

平成 22 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790516
 研究課題名（和文）TGF- β シグナル伝達とリンパ球分化、胃粘膜免疫応答、発癌メカニズムの
 関連解析
 研究課題名（英文）The analysis of relationships of lymphocyte differentiation, gastric
 mucosal immune response, and carcinogenic mechanism to signaling cascade of TGF- β .
 研究代表者
 福井 寿朗 (FUKUI TOSHIRO)
 関西医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60402905

研究成果の概要（和文）：Tn 細胞から Th17・Treg 細胞への分化経路を、Smad2/3 におけるリン酸化部位の差異に着目し検討したが、リン酸化部位の差が分岐点であるという仮説は証明出来なかった。さらに、免疫担当細胞などの間質細胞ではなく、特定の消化管上皮細胞領域にリンカー部のリン酸化された Smad2/3 が強発現しており、粘膜の増殖と関連していると考えられた。今後この細胞群を解析し、研究成果を発展させる予定である。

研究成果の概要（英文）：We studied the pathway of differentiation from Tn to Th17 or Treg from a standpoint of the different portion of phosphorylation of Smad2/3. However, we could not verify the hypothesis that the different portion of phosphorylation of Smad2/3 was branch point of differentiation. Additionally, the intensive expression of linker-phosphorylated Smad2/3 was observed not in the interstitium, such as immune cells, but in the specific region of the gastrointestinal epithelial cells, which would be relevant to the mucosal proliferation. In future, we will analyze these cells in detail and develop this study results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：消化器内科学

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：癌、細菌、シグナル伝達、発生・分化、免疫学

1. 研究開始当初の背景

TGF- β は類似の構造を持つファミリー分子とともに TGF- β スーパーファミリーと呼ばれ、発生過程において種々の臓器や組織を構成する細胞の分化や血管新生などの調節に必

須の役割を果たし、生後も細胞増殖や細胞死、細胞外マトリックス蛋白質の産生と分解、接着因子の発現の調節などを通じて、生理的な細胞の再生や創傷治癒、炎症・免疫反応などを調節している。このため TGF- β ファミリー

が関与する疾患も、種々の発生異常に加え、癌、感染症・免疫疾患、線維化を伴う疾患群などの多岐にわたる。TGF- β ファミリーの機能が多彩なのは、反応する細胞の分化の違いや、一緒に作用するシグナルとのクロストークに依存して多様な反応を惹起する為であり、シグナルを伝達する Smad がさまざまな標的遺伝子の転写の分子スイッチとして機能しうることによる。

一方、免疫担当細胞は活性化の際に、異なる分化経路をとって特殊な性質およびエフェクター機能を獲得する。ヘルパーT (Th)細胞は従来、Th1 細胞と Th2 細胞というサブセットに分化すると考えられてきた。しかし最近、Th1 細胞とも Th2 細胞とも異なる IL-17 産生 T (Th17)細胞というサブセットがあることがわかり、自己免疫による組織傷害の誘導で重大な役割を果たし、また Th17 細胞は従来の Th1 および Th2 細胞とは異なる特徴をその分化や機能において示すことも明らかになった。これとは逆に、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T (Treg)細胞は自己免疫を抑制し組織傷害を防ぐが、TGF- β は Treg 細胞の産生において重要な分化因子である。また、炎症時に誘発される急性期タンパク質 IL-6 は、TGF- β が誘発する Foxp3⁺Treg 細胞の産生を阻害し、同時に IL-6 と TGF- β が協働して、CD4⁺ナイーブ T 細胞 (Tn)からの病原性 Th17 細胞の分化を誘発するとされている。この結果は、自己免疫を誘発する病原性 (Th17) T 細胞と自己免疫による組織傷害を妨げる制御性 (Foxp3⁺) T 細胞の産生は2つの経路に分かれて起こることを示している。従って新しい T 細胞サブセットである Th17 細胞や Treg 細胞の疾患における重要性や分化機構を TGF- β シグナル伝達機構とともに解析し、各種疾患に与える影響を明らかにすることは、新しい疾患予防法、治療法を開発する上で急務と思われる。

2. 研究の目的

本研究では、様々な胃疾患における Th17、Treg を中心とした宿主免疫反応や TGF- β シグナル伝達機構の役割を明らかにするため、以下の2点を目的とする。

(1) Tn 細胞から Th17・Treg 細胞への分化における TGF- β シグナル伝達メカニズムの解析

上述のように CD4⁺Tn 細胞は TGF- β をはじめ、各種サイトカインなどの刺激により成熟した Th1、Th2、Th17、Treg 細胞へと分化する。この分化の多様性には TGF- β シグナル伝達分子 Smad の機能が多彩であることが少なからず関与していると推測される。TGF- β は I 型 TGF- β 受容体 (T β RI) とともに c-Jun N-terminal kinase (JNK) も活性化し、Smad の C 末端部位がリン酸化された phosphoisoform (pSmad2/3C) と JNK/p38MAPK で Smad のリンカー部位がリン酸化された phosphoisoform

(pSmad2/3L) をそれぞれ産生する。両者は Smad4 とともに核内に移動し機能を発現する。そこで pSmad2/3C と pSmad2/3L に関連するリン酸化カスケードに着目しつつ、Tn 細胞の分化・機能発現の相違について検討し、各種疾患における TGF- β の重要性を解明する糸口とする。

(2) 胃疾患における Th17、Treg、TGF- β による粘膜免疫応答、発癌メカニズムの解析

胃炎はヘリコバクター感染により最も普遍的に生じる病態であり、胃 MALT リンパ腫、胃癌の発生母地と考えられている。しかし、多くの因子が複雑に関与しているため、今なお発症機序は十分に解明されていない。毒素因子に代表される菌側因子と宿主の免疫反応の両者が重要な役割を果たすが、各種系統のマウスに同じヘリコバクターを感染させても異なった病態が生じることから、宿主免疫反応がより重要と考えられる。

以前より癌細胞においては、TGF- β のシグナル伝達に関与する受容体や細胞内シグナル伝達分子である Smad のゲノム異常が数多く報告されており、これらの異常が増殖異常の発生や浸潤・転移能の獲得に関与していると考えられて来た。さらに最近、ヒト大腸がん組織において Smad の TGF- β によるリン酸化部位の差異が癌の発生・進展に関与し、pSmad2/3C はそれを抑制、pSmad2/3L は促進することが明らかになった。

これまで我々は、主に消化管における粘膜免疫応答について各種疾患モデルマウスを使用しながら検討し、病態を解明して来た。その中で、新生仔期胸腺摘除 BALB/c マウスに生じる自己免疫性胃炎 (AIG)、AIG にヘリコバクター属を感染させて生じる濾胞性胃炎、胃 MALT リンパ腫、C57BL/6 マウスにヘリコバクター属を感染させて生じる慢性(萎縮性化生性)胃炎、胃癌について Smad に着目して再度検討し、胃炎形成における宿主免疫応答の役割をさらに詳細に解明し、胃 MALT リンパ腫、胃癌など胃悪性疾患の発生・進展のメカニズムを明らかにし、疾患の予防、新しい治療法の開発に役立てる。

3. 研究の方法

(1) Tn 細胞から Th17・Treg 細胞への分化における TGF- β シグナル伝達メカニズムの解析

末梢において Tn 細胞から Th17・Treg 細胞への分化に必要なとされる TGF- β のシグナル伝達メカニズムを解析し、相反する作用を持つこれら二つの細胞が TGF- β という同じサイトカインからの刺激により分化するメカニズムを特に Smad2/3 におけるリン酸化部位の差異に着目しつつ検討する。また、各胃疾患における宿主依存性の反応性 (粘膜免疫応答) の違いに TGF- β がどれほど関与するかを解明する糸口とする。

①マウス脾臓(または末梢血)よりリンパ球を分離し、フローサイトメーターを用いてナイーブTリンパ球(Tn; CD62L⁺CD4⁺)、Th17(IL-17⁺ CD4⁺)、Treg(Foxp3⁺ CD4⁺)をそれぞれ選択的に採取する。分離したそれぞれの細胞集団において、部位特異的抗リン酸化Smad2/3抗体を用いたフローサイトメトリーによりpSmad2/3C、pSmad2/3Lの割合を検討する。

②①と同様に分離した細胞集団からの検体を抗Smad2/3抗体で免疫沈降後、部位特異的抗リン酸化Smad2/3抗体を用いたウェスタンブロッティングにてSmad2/3蛋白のリン酸化状態を調べる。

③①の要領で分離した各細胞集団を部位特異的抗リン酸化Smad2/3抗体を用いて免疫細胞染色しSmad2、Smad3の細胞内局在を確認する。

④正常人の末梢血からフローサイトメーターを用いてTn(CD45RA⁺CD4⁺)、Th17(IL-17⁺ CD4⁺)、Treg(FOXP3⁺ CD4⁺)を分離し、①-④についてマウス検体と同様の実験を施行し、マウスとヒトの実験結果の差異を確認する。

(2)胃疾患におけるTh17、Treg、TGF-βによる粘膜免疫応答、発癌メカニズムの解析

コントロール群を含め各群のマウスを計画に沿って購入、処置(新生仔期胸腺摘除、ヘリコバクター感染)後飼育し、短期・長期感染モデルなどを作製し実験の準備状態を整える。

①C57BL/6マウス(Th1反応優位、ヘリコバクター胃炎強い、発癌あり)とBALB/cマウス(Th2反応優位、ヘリコバクター胃炎弱い、発癌なし)を購入し、各群n=10以上に設定する。

②以下の如く胃疾患モデルマウスを作製する。

・慢性萎縮性化生性胃炎; C57BL/6、生後8週にヘリコバクター・フェリスを1×10⁸経口接種、感染後3ヶ月まで飼育

・胃癌; 慢性萎縮性化生性胃炎モデルを感染後18ヶ月まで飼育

・自己免疫性胃炎(AIG); BALB/c、生後3-5日目に胸腺摘除、生後3ヶ月まで飼育

・濾胞性胃炎; 生後6週目のAIGマウスにヘリコバクター・ピロリを1×10⁸経口接種、感染後3ヶ月まで飼育

・胃MALTリンパ腫; 濾胞性胃炎モデルを感染後12ヶ月まで飼育

③部位特異的抗リン酸化Smad2/3抗体を用いて各疾患モデルマウスの胃粘膜を免疫染色し、pSmad2/3C、pSmad2/3L陽性細胞の分布状況を検討する。

④③により染色された細胞の分画、疾患モデルとの関係を解析するため、pSmad2/3CもしくはpSmad2/3Lと増殖マーカーとしてKi-67、上皮細胞のマーカーとしてサイトケラチン

8とともに蛍光二重染色を施行する。

⑤その他の消化管粘膜におけるpSmad2/3C、pSmad2/3Lの作用の解析として③④と同様の実験をマウス小腸、大腸においても施行する。

4. 研究成果

(1) Tn細胞からTh17・Treg細胞への分化におけるTGF-βシグナル伝達メカニズムの解析

末梢においてTn細胞からTh17・Treg細胞への分化に必要とされるTGF-βのシグナル伝達メカニズムを、特にSmad2/3におけるCOOH末端部、リンカー部のリン酸化部位の差異に着目しつつ検討した。

①Tn、Th17、Tregにソーティングしたマウス脾細胞を、フローサイトメーターにて部位特異的抗リン酸化Smad2/3抗体を用いてリン酸化部位別の割合を検討したが、各細胞間でリン酸化部位の有意な差は認められなかった。

②①のTn、Th17、Tregを抗Smad2/3抗体で免疫沈降後、部位特異的抗リン酸化抗体でウェスタンブロッティングを施行したが、各細胞間のタンパク量に有意な差は認められなかった。

③さらに各細胞を部位特異的抗リン酸化Smad2/3抗体で免疫細胞染色し、リン酸化部位別のSmadの細胞内局在についても検討したが、局在に関しても有意な差は認められなかった。

④正常人末梢血においても上記各結果と差異は無く、ヒトTn、Th17、Tregにおいてリン酸化部位特異的な変化に一定の傾向は認められなかった。

以上よりSmadのリン酸化部位の差が異なるリンパ球分化経路の分岐点であるという仮説は証明出来なかった。

(2)胃疾患におけるTh17、Treg、TGF-βによる粘膜免疫応答、発癌メカニズムの解析

コントロール群を含め各群のマウスを計画に沿って購入・処置後飼育し、ヘリコバクター短期・長期感染モデルなどを作製した。

①C57BL/6マウスを購入し、慢性萎縮性化生性胃炎のモデルと胃癌のモデルを、BALB/cマウスからAIG、濾胞性胃炎、胃MALTリンパ腫モデルを作製した。

②慢性萎縮性化生性胃炎・胃癌のモデルマウスの組織検体にて、部位特異的抗リン酸化Smad2/3抗体を用い、蛍光免疫染色を施行した。胃粘膜の炎症・胃底腺の萎縮・胃粘膜の過形成が進行するに従い、Smadのリンカー部がリン酸化されたpSmad2/3L陽性細胞が増加していた。一方完成された胃癌モデルにおいては、pSmad2/3L陽性細胞は正常レベルまで復していた。pSmad2/3L陽性細胞は胃粘膜峡部に存在し、正常マウスではごく少数であったが、慢性胃炎モデルマウスでは、Ki67の免疫染色で示された増殖領域の拡大に伴って著明に増加していた。以上よりヘリコバクタ

一胃炎においては、Smad2/3 のリンカー部のリン酸化が促進されることが明らかになった。また pSmad2/3L 陽性細胞はサイトケラチン 8 陽性を示し、上皮細胞であることが確認された。当初は免疫担当細胞に強く発現すると予想していたが、間質細胞にはほとんど pSmad2/3L の陽性細胞は認められず、上皮細胞の増殖に pSmad2/3L は関連しているものと考えられた。

AIG、濾胞性胃炎、胃 MALT リンパ腫モデルに関しては、正常胃粘膜と比較し上皮細胞には変化があまり無いためか、慢性胃炎モデルとは異なり、pSmad2/3L 陽性細胞は増加していなかった。

一方、pSmad2/3C の免疫染色では、特に強く発現する細胞はどのモデルにおいても見られなかった。

小腸、大腸においては腺管の底部に pSmad2/3L が陽性を示していた。

今後は、リンカー部のリン酸化部位のさらに詳細な部位特異的な抗体を使用して、リン酸化部位の特定や、陽性細胞の分画を解析し、今回の研究の成果を発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

①Koyabu M, Uchida K, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, 他 7 名. Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. J Gastroenterol. 査読有 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]

②Asada M, Nishio A, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Kido M, Watanabe N, Uchida K, Fukui T, 他 2 名. Analysis of Humoral Immune Response in Experimental Autoimmune Pancreatitis in Mice. Pancreas. 査読有 39, 2010, 224-231.

③Fukui T, 他 7 名. Endoscopic biliary plastic stenting and successful intentional stent retrieval in a benign biliary stricture with mural spherical calcification and porcelain gallbladder. Intern Med. 査読有 48, 2009, 809-813.

④Uchida K, Yazumi S, Nishio A, Kusuda T, Koyabu M, Fukata M, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, 他 3 名. Long-term outcome of autoimmune pancreatitis. J Gastroenterol. 査読有 44, 2009, 726-732.

⑤福井 寿朗, 他 3 名. 【H. pylori 感染と上部消化器疾患】病態との関連を巡って Acid-peptic disorder から腫瘍性疾患までヘリコバクター胃炎における CD8 陽性細胞の役割--MHC class 2 欠損マウスを用いた検討--. 消化器医学 査読無 6, 2008, 14-20.

⑥Okazaki K, Uchida K, Fukui T. Recent

advances in autoimmune pancreatitis: concept, diagnosis, and pathogenesis. J Gastroenterol. 査読有 43, 2008, 409-418.

⑦Fukui T, 他 4 名. Gastric mucosal laceration: a complication of manual bag-valve-mask ventilation. Clin J Gastroenterol. 査読有 1, 2008, 56-58.

〔学会発表〕(計 14 件)

①中島淳、清酒酵母由来チオレドキシンによるインドメサシン胃粘膜障害軽減効果の検討、第 6 回日本消化管学会総会学術集会、2010 年 2 月 19 日、福岡

②Kazushige Uchida, Analysis of Pancreatic and Peripheral Regulatory T Cells in Patients with Autoimmune Pancreatitis, DDW2009, 2009 年 6 月 2 日、シカゴ

③坂口雄次、WBN/Kob ラットの慢性膵炎・膵外病変における自己免疫性機序の関与及び制御性 T 細胞の免疫応答、第 95 回日本消化器病学会総会、2009 年 5 月 7 日、札幌

④三好秀明、制御性 T 細胞 自己免疫性膵炎における制御性 T 細胞に関する検討、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 2 日、京都

⑤三好秀明、自己免疫性膵炎における制御性 T 細胞に関する検討、第 36 回日本臨床免疫学会総会、2008 年 10 月 17 日、東京

〔図書〕(計 1 件)

①岡崎和一、内田一茂、福井寿朗、永井書店、見て診て学ぶ 膵腫瘍の画像診断、2009、336-342

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 寿朗 (FUKUI TOSHIRO)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：60402905

(2) 研究協力者

三好 秀明 (MIYOSHI HIDEAKI)
関西医科大学・医学部・大学院生
深田 憲将 (FUKATA NORIMASA)
関西医科大学・医学部・大学院生
小藪 雅紀 (KOYABU MASAKI)
関西医科大学・医学部・大学院生
岡崎 和一 (OKAZAKI KAZUICHI)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：70145126
松崎 恒一 (MATSUZAKI KOICHI)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70278638
内田 一茂 (UCHIDA KAZUSHIGE)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：40411516