

機関番号：15201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20590723

研究課題名 (和文) MFG-E8によるNF- κ B依存性シグナルの制御機構の解明と腸管の
抗炎症薬開発研究課題名 (英文) Investigation regarding the role of MFG-E8 on NF- κ B-dependent
intestinal inflammation: Development of a new anti-inflammatory targeting MFG-E8

研究代表者

石原 俊治 (Ishihara Shunji)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80263531

研究成果の概要 (和文)：

実験的に作製したマウス腸炎モデルの腸管炎症は、我々が作成した精製 MFG-E8 蛋白の投与によって有意に抑制された。そのメカニズムとして、MFG-E8 の $\alpha 5\beta 3$ インテグリンへの結合部位である RGD ドメインに変異を加えた無機能型の蛋白では腸炎の抑制ができなかったことから、MFG-E8 の抗炎症効果は $\alpha 5\beta 3$ インテグリンへの MFG-E8 の結合に依存していることが想定された。本結果を踏まえて MFG-E8 による炎症抑制メカニズムの詳細についてマクロファージを用いた *in vitro* の実験系で検証した。その結果、LPS 刺激下で誘導される炎症惹起分子である osteopontin と競合的に MFG-E8 が $\alpha 5\beta 3$ インテグリンに結合することによって、osteopontin による炎症シグナルが NF- κ B 依存性に抑制されることが明らかとなった。

平成21年度後半から *mfg-e8* ノックアウトマウスの飼育を開始し、平成21年度からは本マウスを使った実験に着手した。腸管炎症における *mfg-e8* 遺伝子の機能を明らかにする目的で、ノックアウトマウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) で腸炎を作製し、野生型マウスの腸炎と比較した。腸炎の発症とともに、ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて体重減少、腸管短縮、組織学的炎症、炎症性サイトカイン産生が著明であった。ノックアウトマウスの結果は、これまでに起こってきた我々の研究成果を支持する内容であった。これまでは、腸管の急性炎症における MFG-E8 の働きを検討してきたが、今後はヒトの炎症性腸疾患に近い慢性モデルでの実験が必要と考える。

研究成果の概要 (英文)：

MFG-E8 deficiency is associated with acquisition of immune-mediated disorders due to the loss of tissue homeostasis. We observed altered MFG-E8 expression in inflamed colons during the acute phase of murine experimental colitis and found that treatment with recombinant MFG-E8, but not its RGD mutant counterpart, ameliorated colitis by reducing inflammation and improving disease parameters. To reveal the MFG-E8-mediated anti-inflammatory mechanism, we employed an *in vitro* system, which showed the downregulation of NF- κ B in an LPS dependent manner. In addition, MFG-E8 altered $\alpha_v\beta_3$ -integrin-mediated FAK phosphorylation by impeding the binding of one of its potent ligands osteopontin, which becomes activated during colitis. Our results indicated that MFG-E8 has a novel therapeutic potential for treatment of colitis.

Recently, we also employed *mfg-e8* KO mice for evaluating the function of MFG-E8 on intestinal inflammation. Acute experimental colitis was established by administrating of dextran sodium sulphate (DSS). We found that exacerbation of body weight loss, shorting of colon and histological inflammation in *mfg-e8* KO mice during DSS-induced intestinal inflammation, as compared to those in wild mice. Additional investigations will be necessary to elucidate the role of MFG-E8 in chronic intestinal inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、自然免疫、MFG-E8、Toll受容体、NF-κB

1. 研究開始当初の背景

MFG-E8 はアポトーシス細胞表面のホスファチジルセリンと食細胞表面のαvβ3 インテグリンを架橋する分泌型のタンパク質で、アポトーシス細胞の除去を制御している。本分子の機能異常によって自己免疫疾患が誘導されることが明らかとなっているが、消化管の炎症における役割は報告されていない。

2. 研究の目的

MFG-E8 の機能が腸管自然免疫応答とクロストークし炎症制御に関わっていると仮定した。炎症時における腸管における MFG-E8 の発現を明らかにするとともに、精製 MFG-E8 蛋白を実験腸炎モデルに投与することによって消化管の炎症抑制が可能か否かを検証した。さらに、その詳細なメカニズムを *in vitro* の実験系で解析した。

3. 4. 研究の方法と成果

精製した MFG-E8 蛋白と変異型 MFG-E8 の投与によって、マウス実験腸炎（デキストラン硫酸：DSS モデル）の病勢が有意に抑制されること（体重変化、腸管長、病理組織、組織中の MPO 活性、IL-1β と TNF-α 産生量）が示された。

さらに、腸管炎症時に局所で誘導される αvβ3 インテグリンリガンドの同定をおこなった。DSS 腸炎モデルを用いて、炎症粘膜における種々の αvβ3 インテグリンリガンドの発現を検討すると、osteopontin (OPN) の発現量が炎症依存性に増加することが明らかとなった。

次に MFG-E8 の αvβ3 インテグリンへの結合および OPN との競合実験をおこなった。OPN は NF-κB 依存性の炎症性サイトカインであることから、MFG-E8 の抗炎症効果は OPN の αvβ3 インテグリンへの結合阻害であることが想定された。 *In vitro* の実験系で、OPN がマクロファージの αvβ3 インテグリン

に作用して炎症誘導をおこなうこと、添加した MFG-E8 が OPN と αvβ3 インテグリンへ競合的に結合することが確認された。本結果を踏まえて MFG-E8 による炎症抑制メカニズムの詳細についてマクロファージを用いた *in vitro* の実験系で検証した。その結果、LPS 刺激下で誘導される炎症惹起分子である OPN と競合的に MFG-E8 が αvβ3 インテグリンに結合することによって、OPN による炎症シグナルが NF-κB 依存性に抑制されることが明らかとなった。

平成 21 年度後半から *mfg-e8* ノックアウトマウスの飼育を開始し、平成 21 年度からは本マウスを使った実験に着手した。腸管炎症における *mfg-e8* 遺伝子の機能を明らかにする目的で、ノックアウトマウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) で腸炎を作製し、野生型マウスの腸炎と比較した。腸炎の発症とともに、ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて体重減少、腸管短縮、組織学的炎症、炎症性サイトカイン産生が著明であった。

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 11 件)

- ① Li YY, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Yuki T, Amano Y, Ansary MU, Kinoshita Y: Autophagy is required for toll-like receptor-mediated interleukin-8 production in intestinal epithelial cells. *Int J Mol Med*. 27:337-44, 2011.
- ② Kadota C, Ishihara S, Aziz MM, Rumi MA, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Kinoshita Y: Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in

- intestinal epithelial cells during inflammation. Clin Exp Immunol. 162:348-61, 2010.
- ③ Mishima Y, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Otani A, Tada Y, Li YY, Moriyama I, Oshima N, Yuki T, Amano Y, Matsumoto S, Kinoshita Y: Decreased production of interleukin-10 and transforming growth factor- β in Toll-like receptor-activated intestinal B cells in SAMP1/Yit mice. Immunology. 131:473-87, 2010.
- ④ Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, Kadota C, Moriyama I, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y: A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation. Clin Exp Immunol 159: 185-98, 2010.
- ⑤ Ishihara S, Aziz MM, Yuki T, Kazumori H, Kinoshita Y: Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. J Gastroenterol 44:1097-108, 2009.
- ⑥ Aziz MM, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kadowaki Y, Rumi MA, Amano Y, Kinoshita Y. MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. J Immunol 182: 7222-32, 2009.
- ⑦ Mishima Y, Ishihara S, Amano Y, Oshima N, Kadota C, Otani A, Moriyama I, Li YY, Aziz M, Kinoshita Y: Alterations of peripheral blood CD5(+) B cells in inflammatory bowel disease. Scandinavia Journal of Gastroenterology 44: 172-9, 2009.
- ⑧ Ishihara S, Aziz M, Oshima N, Mishima Y, Imaoka H, Moriyama I, Kinoshita Y: Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: infectious gastroenteritis-related disorders? Clin J Gastroenterol 2 : 9-16, 2009.
- ⑨ Aziz MM, Ishihara S, Rumi MA, Mishima Yo, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Rahman FB, Otani A, Oka A, Ishimura N, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBP β -dependent pathway. Apoptosis 13: 609-20, 2008.
- ⑩ Moriyama I, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MD, Mishima Yo, Oshima N, Kadota C, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Decoy oligodeoxynucleotide targeting activator protein-1(AP-1) attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis. Laboratory investigation: 88 652-63, 2008.
- ⑪ Fruta K, Sato S, Miyake T, Okamoto E, Ishine J, Ishihara S, Amano Y, Adachi K, Kinoshita Y. Abnormal liver function in Crohn's disease related to location of disease lesions. Inflamm Bowel Dis 14:138-9, 2008.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 楠 龍策, 石原俊治, 結城崇史, 木下芳一: ノックアウトマウスを用いた MFG-E8 の腸管炎症制御の機能解析と治療への応用. 第 7 回消化管学会総会学術集会. 2011. 2. 2. 18
- ② 多田育賢, 石原俊治, 楠 龍策, 大谷 文, 三島義之, 大嶋直樹, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患の腸管粘膜局所における MFG-E8 の発現に関する検討. 第 52 回日本消化器病学会大会, 横浜, 2010.10.13
- ③ 岡 明彦, 石原俊治, 三島義之, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: Chron 病モデルマウスの病態における腸管 B 細胞の機能異常に関する検討. 第 52 回日本消化器病学会大会, 横浜, 2010.10.13
- ④ Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Decreased production of IL-10 in TLR9-activated peripheral blood B cells in inflammatory bowel disease. Digestive Disease Week. New Orleans, USA, 2010.5.1-6
- ⑤ Kadota C, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Intestinal inflammation down-regulates SIGIRR/TIR8 expression in epithelial cells by inhibiting SP1-mediated pathway. Digestive Disease Week. New Orleans, USA, 2010.5.1-6
- ⑥ Yuki T, Ishihara S, Aziz MM, Mishima Y, Oshima N, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yoshikazu K: Crosstalk between TLR5 and Notch1 signaling in epithelial cells during intestinal inflammation. New Orleans, USA, 2010.5.1-6
- ⑦ 岡 明彦, 石原俊治, 三島義之, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患患者の末梢血 B 細胞における IL-10 産生能に関する検討. 第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010. 4.22-24
- ⑧ 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍

- 策, 大谷 文, 三島義之, 天野祐二, 木下芳一: 腸管炎症における Notch-1 と TLR5 シグナルの相互作用に関する検討。第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010. 4.4.22-24
- ⑨ 三島義之, 石原俊治, 木下芳一: クロウン病モデルマウスにおける IL-10 産生腸管制御性 B 細胞に関する検討 第 51 回日本消化器病学会大会, 京都, 2009.10.14-16
- ⑩ Mishima Y, Ishihara S, Aziz M, Oshima N, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Moriyama I, Amano Y, Kinoshita Y: Decreased production of IL-10 and TGF- β in TLR-activated intestinal B cells in SAMPI/Yit mice. Digestive Disease Week 2009, Chicago, USA, 2009.5.30-6.4 (抄録のみ)
- ⑪ Oshima N, Ishihara S, Kadota C, Oka A, Kusunoki R, Moriyama I, Amano Y, Kinoshita Y: Intrarectal administration of MFG-E8 protein ameliorates murine experimental colitis by inhibiting NF- κ B activation in intestinal epithelial cells. Digestive Disease Week 2009, Chicago, USA, 2009.5.30-6.4 (抄録のみ)
- ⑫ Ishihara S, Aziz M, Mishima Y, Oshima N, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Moriyama I, Ishimura M, Li YY, Amano Y, Kinoshita Y: Crosstalk between Notch and toll signaling in murine colitis. Digestive Disease Week 2009, Chicago, USA, 2009.5.30-6.4 (抄録のみ)
- ⑬ 三島義之, 石原俊治, 楠 龍策, 岡 明彦, 大谷 文, 大嶋直樹, 森山一郎, 天野祐二, 木下芳一: クロウン病モデルマウスにおける IL-10 産生 B 細胞に関する検討 第 95 回日本消化器病学会総会, 札幌, 2009.5.7-9
- ⑭ 大谷 文, 石原俊治, 大嶋直樹, 三島義之, 岡 明彦, 楠 龍策, 森山一郎, 天野祐二, 木下芳一: 精製 MFG-E8 蛋白の経肛門的投与による実験腸炎抑制の試み 第 95 回日本消化器病学会総会, 札幌, 2009.5.7-9
- ⑮ 三島義之, 石原俊治, 大谷 文, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患の末梢血 CD5 陽性 B 細胞の解析 第 5 回日本消化器病学会, 東京, 2009.2.12-13
- ⑯ 三島義之, 石原俊治, 岡 明彦, 大谷 文, 大嶋直樹, 角田 力, 森山一郎, 天野祐二, 木下芳一: 消化管粘膜における IL-10、TGF-beta 産生 B 細胞に関する検討 第 50 回日本消化器病学会大会, 東京, 2008.10.1-3
- ⑰ 大嶋直樹, 石原俊治, 木下芳一: パネルディスカッション: 下部消化管の炎症と機能相関をめぐって 消化管上皮の自然免疫応答における A20 発現の意義 第 50 回日本消化器病学会大会, 東京, 2008.10.1-3
- ⑱ Ishihara S, Aziz M, Rumi MA, Oshima N, Mishima Y, Kadota C, Otani A, Oka A, Norihisa I, Moriyama I, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Milk fat globule EGF-8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis via inhibition of NF- κ B activation. Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA, 2008.5. 18-20
- ⑲ Oshima N, Ishihara S, Rumi MAK, Aziz MM, Mishima Yo, Kadota C, Moriyama I, Ohtani A, Oka A, Li YY, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: A20 is an early responsive negative regulator of Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells during inflammation. Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA, 2008.5.18-20
- ⑳ Mishima Y, Ishihara S, Aziz MM, Rumi MAK, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Ohtani A, Oka A, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Intestinal CD5⁺ B cells produce IL-10 and TGF- β via Toll-like receptor-mediated signaling. Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA, 2008.5.18-20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 俊治 (Ishihara Shunji)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号: 80263531