

研究種目：萌芽研究
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19659475
 研究課題名（和文）侵襲下腸粘膜細胞アポトーシス誘導における TIR ファミリーレセプターの役割の研究
 研究課題名（英文）The role of TIR family receptors in the apoptosis of the intestinal epithelium under endotoxemia.
 研究代表者
 寺嶋真理子 (Terashima Mariko)
 兵庫医科大学・医学部・助教
 研究者番号 00412015

研究成果の概要：本研究では IL-18 knock out マウス (KO) を用いて lipopolysaccharide (LPS) 投与によりエンドトキシン血症モデルを作成し、空腸、回腸の apoptosis と TIR ファミリーである IL-18 および TLR4 の関連を調べた。空腸ではエンドトキシンにより IL-18 濃度が減少して TLR4 の発現と apoptosis が増加し、IL-18 濃度は TLR4 の発現に關与している可能性が示唆された。しかし、回腸では IL-18 と TLR4 の関係は明らかではなかった。本研究により IL-18 はエンドトキシン血症下の TIR レセプターファミリーの発現に關与すること、腸管の部位により働きが異なる可能性が示唆され、現在さらに解析を進めている。

交付額

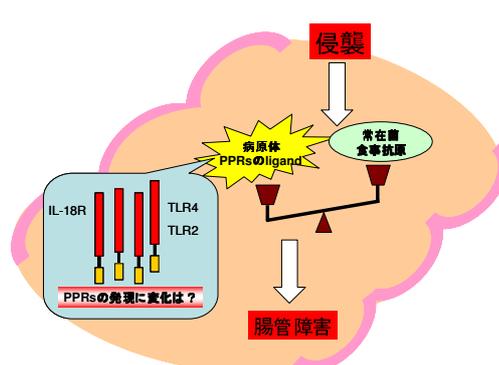
(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	0	2,700,000
2008 年度	600,000	0	600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

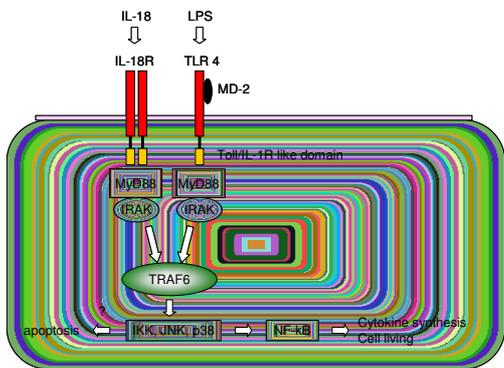
研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学
 キーワード：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

敗血症のような侵襲下では正常な免疫応答が阻害されており、過度の炎症反応状態 (SIRS) から一転して免疫抑制状態 (CARS) や多臓器不全 (MOF) に陥って死に至る。このとき、敗血症患者の臓器障害は主にリンパ球と消化管上皮細胞に見られるが、これらの細胞死のメカニズムは必ずしも明らかでは



ない。通常、腸管内には大量の共生（常在）菌、栄養素などの食事抗原が日常的に存在していることから、腸管粘膜免疫システムには必然的に2つの機能が要求される。1つ目は圧倒的な量の多種多様の抗原物質の中から病原体抗原を識別すること、もう一つは大量の非病原性抗原に対する免疫寛容を維持することである。これらの現象は腸上皮細胞上の病原体関連分子パターン pattern recogniton receptors (PRRs; 病原体認識レセプター) の発現により部分的に説明される。つまり、腸上皮細胞は Toll-like receptors (TLRs)などの PRRs を発現し、非常に高濃度の病原体やある種のサイトカインが存在する場合には PRRs を介したシグナルが病原体抗原を識別する一方で、通常の共生常在菌に対しては TLRs の発現を低く保ち、腸粘膜における免疫反応を寛容状態に維持するということである。TLRs などの PRRs の細胞内ドメインは共通しており、I 型 IL-1 レセプターに類似しているため、Toll-IL-1R (TIR) domain と呼ばれ、細胞内シグナルはほとんど共通である。すなわち、リガンドがレセプターに結合するとすべて最終的に I κ B のリン酸化と崩壊と NF- κ B の活性化および MAP kinase の活性化を引き起こす。



IL-18 は、自己免疫疾患をはじめ、さまざまな炎症性疾患への関与が疑われており、敗血症などの侵襲下でも長く血中に検出され、レセプターは TLR などと同じく TIR domain をもつことが知られている。しかし、IL-18 が疾患の病態発現に関与しているかどうかは不明である。そこで本研究では、敗血症下の腸上皮細胞におけるこれらのシグナル伝達に着目し、敗血症下で腸上皮細胞が寛容状態から自然免疫反応を来し、粘膜障害を起こ

す機序として TLRs などの PRRs や、IL-18 の関与を検討する。

2. 研究の目的

本研究では、敗血症下の腸上皮細胞における病原体関連分子パターン pattern recogniton receptors (PRRs; 病原体認識レセプター) のシグナル伝達に着目し、敗血症下で腸上皮細胞が寛容状態から自然免疫反応を来し、粘膜障害を起こす機序として TLRs などの PRRs や、IL-18 の関与を検討するものである。

3. 研究の方法

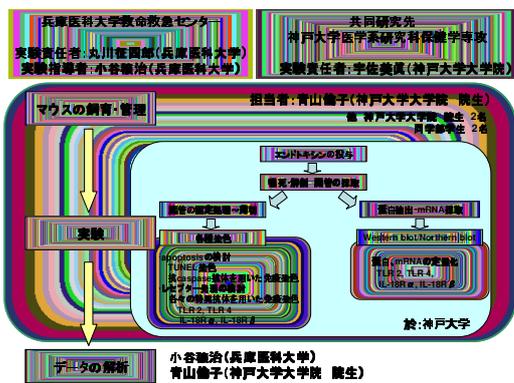
IL-18KO マウスと Wild type (WT) マウス (C57/BL6J) を用いたエンドトキシン (Etx) 血症モデルを作成 (LPS: *E. coli* O111:B4 Sigma、40 mg/kg をマウス腹腔内に投与して



作成) し、control には PBS を投与した。投与後 24 時間に犠牲せしめ、空腸（胃幽門部から 2cm）、回腸（盲腸から 3cm）を採取した（内訳: 雄 WT マウス PBS 群 3 匹、LPS 群 2 匹、KO マウス PBS 群 3 匹、LPS 群 4 匹、雌 WT マウス PBS 群 4 匹、LPS 群 6 匹、KO マウス PBS 群 4 匹、LPS 群 5 匹）。採取したマウス腸管をパラフィン包埋し、4 μ m の切片を作成したのち、抗 cleaved caspase-3 抗体、抗マウス IL-18R α ヤギ IgG 抗体、抗マウス IL-18R β ヤギ IgG 抗体を用い、二次抗体としてポリマー試薬を反応させ免疫組織化学酵素抗体染色法を行った。apoptosis 数は絨毛 10 本に対する平均細胞数として算出し、IL-18R α 、 β 数は 3 視野の細胞数をカウントし、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を%で算出した。統計学的解析には t 検定を用い、p 値が 0.05

以下を有意差ありと判定した。また、PBS 群と LPS 群の比較では\$; $p < 0.05$, \$\$; $p < 0.01$ 、WT と KO の比較では#; $p < 0.05$ とした。また、同部位の腸管から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR にて TLR4 と IL-18 の発現量を検討した。

マウスの管理・飼育実験は神戸大学医学系研究科保健学専攻でおこなう。この実験施設ではマウスの飼育・管理及び実験のいずれにおいても方法が確立しており、本実験について、神戸大学の動物実験委員会、遺伝子実験委員会の承認も得られている。以下に具体的な研究体制を図で示す。



4. 研究成果

空腸、回腸とも cleaved caspase-3 陽性細胞は絨毛上皮細胞で見られ、陰窩では見られなかった。IL-18R 陽性細胞は粘膜固有層リンパ球であった。絨毛上皮の cleaved caspase-3 陽性細胞は空腸では絨毛先端以外の部位 (図 1a) にも見られたが、回腸では絨毛先端部分のみ (図 1b) であった。IL-18R 陽性細胞の局在は空腸でも回腸でも同様の部位で見られた (図 2)。これらに雌雄差は見られなかった。

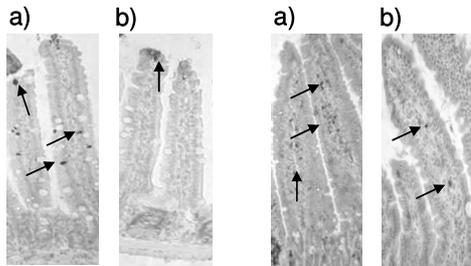


図 1.cleaved caspase-3 陽性細胞 a)空腸、b)回腸

図 2.IL-18R 陽性細胞 a)空腸での IL-18R α b)回腸での IL-18R β

<空腸: 表 1>PBS 群に比べ LPS 群では、雌雄ともに WT の IL-18R α でのみ有意 ($p < 0.05$) に減少した。雄 PBS 群では IL-18R α が KO で有意に減少した ($p < 0.05$)。LPS 群では cleaved caspase-3 が KO で減少する傾向 ($p = 0.11$) がみられた。雌 PBS 群では IL-18R α が有意 ($p < 0.05$) に減少し、雄と同じ結果であった。LPS 群では IL-18R β が KO で有意に減少した ($p < 0.05$)。

<回腸: 表 2>PBS 群に比べ LPS 群では、雄

表 1.空腸における陽性細胞数 (cleaved caspase-3) と百分率 (IL-18R) の結果

	cleaved caspase-3 (個)		IL-18R α (%)		IL-18R β (%)	
	PBS	LPS	PBS	LPS	PBS	LPS
♂ WT	2.7 ± 0.6	2.0 ± 0.1	11.1 ± 4.0	4.4 ± 0.6 \$	0.5 ± 0.5	3.4 ± 3.4
♂ KO	4.2 ± 2.1	0.9 ± 1.5	3.8 ± 2.5	4.5 ± 5.5	0.7 ± 0.8	1.5 ± 1.5
♀ WT	2.2 ± 0.6	4.1 ± 2.3	18.5 ± 5.1	6.3 ± 2.3 \$\$	2.2 ± 2.1	2.0 ± 0.6
♀ KO	3.7 ± 1.7	3.1 ± 2.2	5.9 ± 1.7	5.6 ± 2.9	4.3 ± 1.8	5.8 ± 2.1

表 2.回腸における陽性細胞数 (cleaved caspase-3) と百分率 (IL-18R) の結果

	cleaved caspase-3 (個)		IL-18R α (%)		IL-18R β (%)	
	PBS	LPS	PBS	LPS	PBS	LPS
♂ WT	2.4 ± 0.8	1.7 ± 0.4	10.8 ± 3.8	2.1 ± 0.2 \$	6.9 ± 1.1	5.8 ± 2.4
♂ KO	1.5 ± 0.5	1.1 ± 1.4	3.7 ± 3.3	2.4 ± 1.3	1.6 ± 1.0	5.6 ± 4.7
♀ WT	0.6 ± 0.5	3.2 ± 2.3	12.8 ± 3.7	7.7 ± 3.6	2.2 ± 2.0	6.4 ± 2.4
♀ KO	1.5 ± 0.6	3.4 ± 4.3	7.2 ± 2.4	6.1 ± 2.4	6.8 ± 7.2	11.5 ± 8.2

のみ WT の IL-18R α で有意 ($p < 0.05$) に減少した。雄 PBS 群では cleaved caspase-3 が KO で減少する傾向 ($p = 0.09$) がみられ、IL-18R α 、 β ともに KO で有意に減少した ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。LPS 群では有意な変化は見られなかった。雌では PBS 群で IL-18R α が有意 ($p < 0.05$) に減少した。LPS 群では有意な変化は見られなかった。

以上の結果より、空腸では雌雄の別なく cleaved caspase-3 陽性である apoptosis 細胞が絨毛先端部以外にも見られたが、Etx 血症下 (LPS 群) だけでなく非侵襲下 (PBS 群) でも見られたことより、LPS による効果かどうかは今回判定できなかった。空腸では雄の KO でのみ Etx 血症下で apoptosis が減少する傾向にあり、Etx 血症下で IL-18 は雄の空腸絨毛上皮細胞の apoptosis を促進し、雌では影響を及ぼさないと考えられた。回腸では apoptosis 細胞は絨毛先端部に見られ、正常な細胞回転による apoptosis であると考えられた。雄では非侵襲下の KO で減少する傾向が見られたが、雌では有意な差はなく、IL-18 は、雄では回腸絨毛上皮細胞の正常な apoptosis を促進し、雌では影響を及ぼさな

いと考えられた。また、Etx 血症下では回腸の apoptosis に雌雄ともに IL-18 の関与は少ないと考えられた。

既報では IL-18R は T 細胞に発現しており、腸管上皮細胞間リンパ球の 90%が T 細胞であることより、本研究において染色された IL-18R 陽性細胞は腸管の T 細胞であると考えられた。雄の空腸において、非侵襲下の IL-18R α 発現は WT よりも KO で有意に低く、IL-18 が存在しない状態では IL-18R α 発現は低いことが確認された。このとき、IL-18R β には WT と KO で有意な差はなく、雄の空腸では IL-18R β の発現への IL-18 の関与は少ないことが確認された。Etx 血症下では非侵襲下と比べて IL-18R α は WT では有意に減少していたが、KO では変化は無く、さらに、IL-18R β では差はみられなかった。IL-18 のシグナルは NF- κ B を介して T 細胞のサイトカイン産生に関与する、という報告があることから、Etx 血症下により IL-18 が増加すると腸管上皮 T 細胞は IL-18R α 発現を減少させてサイトカインの産生をコントロールする可能性が考えられた。一方で、雌の Etx 血症下では雄とは異なり、IL-18 が増加すると IL-18R α 発現を減少させるだけでなく、IL-18R β 発現も減少させて IL-18 との親和性も抑制してサイトカインの産生をコントロールする可能性が考えられた。

次に雄の回腸において、非侵襲下の IL-18R α 発現は WT よりも KO で有意に低く、また、IL-18R β 発現においても KO で有意に低かったため、IL-18 が存在しない状態では IL-18R α 、 β 発現はともに低いことが確認された。Etx 血症下では非侵襲下と比べて IL-18R α は WT では有意に減少していたが、KO では変化は無く、さらに、IL-18R β では差はみられなかった。この結果は空腸と一致しており、回腸でも雄では Etx 血症下により IL-18 が増加すると腸管上皮 T 細胞は IL-18R α 発現を減少させてサイトカインの産生をコントロールする可能性が考えられた。一方で、雌の回腸において非侵襲下の IL-18R α 発現は WT よりも KO で有意に低く、IL-18 が存在しない状態では IL-18R α 発現は低いことが確認された。このとき、IL-18R β には WT と KO で有意な差はなく、雌の回腸で

は IL-18R β の発現への IL-18 の関与は少ないことが確認された。しかし、Etx 血症下では IL-18R に有意な変化は認められず、IL-18 は雌回腸の T 細胞の IL-18R 発現に直接の関与は無いと考えられた。

以上により、IL-18 は空腸では雄の Etx 血症下で apoptosis を促進し、回腸では雄の非侵襲下で apoptosis を促進する可能性が考えられた。また、Etx 血症下で IL-18 は雄空腸の腸管上皮 T 細胞の IL-18R α 発現をコントロールし、雌空腸では IL-18R α 、 β の発現をコントロールすることが明らかとなった。さらに、雄回腸では空腸と同じく腸管上皮 T 細胞の IL-18R α 発現をコントロールし、雌では IL-18R 発現に直接の関与は無いことが明らかとなった。従って、IL-18 は腸管絨毛上皮細胞の apoptosis に雌よりも雄でより関与し、T 細胞の IL-18R 発現には雌雄差が存在することが示唆された。mRNA については空腸粘膜では Etx 血症下では WT マウスの TLR4 の発現が増加したが、KO マウスでは増加は見られなかった。回腸では WT、KO ともエンドトキシンにより TLR4 発現は増加した。このとき WT ではエンドトキシンにより空腸粘膜において IL-18 の mRNA が減少し、回腸粘膜ではあまり変化がなかった。

今後は腸管のサイトカインの測定や n 数を重ねて更なる機序の解明が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

現在外科感染症学会への投稿を検討中

[学会発表] (計 1 件)

エンドトキシン (Etx) 血症下のマウス腸管における apoptosis への Interleukin (IL) -18 の影響

小坂宮、青山倫子、寺嶋真理子、小谷穰治、丸川征四郎

第 15 回外科侵襲とサイトカイン研究会、2008 年 12 月 13 日、岩手県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺嶋真理子 (Terashima Mariko)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 00412015

(2) 研究分担者

小谷穰治 (Kotani Joji)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号 80360270

上田敬博 (Ueda Takahiro)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 80312055

丸川征四郎 (Marukawa Seishirou)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号 00030883

(3) 連携研究者