

小胞体ストレス応答から迫る炎症性腸疾患の病態解析と臨床応用

金沢医科大学 総合医学研究所

教授 岩脇 隆夫

(共同研究者)

群馬大学医学部附属病院	診療教授	草野 元康
群馬大学医学部附属病院	診療准教授	柿崎 暁
群馬大学医学部附属病院	講師	栗林 志行
群馬大学医学部附属病院	医員	中山 哲雄

はじめに

炎症性腸疾患は炎症が生じる腸疾患の総称で、潰瘍性大腸炎とクローン病が主な疾患である。炎症性腸疾患は厚生労働省の難病に指定されており、本邦で罹患患者が増加している。炎症性腸疾患の病態には多くの要因が関与していることが推測されているが、近年自然免疫応答異常が病態形成に強く関与していることが明らかになってきた。炎症性腸疾患でのゲノム研究により、多数の炎症性腸疾患感受性遺伝子が同定され、その中に自然免疫応答と細胞ストレス(特にオートファジーと小胞体ストレス)に関与する分子が数多く含まれている⁽¹⁻³⁾。

この炎症性腸疾患と細胞ストレスの関連についての検討は主にマウスなどで行われてきたが^(4, 5)、近年、ヒトの大腸や小腸の生検組織を用いた検討でも、炎症性腸疾患と細胞ストレスとの関連が報告されつつある^(6, 7)。これらの報告では潰瘍性大腸炎とクローン病で内視鏡所見で活動性のある部位と活動性のない部位における細胞ストレス状況が調べられている。しかし、この検討では内視鏡所見と細胞ストレス状況との対応は検討されているものの、病理学的所見との対比は行われていない。今回、我々はヒトの生検組織を用いて特に小胞体ストレス応答とオートファジーの検討を行い、炎症性腸疾患との関連について明らかにしたいと考えている。

結 果

回腸終末及び大腸の各部位(右半結腸、左半結腸、直腸)より生検を1箇所ずつ行う。なお、内視鏡及び組織学的所見による病変活動性評価に関しては、それぞれの疾患で提唱されている評価法で行う。小胞体ストレス応答、オートファジーおよび炎症の評価は生検標本を溶解して抽出するRNAおよびタンパク質を用いる。mRNAの定量には各分子に特異的なTaqmanプローブおよび対応するプライマーを用いたリアルタイムPCR法により行う。タンパク質の定量およびリン酸化と複合体形成の確認には各分子に特異的な抗体を用いたELISA解析、ウエ

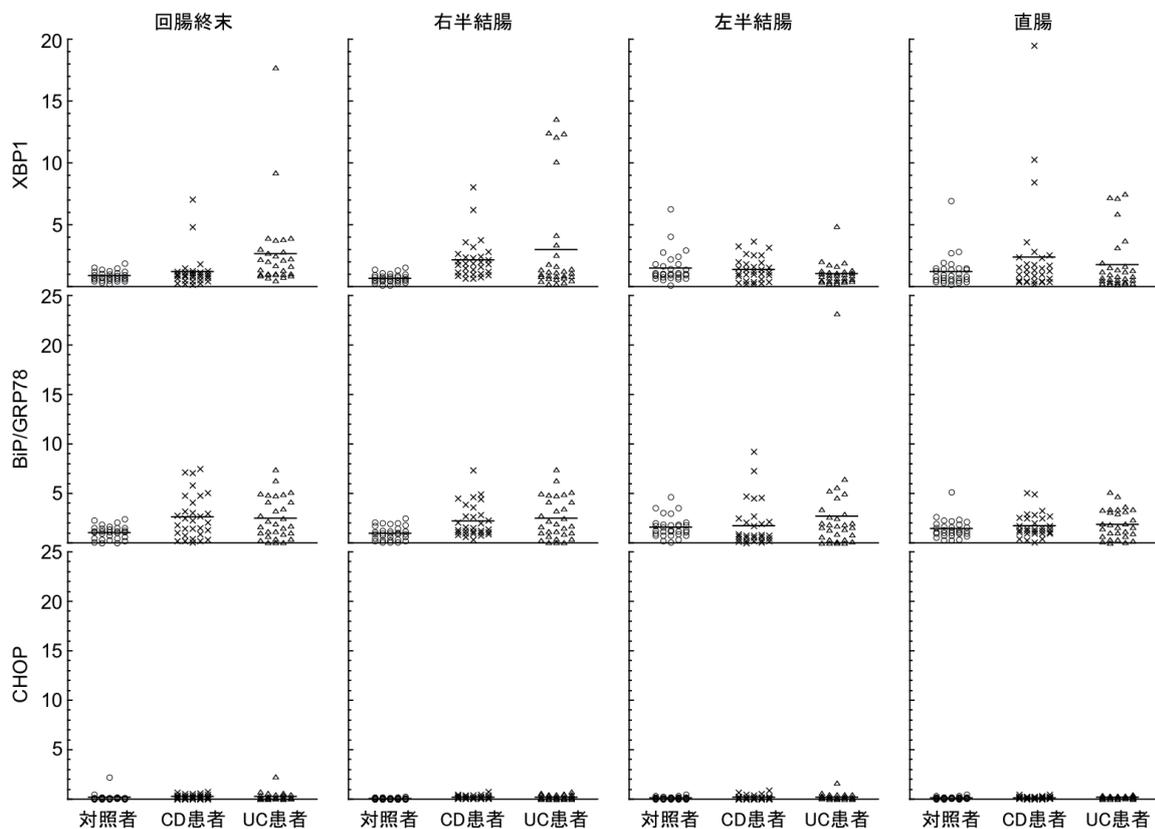
スタンブロット解析、および免疫沈降解析により行う。得られた数値的データは適切に統計学的処理を行い、各検査群間の差異をグラフ上にプロットして示す。

小胞体ストレスは小胞体膜上に存在する3種類の膜貫通型タンパク質（ATF6、IRE1、およびPERK）により感知される。通常時、これら小胞体ストレスのセンサータンパク質は主要な小胞体分子シャペロンのひとつであるBiP/GRP78と小胞体内腔で結合し、その機能を抑制されている。しかし細胞内で小胞体ストレスが生じると、BiP/GRP78はそれらセンサータンパク質から解離して、構造異常タンパク質に作用するようになる。BiP/GRP78の抑制から解除されたATF6はゴルジ体へと移行し、そこでS1PおよびS2Pによりプロセッシングを受け、小胞体領域と細胞質領域に切断される。ATF6とは異なり、IRE1はBiP/GRP78の解離および小胞体内構造異常タンパク質の直接結合によって小胞体膜上で二量体化または多量体化する。これによりIRE1自身に備わるキナーゼ活性を利用して自己リン酸化が引き起こされる。さらに、このリン酸化はIRE1自身に備わるRNase領域の活性化も引き起こし、XBP1mRNAの特異的なスプライシングを誘導する。PERKはIRE1と同様にBiP/GRP78の解離および小胞体内構造異常タンパク質の直接結合によって小胞体膜上で二量体化または多量体化する。これによりPERK自身に備わるキナーゼ活性を利用して自己リン酸化が引き起こされる。二量体化または多量体化で高まったPERKのキナーゼ活性はタンパク質翻訳の開始に関わるeIF2 α のリン酸化も促進して、ATF4のタンパク質産生を特異的に誘導する。最終的に、切断された細胞質領域側のATF6タンパク質やスプライシング型XBP1mRNAから産生されるXBP1タンパク質、産生誘導されたATF4タンパク質は、いずれも核へ移行して転写因子として機能しながら小胞体ストレスを軽減するための遺伝子発現誘導に寄与する。この小胞体ストレス応答で発現誘導される遺伝子には小胞体タンパク質の品質管理に働く小胞体分子シャペロンをコードするものが多く、BiP/GRP78はその代表である。上述のERストレス応答は細胞に対して保護的に働くものであるが、ストレスの持続時間が長い場合や強度が高い場合には細胞に対して致死的に働く応答経路もある。IRE1の場合、TRAF2との相互作用を介してASK1を活性化し、JNK経路からのアポトーシスを誘導する。またCaspase-2に対して抑制的に働くmiRNAを直接切断することによって細胞を死に向かわせることも報告されている。その他、アポトーシス誘導性転写因子であるCHOPはATF4やATF6を介して小胞体ストレスにより誘導されることも分かっている。以上の知見より、小胞体ストレスの評価は上述分子の活性化状態および発現状態から判断される。なお、ORMDL3は小胞体に局在する膜タンパク質であり、小胞体ストレスの軽減や小胞体内Ca濃度の恒常性に機能することが分かっているが、小胞体ストレスの評価には使いづらい分子特性である。

オートファジーの誘導に重要な細胞内の反応系は少なくとも4つに分けられ、その1つが(1) mTORキナーゼの抑制を介したULK1の活性化である。通常時、mTORはATG13をリン酸化することでオートファジー誘導を負に調節している。これは高度にリン酸化されたATG13の

ULK1への結合能が低くなってしまふことに起因する。しかし、栄養飢餓や病原体の感染などによってmTORキナーゼが抑制されてATG13のリン酸化レベルが低下すると、ULK1はATG13などと複合体を形成してキナーゼとしての機能を発揮するようになる。(2) クラスⅢのPI3K複合体形成もオートファジーの誘導に必須である。この複合体にはVSP34、Beclin-1、p150、およびATG14などが含まれ、これらにより膜脂質であるホスファチジルイノシトールはリン酸化されてホスホイノシチド3-リン酸が産生される。(3) ATG12-ATG5-ATG16L1複合体形成もオートファジーの誘導に必須である。ATG12はユビキチン様タンパク質であり、E1様酵素であるATG7およびE2様酵素であるATG10との反応後にATG5と共有結合する。さらにATG16L1はその複合体と非共有結合性の相互作用を経て、ATG12-ATG5-ATG16L1複合体を形成する。またATG12-ATG5-ATG16L1複合体は、ATG16L1の自己多量体化能を利用してより大きな複合体を形成する。(4) ホスファチジルエタノールアミン結合性LC3の産生もオートファジーの誘導に必須である。LC3前駆タンパク質は、ATG4プロテアーゼによりC末端をプロセシングされる。その後、E1様酵素であるATG7およびE2様酵素であるATG3との相互作用を経て、LC3はホスファチジルエタノールアミンと共有結合する。この反応には先述のATG12-ATG5-ATG16L1複合体も関与する。また、ホスファチジルエタノールアミン結合性LC3はオートファゴソームの膜成分のひとつとして機能することが分かっている。オートファジーは細胞質における自己の大規模消化を伴うバルク分解系であるが、p62/SQSTM1はLC3に直接結合して選択的に分解される基質として知られる。炎症性腸疾患との関連性が深いとされる

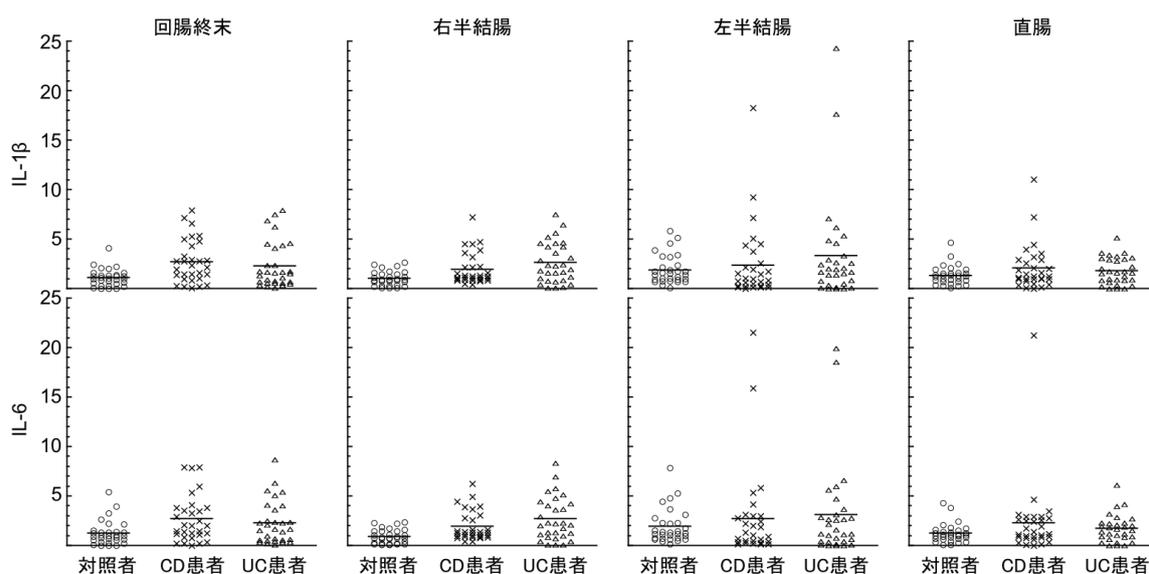
図1 小胞体ストレス評価マーカー



ATG16L1は、上述の機能以外にも重要な役割を持つことが報告されている。例えば、NOD2刺激によって活性化される炎症性サイトカイン (IL-1 β および IL-6) の産生を末梢血単核細胞にて負に制御している。また、ATG16L1はIRGMを介してNOD2およびULK1と複合体を形成してオートファジーを正に制御している。以上の知見より、オートファジーの評価は上述分子の活性化状態および発現状態から判断される。

本研究において目標症例数を潰瘍性大腸炎 (UC) 患者で30名、クローン病 (CD) 患者で30名、対照者で30名と設定している。ちなみに、これらのヒトから得た貴重なサンプルを無駄にできないため、後で示すデータには含まれていないが、マウスの微量腸組織からの予備実験は念入りに繰り返している (会計報告との整合性のため敢えて説明した)。平成28年12月6日、ようやく計画していた生検標本 (360箇所) を全て回収完了した。平成29年2月20日にRNAを、同年3月1日にタンパク質を各生検標本から抽出完了した。そして3月末までに各生検標本に由来するmRNAを用いたリアルタイムPCR解析からXBP1、BiP/GRP78、CHOP、IL-1 β 、IL-6の発現解析結果を得ている (図1と2)。なお解析時の内部標準にはGAPDHを用いている。

図2 炎症評価マーカー



考 察

以上の結果から小胞体ストレスおよび炎症の状況を部分的に伺い知ることができるが、タンパク質を用いた解析も後に行っていかなければならない。特にオートファジーに関してはmRNAの発現解析ではほとんど調査できていないのでタンパク質を対象にした実験が必要であるが、現段階では抗体などの解析試薬を購入する資金が不足しており中断を余儀なくしている。また共同研究者からの内視鏡所見データとmRNAやタンパク質の分子生物学データを合わせた相関解析も行う必要があり、それらの統計解析を準備している。

要 約

潰瘍性大腸炎 (UC) 患者 30 名、クローン病 (CD) 患者 30 名、そして対照者から 30 名から回腸終末及び大腸の各部位 (右半結腸、左半結腸、直腸) の生検を行い、各生検標本から抽出した mRNA を用いて小胞体ストレス応答および炎症の評価をリアルタイム PCR 法により行った。

文 献

1. Barrett JC *et al*, "Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease" *Nat Genet*, 40, 955-962, 2008.
2. Kaser A *et al*, "XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease" *Cell*, 134, 743-756, 2008.
3. McGovern DP *et al*, "Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci" *Nat Genet*, 42, 332-337, 2010.
4. Cadwell K *et al*, "A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells" *Nature*, 456, 259-263, 2008.
5. Adolph TE *et al*, "Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation" *Nature*, 503, 272-276, 2013.
6. Bogaert S *et al*, "Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease?" *PLoS One*, 6, e25589, 2011.
7. Negroni A *et al*, "Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response are involved in paediatric inflammatory bowel disease" *Dig Liver Dis*, 46, 788-794, 2014.