DSS 腸炎モデルは、DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) を経口投与することで腸炎が誘発される。

その結果、DSS 腸炎を誘導した *Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスの大腸において、炎症と出血が認められた (図 1A)。また、*Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスの大腸粘膜下層において細胞の浸潤と組織構造の破壊が認められた (図 1B)。*Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスでは、DSS 投与 2 日目から顕著に体重が減少し始め、生存率についても顕著に低下した。これらの結果から、CDX2 が腸炎の発症に重要な分子であることが明らかとなった。

2. 近年の研究から、炎症性腸疾患の発症にオートファジーの活性化が関与することが示唆されている。そこで、Tet (テトラサイクリン) によって CDX2 の発現を制御可能なヒト大腸上皮細胞 DLD1 細胞を作製し、CDX2 によるオートファジーの活性化調節における機能を検討した。

CDX2 を発現誘導した DLD1 細胞から CDX2 複合体を抽出して質量分析を行った。その結果、CDX2 結合タンパク質の一つに ATG7 を同定した。ATG7 はオートファゴソームの形成に必須の分子で、オートファジーの活性化に重要な分子である。また、CDX2 のオートファゴソーム形成への関与を調べるため、chloroquine 処理によりオートファゴソームの分解を阻害し、オートファジー活性化マーカーである LC3-II の発現量を免疫染色により調べた。その結果、CDX2 の発現誘導により、LC3-II の発現量に増加が認められ、オートファゴソームの形成が促進されていることが示

された。また、ウエスタンブロットにおいても、CDX2 の発現誘導により LC3-II の発現に増加が確認された。これらの結果から、腸上皮細胞において CDX2 がオートファジーの活性化制御に重要な分子であることが明らかとなった。

3. CDX2 がオートファジーの活性化にはたらくことが示唆されたため、*in vitro* において細菌感染を行い、CDX2 の細菌感染防御能について検討した。CDX2 発現誘導細胞において、*Shigella flexneri* による細菌感染を行った結果、細胞内の細菌増殖率が顕著に抑制された (図 1C)。そこで、CDX2 の発現を shRNA によりロックダウンして細菌感染を行った場合を検証した。その結果、CDX2 による細菌増殖抑制は解除され、CDX2 が細胞内における細菌増殖を抑制していることが示された (図 1D)。さらに、CDX2 がオートファジー必須酵素である ATG7 と結合する結果が得られたことから、shRNA により ATG7 をロックダウンして CDX2 による細菌増殖抑制が ATG7 を介しているかどうかについて調べた。その結果、CDX2 を発現誘導した細胞において、ATG7 を発現抑制した場合、CDX2 による細菌増殖抑制能が解除されたことより、CDX2 による細菌増殖抑制は ATG7 を介していることが示された。また、オートファジーの活性化阻害剤である 3-MA (3-メチルアデニン) で処理することにより、CDX2 がオートファジーの活性制御に関与しているかどうかについて検討した。その結果、CDX2 によって抑制された細菌増殖は 3-MA 処理により解除されたことから、CDX2 がオートファジーの活性化制御に関与していることが明らかとなった。その結果、CDX2 によって抑制された細菌増殖は 3-MA 処理により解除されたことから、CDX2 がオートファジーの活性化を介した細菌感染防御に重要な分子であることが明らかとなった。

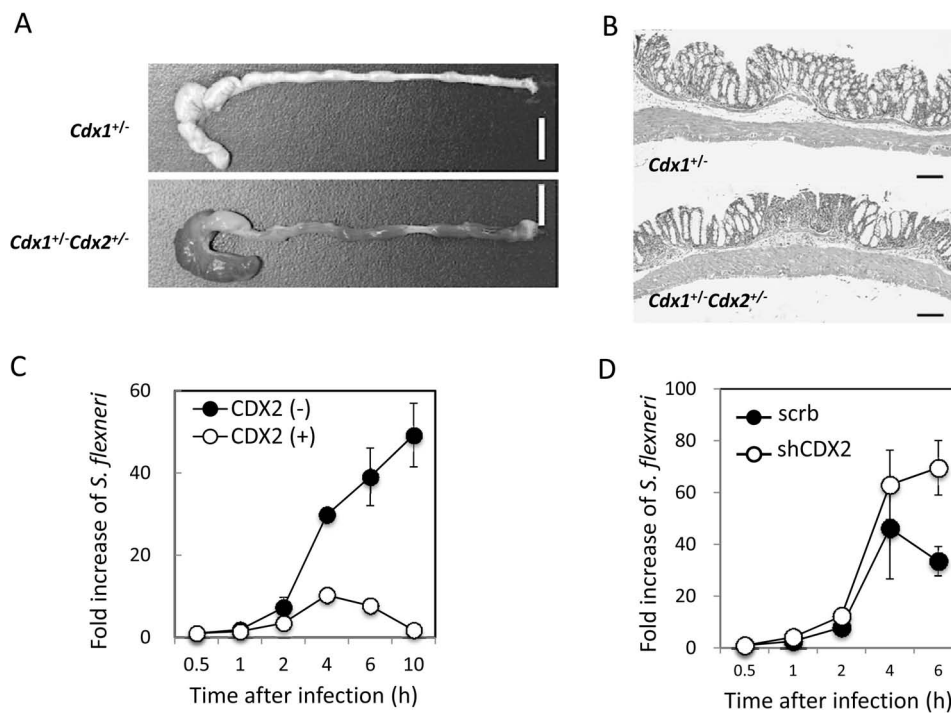


図 1. 腸管における CDX2 の粘膜防御機能と細菌感染防御機能

(A, B) *Cdx1*^{+/-}マウス、および *Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスに 5% DSS を経口投与して腸炎を誘導した。

(A) *Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスの大腸組織において炎症と出血が認められた。Scale bar: 10 mm.

(B) *Cdx1*^{+/-}*Cdx2*^{+/-}マウスの大腸粘膜下層において細胞の浸潤と組織破壊が認められた。Scale bar: 400 μm.

(C, D) 腸上皮細胞における CDX2 の細菌感染防御機能について検証した。

(C) DLD1 細胞において、CDX2 を発現誘導することにより細胞内の細菌増殖が抑制された。

(D) CDX2 を shRNA によりロックダウンすることにより、CDX2 の細菌増殖抑制能が解除された。

考 察

Cdx2 遺伝子変異マウスにおいて潰瘍性大腸炎モデルである DSS 腸炎を用いた実験から、CDX2 が腸炎の炎症病態に重要な分子であることが明らかとなった。また、CDX2 の結合因子としてオートファジー必須酵素である ATG7 を同定するとともに、CDX2 が ATG7 を介してオートファジーを活性化することを明らかにした。さらに、CDX2 によるオートファジーの活性化は細菌感染防御に働くことが示された。これらの結果から、CDX2 は腸粘膜における細菌感染防御に不可欠な役割を担い、腸管における粘膜免疫防御機構において重要な分子であることが明らかとなった。今後は、CDX2 が ATG7 と結合することにより、どのようにオートファジーを活性化しているのかについて明らかにしていく予定である。また、細菌感染性の炎症性腸疾患モデルを用いて、CDX2 によるオートファジー活性制御による細菌感染防御能を個体レベルで明らかにしたいと考えている。さらに、腸上皮細胞において、CDX2 による炎症シグナル制御機能についても解析を進めることにより、炎症性腸疾患の新たな治療標的の提案への応用を目指す。

文 献

- 1) Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Büning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JJ, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H; International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):119-24. doi: 10.1038/nature11582. PubMed PMID: 23128233; PubMed Central PMCID: PMC3491803.
- 2) Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, Ripke S, Lee JC, Jostins L, Shah T, Abedian S, Cheon JH, Cho J, Daryani NE, Franke L, Fuyuno Y, Hart A, Juyal RC, Juyal G, Kim WH, Morris AP, Poustchi H, Newman WG, Midha V, Orchard TR, Vahedi H, Sood A, Sung JJ, Malekzadeh R, Westra HJ, Yamazaki K, Yang SK; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium.; International IBD Genetics Consortium., Barrett JC, Franke A, Alizadeh BZ, Parkes M, B K T, Daly MJ, Kubo M, Anderson CA, Weersma RK. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*. 2015 Sep;47(9):979-86. doi: 10.1038/ng.3359. PubMed PMID: 26192919; PubMed Central PMCID: PMC4881818.