

機関番号：82610

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790695

研究課題名 (和文) 消化管上皮細胞再生における TWEAK-Fn14 経路と IL-13 との相互作用

研究課題名 (英文) The interaction between the pathway of TWEAK-Fn14 and IL-13 in the intestinal epithelial cell regeneration

研究代表者

川島 麗 (KAWASHIMA REI)

独立行政法人国立国際医療研究センター 研究所 肝炎・免疫研究センター消化器疾患研究部・客員研究員

研究者番号：70392389

研究成果の概要 (和文)：マウス小腸一次培養において TNF- α によるアポトーシス誘導を caspase 活性として検出する実験系を作成した。これを用いて TNF- α により引き起こされる消化管上皮細胞傷害は IL-13 及び TWEAK/Fn14 経路に部分的に依存することを明らかにした。さらにヒト潰瘍性大腸炎の炎症局所でも IL-13 とともに TWEAK、Fn14 発現が上昇することやヒト粘膜への IL-13 添加実験により Fn14 発現が上昇することからも、これら因子の相互作用が潰瘍性大腸炎の炎症悪化にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)： We demonstrate that TNF- α -induced intestinal epithelial cell damage partially depend on TWEAK/Fn14 as well as IL-13. TNF- α , IL-13 and TWEAK/Fn14 synergistically contribute to the perpetuation and aggravation of intestinal inflammation, such as ulcerative colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：粘膜免疫学

科研費の分科・細目：医歯薬学・消化器内科学

キーワード：消化管上皮細胞傷害、サイトカイン、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

新規生物製剤である抗 TNF α 抗体療法は約 60%の炎症性腸疾患 (IBD) に画期的な効果をもたらし、これまでの治療方針を大きく変化させることになった。しかしながら、緩解維持のための長期投与の必要性から副作用の懸念もあり、さらに 40%程度の患者は治療抵抗群として残されている。従って、抗 TNF α 抗体に続く別の抗体療法の開発が必要となっている。TNF α 以外の TNF スーパーファミリー分子に IBD 治療薬の可能性を求め、細胞

増殖・血管新生・アポトーシスに関与する multifunctional なサイトカインとして知られる TNF-like inducer of apoptosis (TWEAK) の作用機構に着目した。申請者らはこれまでに、TNBS 誘導性消化管炎症モデルマウスにおいて、TWEAK およびその受容体である Fn14 欠損下では腸炎が軽減すること (Dohi et al, Gastroenterology 2008) を示している。一方、放射線粘膜傷害時には IL-13 が細胞間接着を傷害し (Kawashima et al, Gastroenterology 2006)、さらにアポトーシスを直接的に誘導することを示唆してきた。

2. 研究の目的

IL-13 作用と TWEAK-Fn14 経路がいずれも消化管粘膜傷害においての重要な役割を持つことは明らかであり、本研究では、この二つの経路の位置づけと作用の関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 消化管粘膜傷害モデルの作成

BALB/c マウス(WT マウス)、Fn14 遺伝子欠損マウス (Fn14KO マウス) および TWEAK 遺伝子欠損マウス (TWEAKKO マウス) に 3 Gy のガンマ放射線全身照射を行うことで消化管粘膜傷害を引き起こし、6 および 24 時間後の小腸および大腸を採取した。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

放射線照射を行ったマウス大腸から抽出した RNA を用いて Affymetrix マイクロアレイ法による RNA 発現解析を行った。WT マウスおよび TWEAKKO マウスにおける発現を比較し、発現遺伝子のヒートマップを作成した。

(3) 腸管組織一次培養法

WT マウスおよび Fn14KO マウス小腸を採取し、RPMI1640 にて洗浄した。小腸を一定長に切断後、7.5%ゼラチン含有培養液中で組織を一次培養した。その際、終濃度が 40ng/mL なるように調製したリコンビナントサイトカイン TNF- α および 100ng/mL なるように調製した TWEAK をそれぞれ培養液中に添加した。ヒト大腸組織を用いた一次培養においてのサイトカイン終濃度はいずれも 100ng/mL にて行った。37°C、5%CO₂ 条件下にて 15 および 40 分、4 および 6 時間の培養を行った。

(4) 免疫組織学的染色

腸管組織一次培養法にてサイトカイン刺激を行った組織をホルマリン固定しパラフィン切片を作成した。加熱前処理による抗原賦活化を行った切片を抗ベータカテニン一次抗体および FITC 標識抗マウス IgG 二次抗体を用いて検出した。

ZO-1 の検出には凍結切片を用いた。4%パラホルムアルデヒド/PBS 固定した切片の加熱前処理を行い、抗 ZO-1 一次抗体および TRITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて行った。

アポトーシスの検出は、パラフィン切片を用いて TUNEL 法により行った。

(5) クリプトの単離と培養

マウス小腸を 30mMEDTA/PBS でインキュベートし溶媒を 5 分おきに交換した。溶媒上

清を集めて 300Xg で遠心分離した。沈殿を i-PIPES バッファーで洗浄後、クリプト画分とした。約 100 個のクリプトを抗生物質含有 i-PIPES バッファー中で 4 時間培養した。その際、終濃度 40ng/mL になるようにリコンビナント IL-13 を添加した。

(6) 活性型カスパーゼの検出

腸管組織一次培養を行った組織を Lysis buffer でホモジネートし、遠心後の上清をサンプルとして SDS-PAGE を行った。ウエスタンブロッティングにより、抗カスパーゼ一次抗体および HRP 標識抗ウサギ IgG 二次抗体を用いて活性型カスパーゼを化学発光法にて可視化した。

(7) リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

被験者の同意のもとに得られたヒト潰瘍性大腸炎検体を炎症度により分類し、それぞれの組織において腸管組織一次培養法を施した。サイトカイン存在下での培養サンプルから RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を得た。IL-13、TWEAK および Fn14 遺伝子についてリアルタイム遺伝子発現解析を行った。

(8) 発癌モデルにおける影響

Th2 型優位 (従って IL-13 優位) のマウスでは大腸発癌頻度が比較的高いことを見いだしていたため、TWEAK/Fn14 が IL-13 を通して発癌機構にも関与している可能性を想定した。そこで、TWEAK/Fn14 遺伝子欠損マウスにおけるアゾキシメタン誘導化学発癌、アゾキシメタン+DSS 腸炎による炎症発癌の頻度を野生型マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) TWEAK-Fn14 経路は上皮細胞死誘導に必須

放射線照射により粘膜傷害を誘導したマウス大腸組織を用いてマイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行った。WT マウス、TWEAKKO マウスともにアポトーシス関連遺伝子の発現が増加したが、TWEAKKO マウスにおいてはその程度が低い傾向にあった。さらに、WT マウスにおいて減少傾向を示す cell cycle 関連遺伝子の発現は TWEAKKO マウスでは変化が見られなかった。これより、TWEAK-Fn14 経路は、ストレス性 cell cycle および細胞死に重要な役割を示すことが示唆された。

(2) IL-13 による細胞間接着の破壊は TWEAK 依存性

マウス小腸組織一次培養法を行ったとこ

る、WT マウスでは IL-13 刺激により細胞間接着分子であるベータカテニンの上皮細胞膜染色性が低下したが、Fn14KO マウスにおいては一定の染色性を維持していた。また、ZO-1 発現も Fn14KO マウスにおいて膜染色性が保たれた。

ヒト大腸組織において、IL-13 添加により ZO-1 の膜染色性が低下した。一方、IL-4 による細胞間傷害作用はほとんど見られなかった。

この IL-13 による細胞傷害性は、間質系細胞を介することなく上皮細胞に直接的であることを、クリプト培養によって証明した。

(3) 腸管上皮のアポトーシス誘導における IL-13、TWEAK/Fn14 および TNF α の相互作用

一次培養マウス小腸組織の TUNEL 染色を行った。WT マウスにおいて TNF- α による広範なアポトーシスが観察されたが Fn14KO マウスではアポトーシスが強いものの抑制される傾向が見られた。

続いて、アポトーシス誘導におけるカスパーゼ活性を測定することによりサイトカイン間の相互機構を検討した。ウェスタンブロッティングにより活性型カスパーゼ 3 発現を比較検討した。WT マウスにおいて TNF α 刺激では比較的早期の 15 分の時点で WT マウスにおけるカスパーゼ 3 活性化が見られたが、Fn14KO マウスでは抑制された。しかしながら、40 分後には Fn14KO マウスにおいてもカスパーゼ 3 活性化が観察された。さらに、IL-13 シグナルをブロックすると TNF α 誘導性カスパーゼ 3 活性に抑制が見られた。これより、IL-13、TWEAK/Fn14 および TNF α シグナルが互いに相互作用することで腸管上皮細胞においてアポトーシスを誘導することが示唆された。

(4) ヒト潰瘍性大腸炎の炎症重症度に依存して IL-13 および TWEAK-Fn14 発現が上昇

潰瘍性大腸炎検体を炎症部位および非炎症部位に分類し、各々組織から合成した cDNA を用いて mRNA 発現を解析した。IL-13、TWEAK および Fn14 mRNA 発現は、炎症部位において有意に上昇した。さらに、ヒト非炎症部位を用いて IL-13 添加実験を行ったところ、Fn14mRNA 発現が上昇した。これより、IL-13 および TWEAK-Fn14 共に炎症惹起に関与し、これら因子の相互作用が潰瘍性大腸炎の炎症悪化において重要である可能性が示唆された。

(5) 発癌モデルにおける影響

野生型マウスと Fn14 欠損マウスの大腸腫瘍

発生数の間に有意差は認められなかった。

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 Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, Burkly LC. TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology* 136:912-923, 2009.
- ② 川島 麗、土肥 多恵子「IL-13 による腸管上皮の透過性亢進の機序」臨床免疫・アレルギー科 55 巻 2 号 229-233

[学会発表] (計 5 件)

- ① Dohi, T., Kawashima, R., Kawamura, Y. I., Michaelson, J., Burkly, L.C. Effect of Combination Treatment With TNF-Inhibitor and Anti-TWEAK Antibody in Mouse Colitis Model. *Digestive Disease Week 2010 Annual Meeting* (New Orleans, USA) 2010 (poster)
- ② Tokuhira, Y., Suzuki, R., Kawashima, R., Fukuoka, S. I. Multiple Functions of Glycoprotein 2 (Gp2) in the Gastrointestinal Systems; A Link to Sorting, Packaging and Recycling of the Digestive Enzymes in the Exocrine Pancreas. *Digestive Disease Week Annual Meeting* (New Orleans, USA) 2010 (poster)
- ③ Kawashima, R., Kawamura, Y. I., Phongsisay, V., Okada, T., Toyama-Sorimachi, N., Kawamura Y. J., Konishi, F., Dohi, T. Intraperitoneal Secretion of Cytokines and Chemokines in Response to the Surgical Stress. *Digestive Disease Week Annual Meeting* (Chicago, USA) 2009 (poster)
- ④ Dohi, T., Kawashima, R., Burkly, L. C. Role of TWEAK (TNF-a-Like Weak Inducer of Apoptosis) in Intestinal Inflammation and Tissue Repair. *Digestive Disease Week Annual Meeting* (Chicago, USA) 2009 (poster)
- ⑤ 川島 麗、WU Ping、河村 由紀、岡田 俊彦、PHOGSISAY Vongsavanh、反町 典子、BURKLY Linda C、土肥 多恵子。TWEAK/Fn14 pathway promotes intestinal epithelial cell apoptosis 第 39 回 日本免疫学会総会 (大阪) 2009 示説

[図書] (計 1 件)

市川厚監修、福岡伸一監訳 マッキー生化学 第 4 版 2010 年発行 化学同人 全 801 ページ 第一章訳者 福岡 伸一・川島 麗

- [産業財産権] なし
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 麗 (KAWASHIMA REI)

研究者番号 : 7 0 3 9 2 3 8 9