

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月26日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890149

研究課題名（和文）IL-23 及び Th17 経路が腸管平滑筋収縮機能に与える影響とその作用機序

研究課題名（英文）Effects of IL-23 and Th17 on intestinal smooth muscle contractility and its underlying mechanism

研究代表者

伊原 栄吉 (IHARA EIKICHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80612390

研究成果の概要（和文）：本研究では、Th17 免疫応答に関連する二つのサイトカイン IL-23 と IL-17 が腸管平滑筋収縮性に与える影響について検討を行った。ラット小腸平滑筋において、IL-23 は K^+ 脱分極収縮反応を軽度低下したが、カルバコールによる収縮反応には影響を与えなかった。一方、IL-17 は K^+ 脱分極収縮反応及びカルバコールによる収縮反応を有意に低下させた。 α -toxin 処理脱膜下標本を作成し、IL-17 がカルバコールによる Ca^{2+} 感受性に与える影響を検討したところ、IL-17 は Ca^{2+} 感受性に影響を与えなかった。Th17 免疫応答は電位依存性 Ca^{2+} チャネル活性化に始まる Ca^{2+} /カルモジュリン/MLCK 経路に作用し、 Ca^{2+} 感受性を変えずに腸管平滑筋収縮性を低下させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The objective of the present study was to investigate effects of IL-23 and IL-17, which are associated with Th17 immune response, on the intestinal smooth muscle. In the rat intestinal smooth muscle, tissue culture with IL-23 for 3 days slightly reduced contractile response to 118 mM K^+ , but not to carbachol. On the other hand, tissue culture with IL-17 significantly decreased the contractile responses both to 118 mM K^+ and carbachol. In α -toxin permeabilized smooth muscle strips, IL-17 did not change carbachol-induced Ca^{2+} -sensitization. These results indicated that Th17 immune response reduced contractility in the rat intestinal smooth muscle without changing Ca^{2+} -sensitization via a Ca^{2+} /calmodulin/MLCK pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：IL-23、IL-17、Th17、消化管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

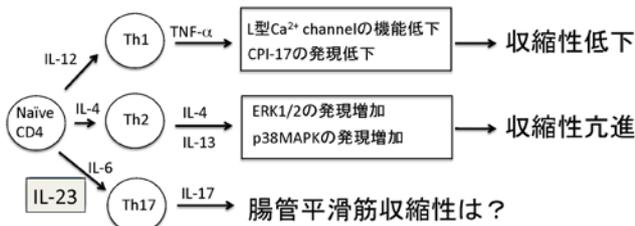
(1) 絶妙に協調された消化管運動は、ヒトの生命維持に必要不可欠である。消化管運動に

おいて、最も重要な役割を果たすのは消化管平滑筋である。一般に平滑筋の収縮程度は、ミオシン軽鎖（MLC₂₀）リン酸化レベルに比例

し、MLC₂₀リン酸化レベルは、相反する作用のミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) とミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP) との力関係によって、調節されている。MLCK は、細胞質カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) とカルモジュリン依存性に活性化されるのに対し、MLCP は、一般的には、 $[Ca^{2+}]_i$ からは影響を受けず、通常は、G 蛋白を共有する受容体の刺激によって活性化されたさまざまなプロテインキナーゼや CPI-17 という蛋白により制御されている。すなわち、MLCP 活性変化は、 Ca^{2+} 非依存性収縮を引き起こすが、この状態を収縮装置の Ca^{2+} 感受性変化と呼ばれている。過度な Ca^{2+} 感受性変化は、クモ膜下出血後血管攣縮、気管支喘息、過活動膀胱及び高血圧症などの病的な病態に深く関与し、治療のターゲットと考えられている。

(2) 近年、さまざまな原因の腸管炎症により誘導されたサイトカインが腸管平滑筋の収縮性に影響を及ぼし、病態に深く関与していることが示され、注目を集めている。消化管平滑筋収縮性の変化は、炎症の主体となっているサイトカインの種類や免疫応答の種類によって規定される。TNF- α が誘導された Th1 関連腸炎では、腸管平滑筋の収縮性低下を認めるが、その機序として、TNF- α が、CPI-17 の発現及び機能を抑制すること及び電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの機能を抑制することが解明された。一方、IL-4 及び IL-13 が上昇する Th2 関連腸炎では、腸管平滑筋の収縮性亢進を認めるが、私は、この腸管平滑筋収縮性の亢進に、MLCP 制御する ERK 1/2 と p38MAPK が関与することを解明した (Ihara E *Mol Pharmacol* 75: 1031-1041, 2009)。

(3) 古くよりクローン病は Th1 関連腸炎、潰瘍性大腸炎は Th2 関連腸炎として認識されてきたが、近年、Th1 や Th2 細胞とは異なる IL-17 を高レベルに産生する新しい Th サブセット、Th17 細胞が同定された。IL-23 は、Th17 を誘導維持に重要な役割をもち、最近、IL-23 はクローン病や乾癬などの自己免疫疾患の原因および治療ターゲットとして注目を浴びており、IL23 をターゲットとする治療は、すでに乾癬の治療に臨床応用されている。そのような点で、IL23 及び Th17 関連サイトカインが腸管運動機能に及ぼす影響及びその機序を解明することは非常に重要と考えられるが、未だ解明されてはいなかった。



2. 研究の目的

- (1) IL-23 が腸管平滑筋の収縮性と Ca^{2+} 感受性に及ぼす影響とその機序を解明する。
- (2) IL-17 が腸管平滑筋の収縮性と Ca^{2+} 感受性に及ぼす影響とその機序を解明する。

3. 研究の方法

- (1) ラット回腸平滑筋標本の作製と組織培養法の確立:

正常 Balb/c マウス (Female, 20g 程度) の終末回腸部腸管組織を得た。無菌下にて、実体顕微鏡を用いて、粘膜や粘膜下層等を剥離し回腸平滑筋組織を得た。それら組織を、L-glutamine、抗生物質及び抗真菌薬を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium 培養液を用いて組織培養を行う。3 日間の組織培養を行った後も、収縮性が保たれる条件を設定した (コントロール実験)。コントロールでの条件設定後、効果を見たいサイトカイン (IL-23 及び IL-17) の存在下にて、3 日間組織培養を行った。3 日後、前処置した平滑筋の収縮性をコントロールのそれと比較することにより、各サイトカインが回腸平滑筋の収縮性に及ぼす影響を評価した。

- (2) 組織培養を行ったラット回腸平滑筋組織の収縮性の評価:

各種条件下、組織培養した回腸平滑筋組織より、回腸縦走平滑筋条片 (3mm × 0.25mm) 作成。その平滑筋条片のカルバコール (CCh) に対する収縮性と KCL 脱分極刺激に対する収縮性を評価する。実際のプロトコールとしては KES (118 mM K⁺ extracellular solution) にて安定した収縮が得られてから、 10^{-8} M CCh と投与、ピークの収縮反応 (この濃度では収縮反応を認めないことが多い) が得られてから、NES (normal extracellular solution) にて wash し弛緩を得る。次に KES にて一度刺激した後、NES にて再び wash して弛緩状態とする。その後は、 10^{-7} M CCh、KES、 10^{-6} M CCh、KES、 10^{-5} M CCh、KES、 10^{-4} M CCh、KES と刺激し、CCh 濃度依存性の反応を評価する (Ihara E, *Mol Pharmacol* 75:1031-1041, 2009)。IL-23 にて処理した平滑筋条片とコントロールの平滑筋条片とで、CCh 及び KES に対する収縮反応性を検討する。なお張力の程度は、絶対張力を測定した。

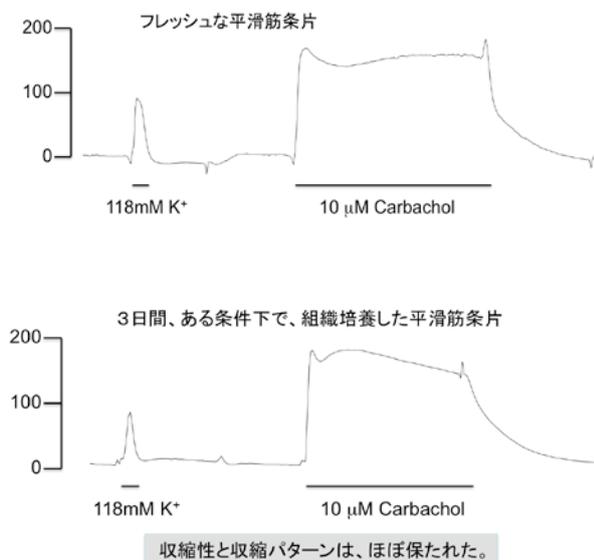
- (3) 脱膜下標本を用いた Ca^{2+} 感受性の評価: 前述の組織培養を行った回腸平滑筋条片を、 α -toxin にて処理し、脱膜下標本を作成する。この標本では、細胞外液を調整することにより、実験的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を自由に決定できる。細胞内 Ca^{2+} 濃度が、1 nM (pCa 9) では、MLCK は活性化されず、収縮は生じない。そこで、細胞内 Ca^{2+} 濃度を 300 nM (pCa 6.3) に

すると、MLCKが活性化されて、最大収縮の30%程度の収縮が生じる。この収縮に引き続いてCChを投与すると、十数%の上乗せされた収縮が生じる。この上乗せされた収縮は細胞内Ca²⁺濃度変化を伴わない収縮であり、CChが引き起こすプロテインキナーゼによるMLCP活性抑制によって生じたものであり、この上乗せ収縮はCChが引き起こすCa²⁺感受性の増加分を示すものである。この方法にて、IL-23がこのCChが引き起こすCa²⁺感受性を変化させるか否かを検討した。pCa9のレベルを0%、pCa4.5が引き起こす最大の張力のレベルを100%として、感受性の程度を%表示した。

4. 研究成果

(1) ラット回腸平滑筋組織を用いた組織培養の確立：

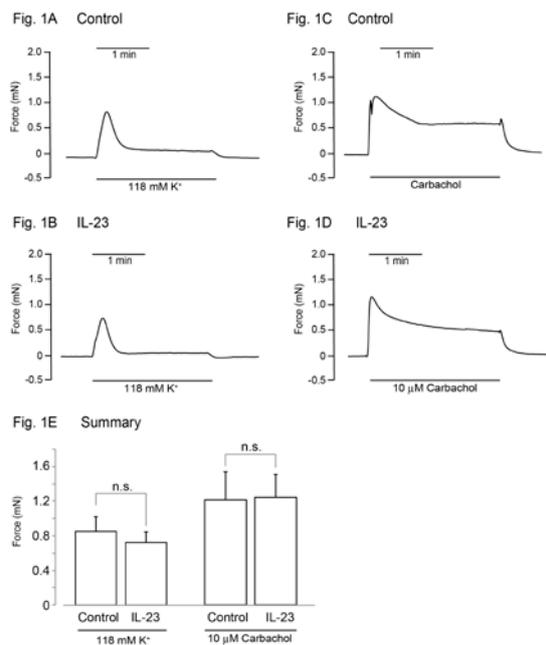
ラット回腸平滑筋組織を3日間、培養液に入れて組織培養を行ったところ、収縮性は明らかに低下した。組織状態を維持するために、グルタミン酸が必要であるが、通常用いるL-glutamineは代謝分解され、毒性アンモニアの蓄積が生じる。3日間の培養の結果、毒性アンモニアが蓄積し、組織障害を引き起こした結果、平滑筋収縮性が著しく低下したと考えられた。そこで我々は、L-glutamineを毒性代謝物の産生を抑える作用のあるL-alanyl-L-glutamine (dipeptide form of L-glutamine)に変更したところ、3日間組織培養を行っても平滑筋の収縮性が保たれることが判明した(下図)。



(2) IL-23が腸管平滑筋の収縮性とCa²⁺感受性に及ぼす影響：

3日間、組織培養した回腸平滑筋条片にお

いて、118 mM K⁺脱分極刺激を行ったところ、約15秒でピーク達する一過性の収縮反応を認めた(Fig. 1A)。一方、IL-23で3日間処理した回腸平滑筋条片において、118 mM K⁺脱分極刺激に対する反応は、コントロールのそれとほぼ同様の一過性の収縮反応を認めた(Fig. 1B)。IL-23処理した平滑筋条片における収縮の程度(0.72 mN)は、IL-23非存在下のコントロール(0.85 mN)と比較し、低下する傾向にあったが、統計的に有意差は認めなかった(Fig. 1E)。次に、CChに対する収縮反応を検討した。3日間、組織培養した回腸平滑筋条片において、CChを刺激すると、約10秒でピークに達する急速な収縮反応を認めた。その後張力は徐々に低下するが、完全には弛緩せず、持続性収縮相を形成する(Fig. 1C)。IL-23で3日間処理した回腸平滑筋条片においては、CCh刺激に対する反応は、コントロールとほぼ同様の反応を認めた(Fig. 1D)。実際、IL-23処理した平滑筋条片における10 μM CCh刺激に対する収縮の程度(1.24 mN)は、IL-23非存在下のコントロール(1.21 mN)と同様であった(Fig. 1E)。

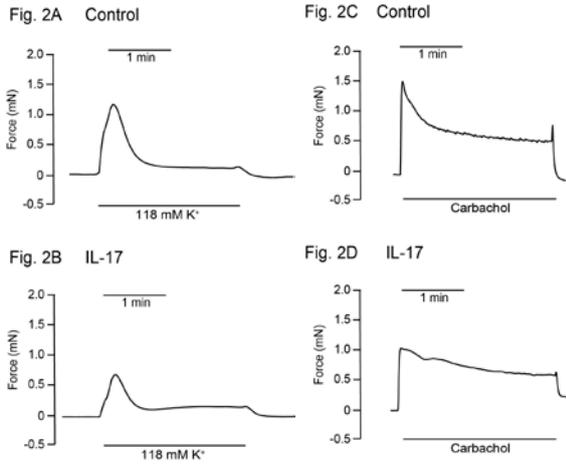


以上より、IL-23は、K⁺脱分極刺激に対する収縮反応を低下させることが示唆されたが、アゴニストであるCChが引き起こす収縮反応には、影響を与えないことが示された。

(3) IL-17が腸管平滑筋の収縮性とCa²⁺感受性に及ぼす影響：

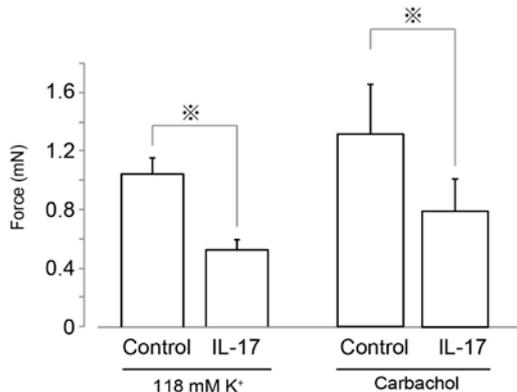
前述のように、IL-23は回腸平滑筋の収縮性に対して、ごく軽度の影響しかもたないことが判明したため、Th17免疫応答において、もう一つ重要な役割を果たすIL-17が回腸平滑筋条片に及ぼす影響について検討した。その結果、興味深いことに、3日間、IL-17存在

下にて組織培養した回腸平滑筋条片において、118 mM K⁺脱分極刺激に対する反応(0.52 mN)は、コントロール(1.03 mN)と比較して、有意に低下した(Figs. 2A、2B、2E)。



一方、IL-17 処置は、CCh に対する収縮性も低下させた。すなわち、前述のように、組織培養した回腸平滑筋条片(コントロール)に 10 μM CCh を投与すると持続相を伴った一過性収縮反応を認めた(Fig. 2C)。IL-17 処置は、これら CCh が引き起こす収縮反応のうち、持続相には影響を与えず、初期の一過性収縮反応のみを抑制した(Figs. 2C、2D)。10 μM CCh による初期の収縮は、コントロールは 1.33 mN であったが、IL-17 処置により、0.80 mN まで有意に低下した(Figs. 2C、2D、2E)。

Fig. 1E Summary



一般に、CCh が引き起こす収縮反応のうち、初期の収縮は、Ca²⁺に依存した収縮反応で、持続収縮相は、プロテインキナーゼが制御する MLCP の活性調整による収縮反応と考えられている。IL-17 処置が、初期の収縮相のみを抑制することは、その収縮抑制の機序として、Ca²⁺非依存性収縮反応(Ca²⁺感受性)を抑制するのではなく、Ca²⁺に依存する収縮反応を抑制していると推測される。一方、K⁺脱分極収縮反応の機序は、細胞膜を脱分極させることで、L 型電位依存性 Ca²⁺チャネルを活性

し、細胞質カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)を上昇させた結果、Ca²⁺/カルモジュリン/MLCK 経路の活性化を介して、収縮を起こすことである。したがって、IL-17 処置がこの K⁺脱分極収縮反応を抑制したことは、IL-17 処置が Ca²⁺に依存する収縮反応を抑制していることを強く示す所見である。すなわち、IL-17 処置は、平滑筋収縮装置の Ca²⁺感受性に影響を与えることなしに、収縮の程度を低下させていると考えられる。

そこで、次に、IL-17 が CCh による収縮反応の Ca²⁺感受性に影響を与えないことを確認するため、α-toxin 脱膜下標本を用いて更なる検討を行った。

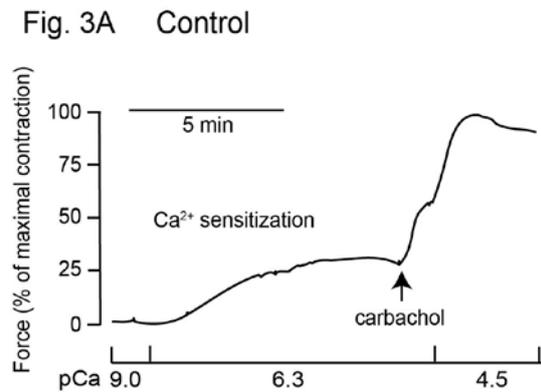
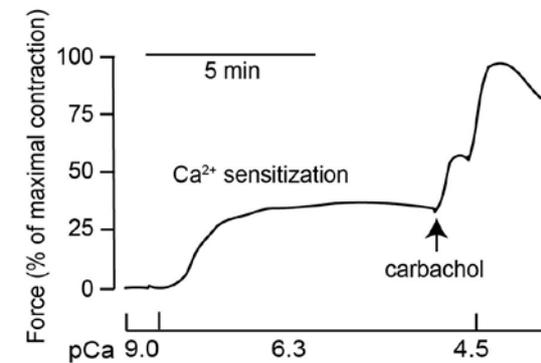


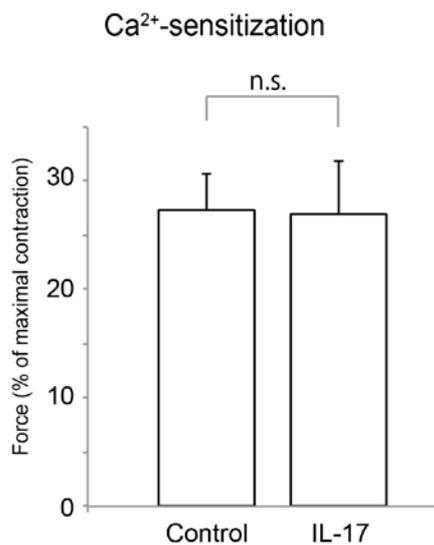
Fig. 3B IL-17



コントロールの条件にて組織培養を行った回腸平滑筋条片に対して、α-toxin にて脱膜化標本を作成した。この標本において、pCa 6.3 は、pCa 4.5 が引き起こす最大の収縮反応の 30%程度の収縮反応を引き起こした。この収縮は、完全に Ca²⁺/カルモジュリン/MLCK 経路を介する収縮反応である。この収縮の最中に、10 μM CCh を加えたところ、細胞内 Ca²⁺濃度は変化していないにも関わらず、更なる収縮、すなわち、CCh が引き起こす Ca²⁺感受性に相当する収縮が得られた(Fig. 3A)。一方、IL-17 存在下にて組織培養した回腸平滑筋条片においても、同様の実験を行うことが可能であった(Fig. 3B)。その結果、CCh が惹起する Ca²⁺感受性は、コントロールにて

27.3%、IL-17 処置した平滑筋標本にて 26.9% で両者に有意差はなく、L-17 は CCh による Ca^{2+} 感受性に影響を与えないことが確認された (Fig. 3C)。

Fig. 3C Summary of carbachol-induced



以上、本研究では、Th17 免疫応答は電位依存性 Ca^{2+} チャンネル活性化に始まる Ca^{2+} /カルモジュリン/MLCK 経路に作用し、 Ca^{2+} 感受性を変えることなしに、腸管平滑筋収縮性を低下させることが示唆された。これらの反応が広く通用する法則であるか否かは、今後、動物種や平滑筋組織をかえて、さらなる検討が必要であると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊原 栄吉 (IHARA EIKICHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80612390

(2) 連携研究者

中村 和彦 (NAKAMURA KAZUHIKO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00274449