

CDX2 発現低下による炎症性腸疾患の発症機序の解明

福井大学学術研究院医学系部門医学領域

生命情報医科学講座薬理学分野

中谷 真子

1. はじめに

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。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。

2. 方法

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と腸炎と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腸炎を誘導した。5%のDSS (デキストラン硫酸ナトリウム) 溶液を自由飲水で*Cdx1^{+/-}Cdx2^{+/-}*マウスに投与した。

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、Dox (ドキシサイクリン) によってCDX2の発現を制御可能なヒト大腸上皮細胞株DLD1を用いて、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。まず、CDX2の発現を誘導した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オートファジー必須酵素であるATG7を同定した。そこで、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、オートファジーの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。

3) CDX2がオートファジーの活性化に機能する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。まず、CDX2を発現誘導したDLD1細胞、およびCDX2をshRNAによりノックダウンした細胞に*Shigella flexneri* (YSH6000) (東京大学医科学研究所笹川千尋名誉教授、三室仁美准教授との共同研究) をMOI 100で感染させ、細胞内における細菌数をカウントした。また、ATG7をshRNAによりノックダウンしてCDX2を発現誘導した細胞において、*S. flexneri* (YSH6000) を感染させた。

3. 結果

1) *Cdx1^{+/-}Cdx2^{+/-}*マウスでは、5%のDSS投与開始後3日目より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 (図1A, B)。また、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、*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。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) Chloroquine処理によりオートファゴソームの分解を阻害した結果、CDX2を発現誘導したDLD1細胞において、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観察

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 (data not shown)。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に重要な分子であることが明らかとなった。

3) CDX2発現誘導細胞において、*S. flexneri* (YSH6000)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2A)。そこで、CDX2の発現をshRNAによりノックダウンして細菌感染を行った。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2B)。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ていることから、shRNAによりATG7をノックダウンして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機能が解除された。この結果から、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 (図2C)。また、オートファジーの活性化阻害剤である3MA (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3MA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 (図2D)。これらの結果から、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。

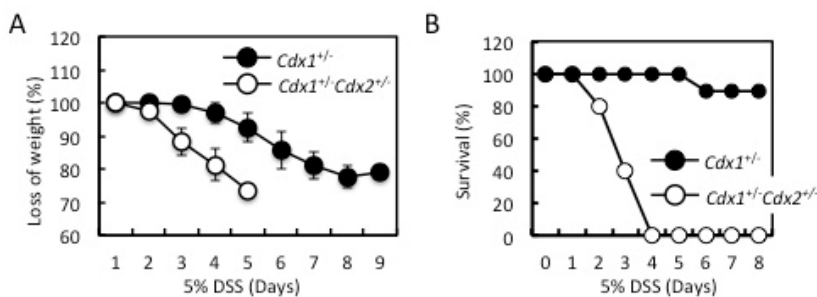


Figure 1. *Cdx1^{+/-}Cdx2^{+/-}*マウスにおけるDSS腸炎
*Cdx1^{+/-}*マウス、および *Cdx1^{+/-}Cdx2^{+/-}*マウスに5% DSSを投与し、腸炎を誘導した。
 (A) *Cdx1^{+/-}Cdx2^{+/-}*マウスでは顕著な体重の減少が認められた。(B) *Cdx1^{+/-}Cdx2^{+/-}*マウスでは顕著に生存率が低下した。

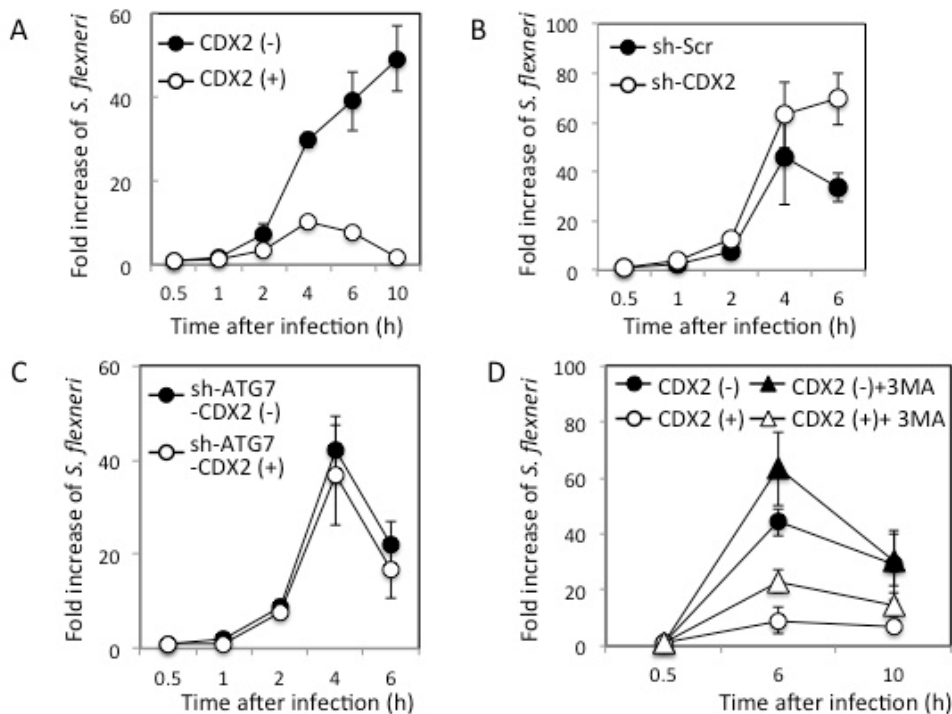


Figure 2. CDX2によるオートファジーを介した細菌感染防御機能
 (A) DLD1細胞において、CDX2を発現誘導することにより細胞内の細菌増殖が抑制された。
 (B) CDX2をshRNAによりノックダウンすることにより、細胞内の細菌増殖が亢進した。
 (C) ATG7をshRNAによりノックダウンすることにより、CDX2による細菌増殖抑制機能が解除された。
 (D) オートファジー阻害剤 (3-メチルアデニン; 3MA) 処理により、CDX2による細菌増殖抑制機能が解除された。

4. 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を同定し、CDX2がATG7を介してオートファジーを活性化することが示された。そして、CDX2によるオートファジーの活性化は細菌感染防御にはたらくことが明らかとなった。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。また、DLD1細胞から細胞質タンパク質を分離し、内在性のCDX2とATG7の結合について検討したところ、細胞質においてCDX2とATG7の結合が確認された。今後は、CDX2とATG7の結合部位を決定するとともに、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、CDX2によるオートファジー活性化制御による細菌感染防御能について、*Cdx2*遺伝子変異マウスに腸管に感染する細菌を経口感染させることにより、個体レベルでCDX2の細菌感染防御能の解明を進めている。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を目指す。

5. 参考文献

1. Aoki K, Tamai Y, Horiike S, Oshima M, Taketo MM. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in *Apc*^{+/ Δ 716}*Cdx2*^{-/-} compound mutant mice. *Nat Genet.* 2003 Dec;35(4):323-30.
2. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC. *et al.*, Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012 Nov 1;491(7422):119-24.
3. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A. *et al.*, 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.