

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592012

研究課題名（和文）上皮細胞におけるSLPIによるpIgRの発現抑制について

研究課題名（英文）Regulation of pIgR expression by SLPI in epithelial cells

研究代表者

岩瀬 孝志（IWASE TAKASHI）

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：80125046

研究成果の概要：腸管などの粘膜組織に特異的に発達した粘膜免疫機構では上皮細胞で産生されたpIgRと呼ばれる蛋白が重要な働きをしている。このpIgRは粘膜上皮にのみ産生されるが、皮膚などの上皮細胞では産生されない。上皮細胞におけるpIgRの産生の相違が蛋白分解を阻害するSLPI蛋白によるNF- κ Bの活性化の低下によることを明らかにした。また、ヒトの腸管や唾液腺におけるSLPIとpIgRの組織内局在の検索からも生体内でpIgRの産生がSLPIによる抑制が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：(1) SLPI (2) NF- κ B (3) pIgR (4) 免疫染色 (5) 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

粘膜組織は扁平上皮とことなり、その多くは1層の上皮細胞によって外界と接しており、絶えず外界からの細菌などの侵襲を受けている。そのため、粘膜組織にはいくつかの粘膜に特異的な防御機構が存在する。分泌型IgA (SIgA) は1962年にTomasiらによって

発見された、粘膜組織に特異的な免疫防御機構である。粘膜免疫は粘膜上皮下の形質細胞で産生・分泌されたdimeric IgAは上皮細胞で産生されたpolymeric immunoglobulin receptor (pIgR)と結合した後、上皮細胞内を通過し、SIgAとして管腔内(外界)に放出される。dIgAの産生機構やIgRの産生機構に

については多くの検索がなされている。pIgRの産生機構に関してはHT-29細胞などの大腸癌由来の培養細胞を用いて各種サイトカインやLPSによる刺激による産生能を遺伝子発現および蛋白産生について検索が行われている。腸上皮細胞におけるpIgRの組織内発現については古くから絨毛の下部でpIgRの発現を見るが、絨毛上部では認めないことが知られている。また、唾液腺の検索においても全ての導管上皮細胞や腺房細胞にpIgRの発現を認めない。

このようなpIgRの発現の相違がどのような機構によるものかは現在まで検索されていない。また、扁平上皮のpIgRの発現抑制機構についても解明されていない。

2. 研究の目的

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)は扁平上皮細胞に発現し、各種の感染や外傷の治癒過程などにみられるprotease inhibitorのひとつである。SLPIは扁平上皮細胞に強い発現を、腸上皮細胞ではパネット細胞に発現することが報告されている。

また、マクロファージ由来の培養細胞をLPS刺激によるサイトカインの発現にSLPIが抑制的に働くことが報告されている。これらのことから上皮細胞におけるpIgRの発現がSLPIによって抑制されていると考え、扁平上皮癌由来の培養細胞におけるSLPIの発現抑制によりpIgRの発現の変化を観察し、シグナル伝達機構、pIgRとSLPIの組織内局在の検索について検索を行い、pIgRの発現が粘膜上皮細胞に特異的である機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) NUSD-1細胞の作成

NUSD-1細胞は以下のように作成した。はじめにSLPIのPCR productをpBlueScript IIに

組み込み、そのexon4を含む部にneomycin resistant geneを導入しtargeting geneを作成した。targeting geneを扁平上皮癌由来のCa9-22細胞に電気穿孔法で導入した後、geneticinでselectionを行い、最終的に目的の細胞を得た。細胞から得られたRNAを用いてRT-PCR法によりSLPIおよびpIgRの発現を確認した。さらに、NUSD-1細胞の産生したpIgRがdIgAを結合するか否か、NUSD-1細胞をculture chamberを用いて培養後、精製ヒトpolymeric IgAと1時間反応させ、続いてFITC抗ヒトIgA抗体(DAKO社)で1時間反応後、検鏡するIgA binding testを行った。

(2) HT-29細胞におけるSLPIによるpIgR産生の抑制

ELISA: SLPIを1または10ng/mlになるように添加した培地でHT-29細胞またはNUSD-1細胞を3日間培養し、試料を得た。抗ヒトSC抗体(DAKO社)をPBSで希釈し96well titer plateに50 μ l分注し、一晚インキュベートする。5%BSA/PBSでブロッキングした後、サンプルおよびスタンダードを分注し、1時間反応後、Hrp標識抗ヒトSC抗体(DAKO社)と反応後、OPDで発色し、plate readerで測定した。

免疫染色: 上記結果から培地にSLPIを10ng/mlになるように添加した培地でHT-29細胞またはNUSD-1細胞を3日間培養した後、95%エタノールで5分固定後、PBSで洗浄した。続いて10%正常swine血清でブロッキングした後、Hrp抗ヒトSC抗体と反応後、DABで発色、核染後封入後、検鏡した。

(3) NUSD-1細胞におけるNF- κ B活性の検索
NUSD-1細胞をTNF- α またはINF- γ を、またはSLPIを培地に添加し10, 20, 30, 60分間培養した後、細胞質抽出物を得た。得られた抽出物は通法に従いSDS-PAGEを行い、続いてnylon membraneにtransferを行った。

Membraneは5%BSA/PBSでブロッキングした後、NF- κ B, I κ B α , I κ B β , I κ κ α , I κ κ β の各抗体と1時間、続いて、Hrp-抗ウサギIgG抗体と1時間反応後、ECL plusと反応させ、フィルムに露光し、現像した。

(4) SLPIおよびpIgRの組織内局在の検索。
ヒト腸管および唾液腺の凍結切片またはパラフィン切片を用いた。切片を10%正常swine血清でブロッキングした後、抗ヒトSLPI抗体と反応後、RITC抗マウスIgG抗体と反応させ、その後、FITC抗ヒトSC抗体と反応後、蛍光顕微鏡で検鏡する、蛍光抗体二重染色法を用いた。または、SLPIおよびpIgRの局在を酵素抗体法で検索した。

4. 研究成果

(1) 本検索で使用した培養細胞 NUSD-1は扁平上皮癌由来のCa9-22細胞におけるSLPIの発現を抑制した結果、新たに粘膜上皮が発現するpIgRを発現するようになった培養細胞である(図1, 2)。pIgRは抗ヒトSC抗体と反応し、また、IgA binding testの陽性結果からpIgRはpIgAの結合能を有していることが明らかである(図3 a, b)。

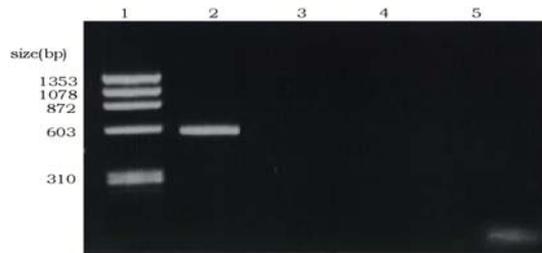


図1 RT-PCRによるSLPIの発現の解析
lane 1: ϕ X174 HaeIII, lane 2: Ca9-22細胞, lane 3: 1E10細胞,
lane 4: 3E10細胞, lane 5: HT-29細胞

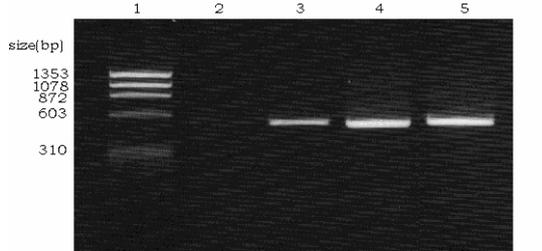
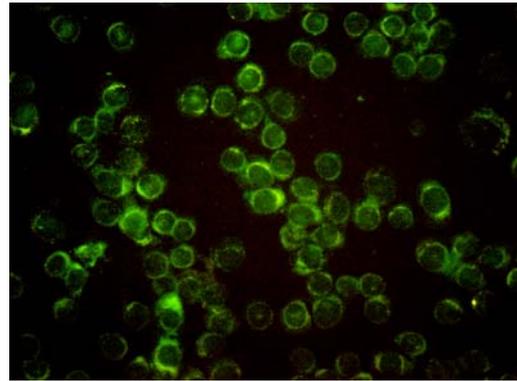
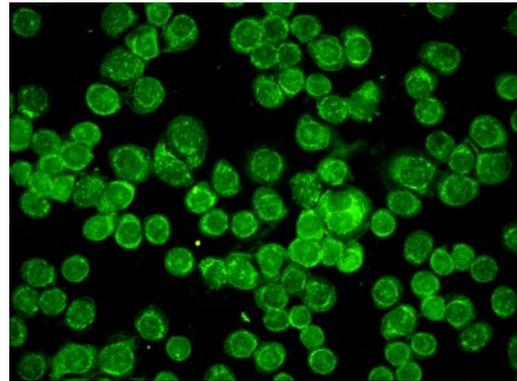


図2 RT-PCRによるpIgRの発現
lane 1: ϕ X174 HaeIII, lane 2: Ca9-22細胞, lane 3: 1E10細胞,
lane 4: 3E10細胞, lane 5: HT-29細胞



a: pIgRの局在



b: IgA binding test

図3 NUSD-1細胞におけるpIgRの局在とIgA binding test

(2) HT-29細胞はpIgRを定常的に発現するが、培地にSLPIを $1\mu\text{g/ml}$ または $10\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように添加して1, 2および3日間培養した後、ELISA法で培地に分泌されたpIgR量を検索した結果、SLPIによりpIgR分泌量は 8ng/ml から 5ng/ml へと約50%減少した。また、SLPIの濃度により大差は認めなかった(図4 a)。しかし、1および2日の検索では今回用いた方法では検出限界以下であり、今後、再現性のある濃縮法が必要である。HT-29細胞はSalmonella(S) minnesota由来のLPS($10\mu\text{g/ml}$)刺激によりpIgRの発現の増加が知られている。HT-29細胞をS minnesota由来のLPS($10\mu\text{g/ml}$)およびSLPI($10\mu\text{g/ml}$)の存在下で3日間培養し、ELISA法およびWestern blot法で培地に分泌されたpIgR量を検索した結果、LPSの添加によりpIgR濃度は 10ng/ml から 20ng/ml に増

加を示したが、SLPI および LPS と SLPI を培地に添加すると pIgR 濃度は両者とも 5ng/ml に大きく減少した (図 4 b)。

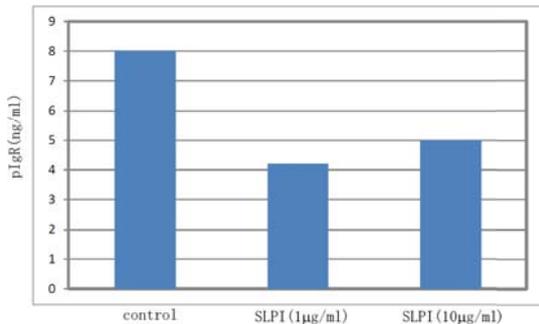


図4a HT-29細胞にSLPIを添加した培地で3日培養後の上清中のpIgR量

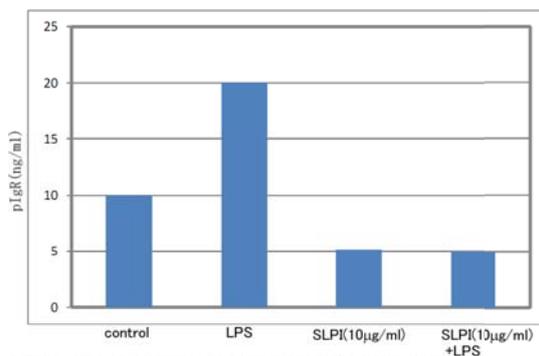
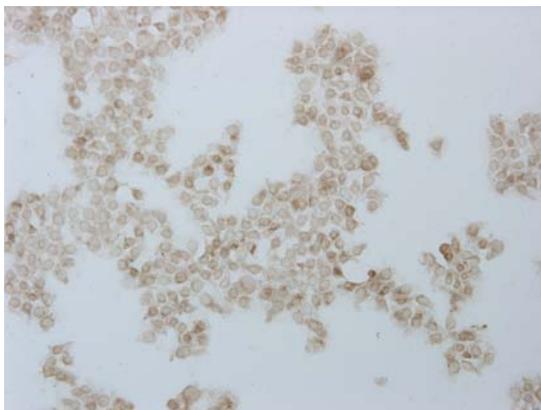


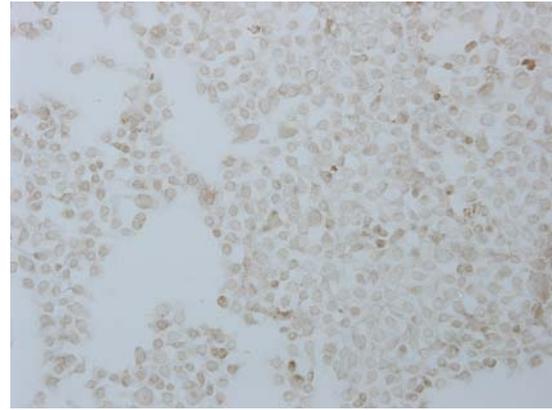
図 4 b HT-29細胞にSLPIを添加した培地で3日培養後の上清中のpIgR量

また、HT-29 細胞および NUSD-1 細胞を同様に SLPI 含む培地で培養した結果、両細胞とも SLPI により pIgR 陽性細胞が減少する傾向を示した (図 5a, b)。

以上結果から SLPI は pIgR を恒常的に発現する上皮細胞においても pIgR の発現を大きく抑制することが確認された。



a: control



b: SLPI

図 5 a, b HT-29 細胞における SLPI による pIgR の発現抑制

(3) 扁平上皮癌由来の Ca9-19 細胞における SLPI を抑制し、pIgR を発現する NUSD-1 細胞における pIgR の発現と NF-κB の活性化との関係について検索を行った。

その結果、NUSD-1 細胞および Ca9-22 細胞において NF-κB および IκBα の発現を TNF-α または INF-γ の刺激の有無におよび刺激時間に関係なく認めたが、IκBβ の発現は NUSD-1 細胞では明らかな発現を認めたが、Ca9-22 細胞では明らかな発現を認めなかった。さらに、IκBβ は Ca9-22 細胞では強く、NUSD-1 細胞では弱い発現を示した。これらの結果は SLPI が IκBβ の発現に関与することと符合し、pIgR の発現に関与している事が示唆された (図 6)。

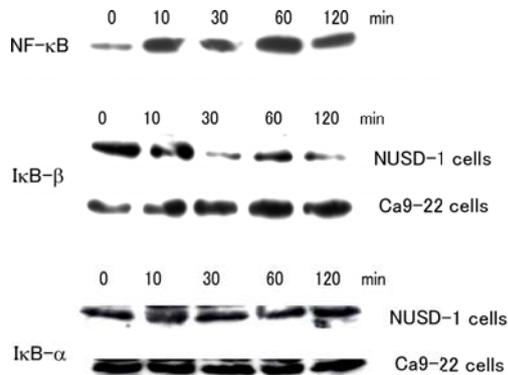


図6 NUSD-1細胞における NF-κB, IκB-α and IκB-β の発現

(4) SLPI および pIgR の組織内局在についてヒト腸管 (凍結切片、ホルマリン固定パラ

フィン包埋切片) およびヒト唾液腺 (ホルマリン固定パラフィン包埋切片) を用いて酵素抗体法または蛍光抗体法による免疫組織染色法を用いて検索を行った。

その結果、ヒト腸管において pIgR は上皮細胞の細胞質に局在を認めましたが、杯細胞などその他の細胞には認めなかった。また、SLPI も一部の上皮細胞にその局在を認めた。しかし、凍結切片による蛍光抗体二重染色法により SLPI と pIgR の両者の局在を示す上皮細胞は認めなかった (図7)。さらに、唾液腺では pIgR は漿液性腺房細胞、半月、導管上皮細胞にその局在を認めましたが、SLPI は一部の粘液性腺房細胞に局在を認めた (図8)。

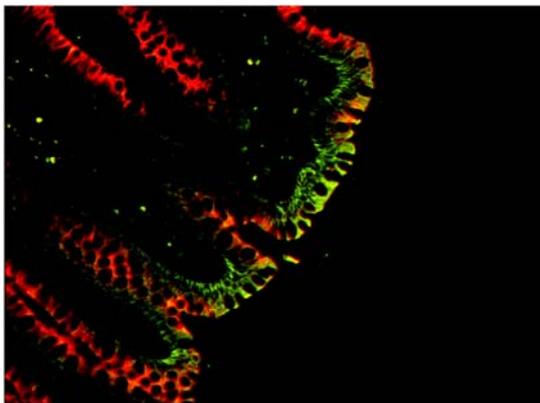
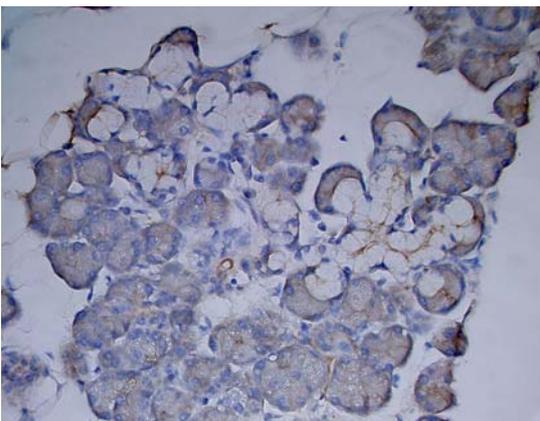
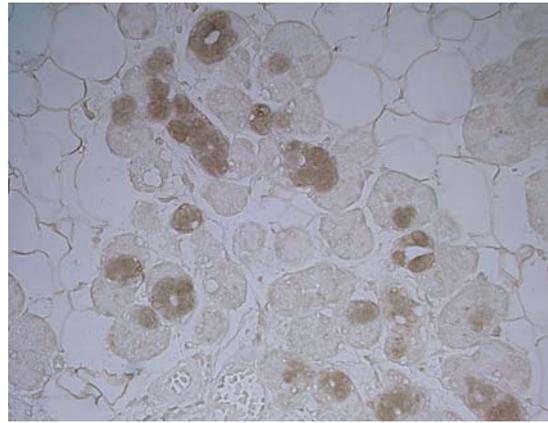


図7 ヒト腸管におけるpIgRとSLPIの局在
SLPI (RITC) and pIgR (FITC)



pIgRの局在



SLPIの局在
図8 ヒト顎下腺におけるpIgRとSLPIの局在

これらの結果は SLPI と pIgR の発現が相補的であり、生体内においても培養細胞においても同様な結果が得られたことから、pIgR の発現が生体内においても SLPI により抑制されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

①岩瀬 孝志：上皮細胞における SLPI による pIgR 発現調節 第38回 日本免疫学会総会 2008年12月2日京都

〔産業財産権〕

○取得状況 (計1件)

名称：分泌型白血球プロテアーゼ阻害蛋白の産生を抑制した哺乳動物細胞株、その作製法および利用法

発明者：茂呂 周、岩瀬孝志

権利者：日本大学、茂呂 周、岩瀬孝志

種類：特許

番号：第 41266903

取得年月日：平成20年5月23日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩瀬 孝志 (IWASE TAKASHI)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：80125046

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：