

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度

課題番号：19790505

研究課題名 (和文) 消化管上皮細胞の細胞間接着におけるインターロイキン 13 の作用解析

研究課題名 (英文) Clarify the mechanisms of Interleukin-13 induces tissue damage with modification of cell-cell adhesion in the intestinal epithelial cells

研究代表者 川島 麗 (KAWASHIMA REI)

国立国際医療センター (研究所)・研究員

研究者番号：70392389

研究成果の概要：腸管一次培養法やヒト大腸癌細胞株を用いた実験により、IL-13 は beta-catenin や ZO-1 などの膜染色性を弱めることから、IL-13 は細胞間接着を破壊するような細胞傷害作用を持つ。TUNEL 法を用いて、アポトーシスの誘導について解析したところ、IL-4 は上皮細胞にアポトーシスを誘導しないが、IL-13 は TNF- α に匹敵する数の細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

IL-13 が腸管上皮細胞に対して直接的に細胞間結合分子の作用減弱を伴う傷害作用を誘導することが証明され、消化管における IL-13 の組織傷害メカニズムを解明する上で重要な知見を得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	510,000	3,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器学 (食道、胃、小腸、大腸)

1. 研究開始当初の背景

IL-13 は IL-4 と多くの生物活性を共有し、炎症やアレルギー疾患における上皮細胞の増殖抑制、線維化、ムチン産生の促進など組織再構築において中心的な役割を果たしている。

我々の研究グループでは、Th2 型応答の優位なマウスにおけるハプテン誘導大腸炎モデルは上皮の萎縮、繊維化が特徴であること、また、過剰な Th2 型サイトカインの存在により、絨毛萎縮、粘液産生細胞の増加が誘導さ

れることなど、消化管炎症における病理学的変化における Th2 型サイトカインの重要性を指摘してきた。

放射線照射により消化管粘膜傷害をマウスに誘導し、その後の修復、再生過程を検討したところ、粘膜修復時に、IL-13 のおとり受容体である IL-13Ra2 が一過性に高発現し、その受容体が IL-13 作用を阻害することで再生が促進されることを見出した。また、この過程で、小腸組織培養中に IL-13 を直接添加すると、細胞間接着が弱くなり beta-catenin

の膜染色性が低下したことから、IL-13 自体が小腸組織の細胞間接着を傷害することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、消化管上皮細胞の細胞間接着に対する IL-13 作用を理解することにある。

IL-13 の作用として、大腸癌細胞株においてアポトーシスを誘導し上皮細胞間のバリア機能を低下させるといった報告はあるが、その作用機構を分子レベルは明らかにされていない。

そこで、消化管の一次組織培養法を用いて IL-13 の消化管上皮細胞の細胞傷害メカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 腸管一次培養法を利用したサイトカイン添加実験

マウス小腸、大腸組織を採取し、IL-13, IL-4, TNF α , IFN γ を培養液に加え、4 時間インキュベーションを行った。

(2) ヒト大腸癌細胞株のサイトカイン刺激実験

HT29, Caco-2, T84, LOVO, DLD-1, Colo201, Colo320, SW480 に腸管一次培養法と同様、IL-13, IL-4, TNF α , IFN γ を培養液に加え、48 時間インキュベーションを行った。

(3) 細胞間接着分子の変化

インキュベーション後に得られた組織や細胞の β -catenin, E-cadherin, ZO-1 の免疫組織染色を行った。

(4) 膜タンパク質切断酵素である MMP 活性の定性

インキュベーション後に得られた組織のゼラチンザイモグラフィを行った。特に MMP2, 9 についての活性を検討した。

(4) アポトーシスの検討

TUNEL 染色法を用いて、アポトーシスの有無を確認した。

(5) 小腸クリプトの単離とサイトカイン刺激

腸管組織を 30mM EDTA 処理することで、形態を保持したクリプトを分離、回収した。試験管あたり約 100 個のクリプトを分注し、IL-13 を含有した iPIPES buffer 中で 2、4 時間インキュベーションした。

(6) サイトカイン刺激後のヒト大腸癌細胞株の IL-4/IL-13 受容体の mRNA 発現解析
サイトカイン刺激後のヒト大腸癌細胞株の RT-PCR を行い、サイトカインによる IL-13Ra1, IL-13Ra2, IL-4Ra の発現誘導や発現抑制を検討した。

4. 研究成果

マウス小腸、大腸組織、ヒト大腸粘膜固有

層の一次培養、及びマウス消化管上皮細胞の陰窩の形態を保持したままでの単離と短期培養系を作成した。これを用いて、IL-13、IL-4、TNF- α 、IFN- γ を作用させたときの、細胞間結合分子の変化を染色により観察した。

また、ヒト大腸癌細胞株 HT29、Caco-2、T84、LOVO、DLD-1、Colo201、Colo320、SW480 と用いて IL-13 その他のサイトカインを作用させ、同様な解析を行った。その結果、IL-13 は細胞間結合分子である β -catenin、E-cadherin の細胞膜における染色性を弱めた。ヒト大腸癌細胞株のうちいくつかにおいても細胞間結合分子に対して同様な結果が得られたが、IL-4 の作用としても観察された。TNF- α により組織傷害が認められたが、細胞間結合への影響は明らかでなかった。サイトカイン刺激を受けたヒト大腸癌細胞株のサイトカイン受容体発現に大きな変動は認められなかったため、ヒト大腸癌上皮細胞におけるサイトカインのフィードバック機構は存在しないと考えられた。

また、一次培養での ZO-1 染色性に乱れを引き起こしたことから IL-13 は細胞間結合を弱める働きがあると推測された。その作用機序として、マトリックスメタロプロテアーゼ MMP の関与を考え、IL-13 を一次培養組織に IL-13 を作用させた組織のザイモグラフィを行って活性の検出を行ったが、IL-13 による特異的な MMP の誘導を示唆する結果は得られなかった。マウス一次培養組織における細胞間結合に対する効果は IL-13 に特異的であり、IL-4、IFN- γ による変化は見られなかった。

マウス消化管の一次培養及び上皮細胞の陰窩の形態を保持したままでの単離と短期培養系を作成した。これを用いて、IL-13 及びその他のサイトカインを作用させたときの、細胞間結合分子の変化を染色により観察した。その結果、IL-13 は細胞間結合分子の染色性を弱めることから、間質細胞を介さずに細胞間結合を弱める働きがあると推測された。

以上の結果から、消化管において IL-13 は細胞間接着を破壊するような細胞傷害作用を持つ可能性が示唆された。そこで、マウス小腸の一次器官培養に、IL-13, IL-4, TNF- α を作用させた後、TUNEL 法を用いて、アポトーシスの誘導について解析した。TUNEL 法により、IL-4 は上皮細胞にアポトーシスを誘導しないが、IL-13 は培養液中に添加後 4 時間で、TNF- α に匹敵する数の細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

以上より、IL-13 が腸管上皮細胞に対して直接的に細胞間結合分子の作用減弱を伴う傷害作用を誘導することが証明され、IL-13 の組織傷害の経路において、TNF- α と同様

のアポトーシスシグナル経路とのクロストークの存在が示唆される結果となった。

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 2 件)

1. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T.

DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer.

Gastroenterology. 2008 Jul;135(1):142-151

2. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T.

Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine.

J Immunol. 2007 Dec 1;179(11):7478-87.

[学会発表] (計 5 件)

1. Rei Kawashima et al. IL-13 disrupts the cell-cell adhesion of intestinal epithelial cells 日本免疫学会 2007 年 11 月 21 日品川

2. Rei Kawashima, et al. Two distinct types of aberrant responses in the colonic lamina propria cells to lipopolysaccharide (LPS) in ulcerative colitis 13th International Congress of Mucosal Immunology 2007 年 7 月 11 日東京

3. Rei Kawashima et al. Aberrant responses of human colonic macrophage-type cells to lipopolysaccharide in ulcerative colitis: upregulated expression of MD-2 and production of inflammatory cytokines, Digestive Disease Week 2007 2007 年 5 月 22 日 Washington D.C

4. Rei Kawashima et al. Interleukin-13 Induces Tissue Damage with Relocation of β -Catenin and Modification of Cell-Cell Adhesion in the Epithelial Cells Digestive Disease Week 2008 2008/5/18 San Diego, U. S. A.

5. Rei Kawashima et al. IL-13 disrupts tight junction in the intestinal epithelial cells by modulating expression of ZO-1, occludin and claudin-2 日本免疫学会学 2008/12/2 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 麗 (KAWASHIMA REI)

国立国際医療センター (研究所)・研究員

研究者番号 : 70392389

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

