

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790291  
 研究課題名（和文）  
 炎症性腸疾患における ADAM 分子を介した新規炎症機構の解明  
 研究課題名（英文）  
 Roles of a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) in inflammatory bowel diseases  
 研究代表者  
 下田 将之（SHIMODA MASAYUKI）  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：70383734

## 研究成果の概要（和文）：

本研究課題では炎症性腸疾患における ADAM 分子を介した新規炎症機構の解明を目的とし、(1)炎症性サイトカインにより血管内皮細胞で誘導された ADAM28 が白血球-血管内皮細胞接着促進に関与すること、(2)ADAM17 ノックアウトマウスを用いた DSS 誘導性大腸炎モデルでは ADAM17 は腸管上皮の再生に関与する可能性があることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, the roles of ADAMs in inflammatory bowel diseases are investigated. In vitro induction experiments, ADAM28 was induced by inflammatory cytokines and enhanced the HL-60 cell binding to P-selectin-coated wells. On the other hand, ADAM17<sup>fllox/fllox</sup>/MX1-Cre<sup>+</sup> mice were highly susceptible to the development of colitis induced by DSS compared with wild type mice, which might be due to increased colonic mucosa destruction. These data suggest that ADAMs may play significant roles in regulating the inflammation and regeneration in inflammatory bowel diseases.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学、細胞・組織、炎症、大腸

## 1. 研究開始当初の背景

炎症とは、種々の侵襲に対する生体反応であり、組織構成細胞や間質の変性・壊死、血管透過性の亢進・血管内皮細胞の活性化、白血球の血管外への遊走、組

織の修復・再生の各プロセスから構成される。これらのうち、炎症を特徴づける白血球の血管外への遊走では、白血球で発現された P selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) と血管内皮細胞上に

発現する P-selectin を介した結合がローリングに必須と報告されている (Cell 75:1179-86, 1993)。申請者は平成 18-19 年度若手研究 (B) (人体病理) の支援を受け、ヘビ毒メタロプロテアーゼおよびディスインテグリンと相同なドメインを持つタンパク質である ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子の機能解析を行い、分子生物学的および生化学的な実験から分泌型 ADAM28 はディスインテグリンドメインを介して PSGL-1 と結合し、PSGL-1/P-selectin 結合系を促進することにより白血球の血管外への遊走を促進することを最近明らかにした (J. Biol. Chem. 282:25864-74, 2007)。さらに、ヒト肺炎組織においては、免疫染色にて炎症部位特異的に ADAM28 が血管内皮細胞に高発現することを見出している。一般的に炎症部位での白血球の血管外への遊走には血管内皮細胞の活性化・接着分子の発現が重要であることが知られており、上記の申請者のデータは炎症部位での血管内皮細胞における ADAM28 の発現が白血球の炎症部位選択的な血管外遊走を決定している可能性を示唆している。

また、これまで予備実験から、ヒト培養血管内皮細胞での ADAM28 発現誘導に tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) 刺激が重要であることを見出している。TNF  $\alpha$  は膜型分子 (前駆体) として発現し、プロテアーゼによる切断で速やかに shedding されて遊離型 TNF  $\alpha$  となり、オートクライン・パラクライン機序により各種細胞を活性化する。従って、TNF  $\alpha$  の活性は膜型 TNF  $\alpha$  前駆体の shedding によって大きく支配されているが、興味深いことにその shedding は ADAM28 と同じ ADAM 遺伝子ファミリーに属する ADAM17 (TNF  $\alpha$  converting enzyme: TACE) が担っていると考えられている (Nature 385: 729-733, 1997; Nature 385: 733-36, 1997)。以上の実験的事実に基づき、炎症部局所においては、ADAM17 による膜型 TNF  $\alpha$  の shedding 血管内皮細胞での ADAM28 の発現誘導 ADAM28/PSGL-1 を介した白血球の血管外遊走促進という ADAM 分子を介した新規の炎症調節機構の存在を想定した。しかし、これまでにこれら ADAM 分子を介した炎症カスケードに関しては全く情報がない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、大腸炎マウスモデルを用いて、病理学的あるいは分子生物学的観点から ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子を介した新規の

炎症調節機序の解明を目的とする。ヒト炎症性腸疾患には、特発性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病) 感染性腸疾患 (ウイルス性腸炎、細菌性腸炎、原虫感染症) 大腸憩室炎、急性虫垂炎、虚血性腸疾患などがあげられる。この中でも特発性炎症性腸疾患は再燃・緩解を繰り返す難治性の腸疾患で、その原因は未だ解明されていないが、近年、抗 tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) モノクローナル抗体による治療が特発性炎症性腸疾患で著明な炎症抑制作用を有することが明らかとなり (N. Engl. J. Med. 337: 1029-35, 1997)、TNF  $\alpha$  が炎症の維持・組織破壊で中心的な役割を果たしている可能性が示唆されている。これらの背景を踏まえて、TNF  $\alpha$  の主たる sheddase である ADAM17 (TNF  $\alpha$  converting enzyme: TACE) と申請者が先駆的に研究してきた ADAM28 の血管内皮細胞における発現調節機構に注目し、ADAM17、ADAM28 を介した新たな炎症機序の解明を炎症性腸疾患に絞り、以下の 2 研究項目のもとに研究を遂行する。

(1) 血管内皮細胞発現 ADAM28 による白血球-血管内皮細胞接着促進作用の検討

(2) ADAM17 ノックアウトマウスを用いた炎症性腸疾患における ADAM 分子の役割解析

これらの ADAM17 と ADAM28 両分子を介した新たな炎症機構 (ADAM17 による膜型 TNF  $\alpha$  の shedding 血管内皮細胞での ADAM28 の発現誘導 ADAM28/PSGL-1 を介した白血球の血管外遊走促進) の解明が、ADAM 分子を標的とした新規の炎症性腸疾患治療法開発につながる可能性が考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管内皮細胞発現 ADAM28 による白血球-血管内皮細胞接着促進作用の検討

ヒト血管内皮細胞を用いた ADAM28 の発現調節機構の検討: Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) 細胞を炎症や組織再生に関わる種々のサイトカイン (TNF  $\alpha$ , IL1  $\alpha$ , VEGF, INF  $\gamma$ , TGF  $\beta$ , basic FGF) で刺激し、ADAM28s の発現を定量 PCR、イムノプロット法を用いて定量的・経時的に解析する。さらにこれらのサイトカインのシグナル伝達に関わる種々の分子の阻害剤を用いて血管内皮細胞における ADAM28 の発現調節機構を明らかにする。

血管内皮細胞発現 ADAM28 による PSGL-1 発現細胞の固相化 P-selectin と HUVEC 細胞への接着促進作用の検討: PSGL-1 を発現する前骨髄性白血病細胞株 HL-60 細胞

を、種々のサイトカインで刺激した HUVEC 細胞由来の培養液とインキュベートし、固相化 P selectin あるいは HUVEC 細胞への接着実験を行う。さらに、ADAM28 に対する siRNA を HUVEC 細胞に導入した培養液を用いて上記実験を行うことにより、血管内皮細胞発現 ADAM28 による PSGL-1/P selectin 結合系を介した細胞接着促進作用を調べる。また、HUVEC 由来培養液とインキュベートした HL-60 細胞を抗 PSGL-1 抗体と抗 ADAM28 抗体を用いて二重染色を行い、PSGL-1 と ADAM28 の細胞膜上での共存を共焦点顕微鏡で観察する。

#### (2) ADAM17 ノックアウトマウスを用いた炎症性腸疾患における ADAM 分子の役割解析

Cre/loxP system を用いて骨髄系細胞特異的に ADAM17 遺伝子を KO したマウス (LysM Cre ADAM17 KO マウス) と、インターフェロン反応性に種々の臓器で ADAM17 遺伝子を KO したマウス (MX-1 Cre ADAM17 KO マウス) (いずれも作成済み: J. Immunol. 179: 2686-9, 2007) を使用する。これらの ADAM17 KO マウスおよび野生型マウスを用いて、dextran sulfate sodium (DSS) 誘導大腸炎モデルを作製し、経時的に体重減少、生存率、腸管の肉眼像 (腸管の長さ、潰瘍の個数・大きさ) や組織像 (潰瘍の深さ、白血球浸潤の程度、腸管上皮の変化など) を解析するとともに、ホモジナイズした腸管組織の myeloperoxidase 活性を測定し、白血球浸潤の程度を定量化する。また、炎症部・非炎症部における ADAM17 の発現レベルを RT-PCR、イムノプロット法、免疫染色法を用いて解析するとともに、イムノプロット法を用いて膜型あるいは遊離型 TNF- $\alpha$  の発現量を検討し、大腸炎マウスモデルにおける ADAM17 による TNF- $\alpha$  の shedding の関与を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血管内皮細胞発現 ADAM28 による白血球-血管内皮細胞接着促進作用の検討:

血管内皮細胞発現 ADAM28 による白血球-血管内皮細胞接着促進作用の検討はじめに、血管内皮細胞における ADAM28 の発現調節機構を明らかにするために、培養ヒト血管内皮細胞を種々のサイトカインで刺激し、ADAM28 発現誘導因子を検索した。これまでに、我々はヒト培養血管内皮細胞での ADAM28 発現誘導に TNF- $\alpha$  刺激が重要であることを明らかにしているが、ADAM28 は TNF- $\alpha$  のほか、IL-1 $\alpha$ 、PMA といった炎症性サイトカイン刺激により protein kinase C の活性化を介して発現誘導されることが明

らかとなった。さらに、PSGL-1 を発現する前骨髄性白血病細胞株 HL-60 細胞をこれらの ADAM28 発現誘導因子で刺激した HUVEC 細胞由来の培養液とインキュベートし、固相化 P selectin への接着実験を行うと、HL-60 細胞の固相化 P selectin への接着能は HUVEC 細胞由来 ADAM28 に依存して特異的に促進した。以上のデータは、ADAM28 が炎症部位の血管内皮細胞により発現され、炎症局所における白血球浸潤制御に関わる可能性を示唆していると考えられる。

##### (2) ADAM17 ノックアウトマウスを用いた炎症性腸疾患における ADAM 分子の役割解析:

ADAM17 コンディショナルノックアウト (KO) マウスを用いた大腸炎マウスモデルにおける ADAM 分子の役割解析 ADAM17 の主な産生細胞である骨髄系細胞特異的に ADAM17 遺伝子を KO したマウス (LysM Cre ADAM17 KO マウス) と、インターフェロン反応性に種々の臓器で ADAM17 遺伝子を KO したマウス (MX-1 Cre ADAM17 KO マウス) を用いて、dextran sulfate sodium (DSS) 誘導大腸炎モデルを作製し、経時的な体重変化、生存率、腸管の肉眼像・組織像を検討した。LysM Cre ADAM17 KO マウスでは、野生型マウスと比較して、体重減少や生存率に有意差がなかったものの、興味深いことに MX-1 Cre ADAM17 KO マウスでは野生型マウスと比較して、体重減少や生存率の悪化が認められた。免疫染色では、ADAM17 は腸管粘膜で強い発現を認めるとともに、MX-1 Cre ADAM17 KO マウスでは腸管上皮における BrdU の取り込みが低下していることが明らかとなった。また、炎症細胞浸潤の程度には MX-1 Cre ADAM17 KO マウスと野生型マウスの間に著明な差が見られないことから、本モデルでは ADAM17 が腸管上皮の再生に関与している可能性を示唆している。しかしながら、ADAM17 による膜型 TNF- $\alpha$  shedding による血管内皮細胞での ADAM28 の発現誘導への関与に関しては今後の課題である。

#### 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5件)

Kuroda H, Mochizuki S, Shimoda M, Chijiwa M, Kamiya K, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Kawamura M, Kobayashi K, Okada Y. ADAM28 is a serological and

histochemical marker for non-small-cell lung cancers. **Int. J. Cancer**, 2010, in press.

Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, **Shimoda M**, Matsuoka M, Aiso S: Amyloid - causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. **Mol. Psychiatry** 14:206 -222, 2009.

Watada S, Obara H, **Shimoda M**, Matsubara K, Matsumoto K, Kitajima M: Multiple Aneurysms of the Splenic Artery Caused by Fibromuscular Dysplasia. **Ann. Vasc. Surg.** 23:411.e5 -7, 2009.

Mikami S, Oya M, **Shimoda M**, Mizuno R, Ishida M, Kosaka T, Mukai M, Nakajima M, Okada Y: Expression of Heparanase in Renal Cell Carcinomas: Implications for Tumor Invasion and Prognosis. **Clin. Cancer Res.** 14:6055 -6061, 2008.

**Shimoda M**, Okada Y, Hayashi Y, Hatano S, Kawakubo H, Omori T, Ishii S, Sugiura H: Primary invasive micropapillary carcinoma of the stomach. **Pathol. Int.** 58:513 -517, 2008.

[学会発表](計2件)

**Shimoda M**, Okada Y: "Induction of ADAM28 in endothelial cells at inflammatory sites enhances leukocyte adhesion to endothelial cells" (Workshop), The XXIth Federation of European Connective Tissue Societies meeting, Marseille, France, (9 -13th, July, 2008)

**下田将之**:「がん細胞 - 血管内皮細胞接着におけるADAM28の役割解析」(研究奨励賞受賞講演)、『第17回日本がん転移学会』、鹿児島、2008年7月24 -25日

[図書](計2件)

**下田将之**、岡田保典:「MMP/ADAM」、『炎症・再生医学事典(松島綱治、西脇徹編)』、朝倉書店出版、pp.123 -126、2009

**下田将之**、岡田保典:「癌細胞 細胞外基質への接着能の測定法」、『がん転移研究の実験手法(済木育夫、愛甲孝編)』、金芳堂出版、pp140 -144、2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

下田 将之 (SHIMODA MASAYUKI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号:70383734

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし