

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460378

研究課題名(和文) 腸管バリア破綻に關する新規因子 Focal Adhesion Kinase

研究課題名(英文) Maintenance of intestinal barrier function by focal adhesion kinase

研究代表者

谷口 隆信 (TANIGUCHI, Takanobu)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60217130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍壊死因子 (TNF) を培地に添加して炎症状態を再現した所、添加8時間後から腸上皮バリア機能が低下し、この低下はアセチルコリンまたはカルバコールの添加により緩和され、更にこの低下の緩和はアトロピンの追加によって消失した。この時、NF- κ Bの活性化および複数の炎症関連遺伝子の発現がムスカリンシグナルによって抑制されており、TNFによって誘導されるIL-8の分泌も抑制されていた。以上の結果から、炎症時の腸上皮バリア障害に対して、腸上皮に存在するムスカリン受容体はバリア機能を補強すると同時に炎症の進展/拡散を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumor necrosis factor alpha (TNF) induced the reduction of TER in HT-29/B6 monolayers which was attenuated by acetylcholine or charbacol treatment. This attenuation was cancelled by the addition of atropine. TNF-induced activation of NF- κ B system was inhibited by acetylcholine or charbacol treatment. This inhibition was also suppressed by the addition of atropine. TNF induced increase in the expression of inflammatory genes such as COX-2 and IL-8 genes and the excretion of IL-8 in the culture medium which were attenuated by charbacol treatment. This attenuation was also cancelled by the addition of atropine. These results suggest that muscarinic signaling system may enforce intestinal epithelial barrier function against inflammatory barrier disruption and may prevent inflammatory expansion at the same time.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：focal adhesion kinase intestinal barrier muscarinic cholinceptor

1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎は慢性炎症性腸疾患の一種であり、消化管の炎症が緩解・再燃を繰り返しながら慢性に経過する。病因については遺伝的素因や環境因子に加え、免疫要因の関与が重要と考えられているが、その詳細については不明である。喫煙習慣の有無とは明らかな相関があり、特に活動性潰瘍性大腸炎に対しては臨床的にムスカリンの有効性が示されているが¹⁾、その治療的効果発現の詳細は明らかではない²⁾。我々は oxazolone により誘導される潰瘍性大腸炎マウスモデルにおいて、腸上皮特異的な focal adhesion kinase (FAK) の発現上昇を見出し³⁾、ヒトの潰瘍性大腸炎症例においても腸上皮での FAK の発現上昇が観られることを報告している⁴⁻⁶⁾。さらに、腸上皮バリア機能の維持修復における FAK の重要性^{5, 6)}とマウス腸上皮細胞におけるムスカリン受容体から FAK の活性化に繋がる経路の存在を示し⁷⁾、ムスカリン受容体からのシグナルが炎症による腸上皮バリア機能の障害を緩和している可能性を報告した⁸⁾。

2. 研究の目的

腸上皮細胞におけるムスカリン受容体を介したバリア障害緩和機構について解明を進める。

3. 研究の方法

ヒト大腸がん由来の HT29/B6 細胞をトランスウェル内で単層に培養し、これを介する電気抵抗 (Trans-epithelial Electrical Resistance, TER) を測定してバリア機能を評価した。

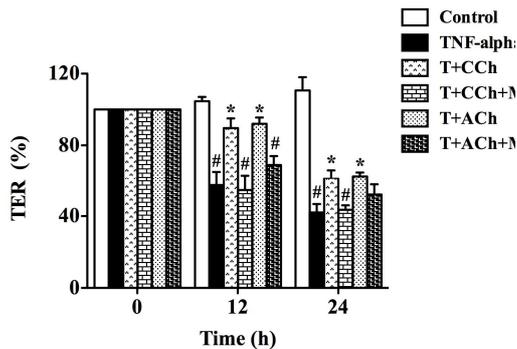


図1 ムスカリン受容体を介するバリア障害緩和作用

4. 研究成果

(1) 図1に示すように HT29/B6 単層培養に TNF (100 ng/ml) を加えることによりバリア機能の低下が生じるが、この低下はカルバコール (CCh) またはアセチルコリン (ACh) の添加によって減弱した。これらの減弱はアトロピン (Mec) の追加によって消失した。NF-kB は TNF などのサイトカイン刺激によって活性化され炎症を進展させる因子であるが、図2に示すように TNF によるこの活性化

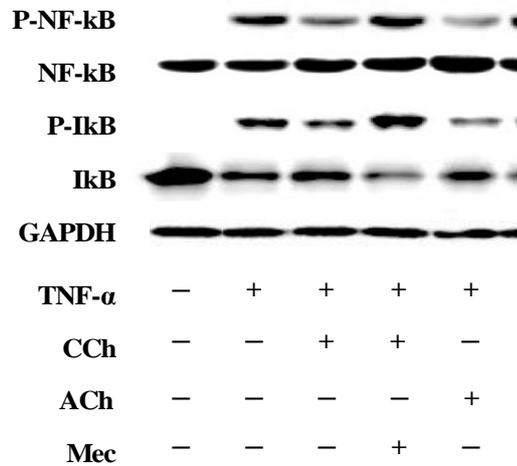


図2 ムスカリン受容体を介する NF-kB 抑制

は CCh または ACh の添加によって減弱し、さらにこれらの減弱は Mec の追加によって消失した。

TNF 刺激は様々な炎症関連タンパク質の発現を亢進させるが、図3に示すように亢進した IL-8 と Cox-2 の発現は CCh の添加で抑制され、この抑制は Mec の追加によって消失した。IL-8 については図4に示すように培地中への分泌量を検討し、TNF による分泌亢進は CCh 添加で減弱し、この減弱は Mec の追加によって消失した。

腸管においては食餌や微生物等に由来する様々な外来抗原に対し、自然免疫系と獲得免疫系が協働して成熟した免疫能が形成されていくと考えられている。また、腸上皮は体外である腸管腔と体内を隔てる物理的バリアとして機能することにより過剰な免疫応答を抑制すると同時に、上皮細胞は自ら内因性抗菌物質やサイトカインを産生分泌し、積極的に粘膜防御や免疫制御を担っていると考えられている。潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患においてはこのバリア機能を含む免疫防御の破綻が原因となっていると考えられているが、その詳細は不明である⁹⁾。

潰瘍性大腸炎においては、喫煙習慣の有無との相関があり、特に活動性潰瘍性大腸炎に対

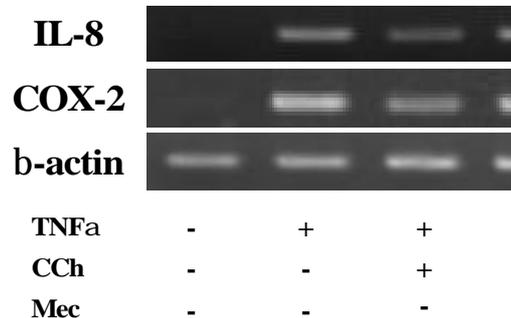


図3 炎症関連遺伝子発現の抑制

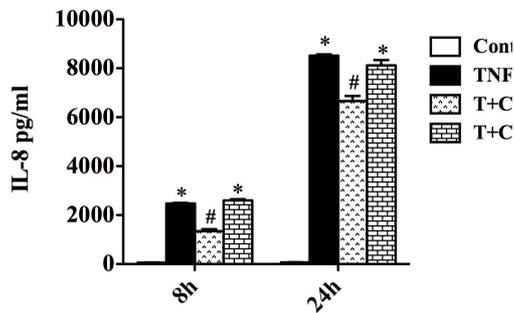


図4 IL-8分泌の抑制

しては臨床的にもムスカリンの有効性が示されている¹⁾。近年、ムスカリン受容体が免疫担当細胞表面に存在し、免疫応答を調節していることが示され¹⁰⁻¹⁴⁾、ムスカリンの有効性との関連が示唆されている。

我々はマウスの oxazolone 誘導潰瘍性大腸炎モデルにおいて、腸上皮特異的な FAK の発現上昇を見出し³⁾、ヒトの潰瘍性大腸炎症例においても腸上皮において炎症とともに FAK の発現が上昇していることを報告している⁴⁻⁶⁾。さらに我々は FAK の腸上皮バリアにおける重要性や^{5, 6)}、ムスカリン刺激によって FAK が活性化し腸上皮バリア機能を補強している可能性を示し⁶⁾、ムスカリン受容体からのシグナルが炎症による腸上皮バリア機能の障害を緩和している可能性を報告してきた⁸⁾。ムスカリン受容体を発現している HT-29/B6 細胞単層培養において、TNF によるバリア機能の低下が観察され、ここに CCh あるいは ACh を加えるとバリア機能の低下が緩和された。これらの緩和作用はムスカリン受容体のアンタゴニストである Mec の追加によって消失したことから(図1)ムスカリン受容体を介するシグナルが炎症によるバリア機能障害の緩和に関わっていると考えられた。また、TNF によって活性化される細胞内シグナル伝達経路の一つである NF- κ B 経路について、TNF による NF- κ B の活性化は CCh あるいは ACh によって抑制され、この抑制は Mec を追加することによって緩和された(図2)。さらに、TNF 刺激によって亢進する炎症関連遺伝子発現や分泌もムスカリン受容体シグナルによって抑制されていた(図3-5)。これらの結果より、炎症時の腸上皮バリア障害に対して、腸上皮に存在するムスカリン受容体はバリア機能を補強すると同時に炎症自体の進展/拡散を抑制している可能性が示唆される。これまでムスカリンの作用は免疫系を介すると考えられて来たが、我々の実験結果は別のメカニズム、即ち腸上皮バリア機能の補強と炎症進展/拡散の抑制効果による潰瘍性大腸炎寛解作用の存在を示唆するものである。

<引用文献>

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Offord KP, et al. *Transdermal nicotine for*

mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 1997; 126: 364-371.

Mandavilli A. *Nicotine fix. Nat Med* 2004; 10: 660-661.

Ma Y, Semba S, Taniguchi T, et al. *Oxazolone-induced over-expression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model. FEBS Lett* 2010; 584: 3949-3954.

谷口、仙葉、加藤、et al. 慢性炎症性腸疾患の病態に關与するプロテインキナーゼの同定とそのニコチンによる影響の解析 *喫煙科学研究財団研究年報* 2010; 平成 22 年度: 231-235

Ma Y, Semba S, Khan MRI, Bochimoto H, Watanabe T, Fujiya M, Kohgo Y, Liu Y, Taniguchi T. *Focal Adhesion Kinase Regulates Intestinal Epithelial Barrier Function via Redistribution of Tight Junction. Biochim Biophys Acta* 2012; 1832: 151-159.

Khan RI, Yazawa T, Anisuzzaman AS, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Ikeuchi H, Uchino M, Maemoto A, Muramatsu I, Taniguchi T. *Activation of focal adhesion kinase via M1 muscarinic acetylcholine receptor is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury. Biochim Biophys Acta* 2014 Apr; 1842: 635-645.

谷口、矢澤 腸上皮におけるニコチン受容体の同定とその慢性炎症性腸疾患への關与 *喫煙科学研究財団研究年報* 2012; 平成 24 年度: 311-314

谷口、矢澤 腸上皮におけるニコチン受容体の同定とその慢性炎症性腸疾患への關与 *喫煙科学研究財団研究年報* 2013; 平成 25 年度: 306-309

Podolsky DK. *Inflammatory bowel disease. N Engl J Med* 2002; 347: 417-429

Wang H, Yu M, Ochani M, et al. *Nicotinic acetylcholine receptor 7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature* 2003; 421: 384-388.

Clayburgh, D.R., Shen, L. and Turner, J.R. (2004) A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab. Invest.* 84: 282-291.

Hirota, C.L. and MacKay, D.M. (2006) Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *Br. J. Pharm.* 149:

463-479.

Peng,Z.,Heath,J.,Drachenberg,C.,Raufman,J.P.andXie,G.(2013)Cholinergic muscarinic receptor activation augments murine intestinal epithelial cell proliferation and tumorigenesis. **BMC Cancer** 13: 204.

旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：70580314

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)

Khan RI, Yazawa T, Anisuzzaman AS, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Ikeuchi H, Uchino M, Maemoto A, Muramatsu I, Taniguchi T. *Activation of focal adhesion kinase via M1 muscarinic acetylcholine receptor is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury.* **Biochim Biophys Acta** 2014 Apr; 1842: 635-645.

Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Umezawa A, Taniguchi T. *Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells.* **World J Stem Cells** 2014; 6: 203-12

[学会発表](計1件)

Islam T, Khan MRI, Yazawa T, Taniguchi T. *Activation of FAK via M1 muscarinic acetylcholine receptor is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury.* **第87回日本生化学会大会** (2014年10月16日、京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 隆信 (TANIGUCHI, Takanobu)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60217130

(2)研究分担者

矢澤 隆志 (YAZAWA, Takashi)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00334813

竹内 昌之 (TAKEUCHI, Masayuki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40226999

加藤 剛志 (KATOH, Tsuyoshi)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60194833

宇和田 淳介 (UWADA, Junsuke)