

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590181

研究課題名（和文） 生体内での DNA 断片化誘発および DNA 修復機構の解析

研究課題名（英文） DNA fragmentation of mouse small intestinal epithelial cells by iIEL and DNA repair in the epithelial cells

研究代表者

尾形 雅君 (OGATA MASAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50311907

研究成果の概要（和文）：

抗 CD3 抗体を生体マウス腹腔に投与する in vivo 実験系を用いて、小腸絨毛上皮細胞に DNA 断片化が誘導され、さらにその後核内の損傷部位に DNA 修復関連分子が集積・動員されること我々は免疫組織化学的に観察した。DNA 断片化を検出する TUNEL 法では、一旦断片化した DNA が抗体投与後 60 分以内に迅速に修復されることを確認した。DNA 断片化それ自体だけでは細胞死を意味せず、DNA 断片化後にも絨毛上皮細胞は生きて DNA を修復することが判明した。DNA 断片化はそれのみでは細胞死の徴候ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In the in vivo mouse experiment system in which mice were intraperitoneally given anti-CD3 antibody (Ab), DNA fragmentation (DNA-Frag) was induced in intestinal epithelial cells (IEC), and we immunohistochemically observed the subsequent accumulation and recruitment of DNA-repair related proteins in the DNA-fragmented IEC, and further confirmed that once-fragmented-DNA is repaired rapidly within 60 min. DNA-Frag per se does not necessarily lead to cell death. IECs survived after DNA-Frag and repaired DNA. DNA-Frag by itself was found to be not an essential indication of cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：DNA 断片化、DNA 修復、小腸、iIEL、上皮細胞、免疫組織化学、電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

腸管は常に様々な抗原や病原菌にさらされており、栄養成分の吸収と同時に、病原菌の排除などの複雑な役割を担っている。そのため、腸管にはパイエル板、腸間膜リンパ節などからなる腸管関連リンパ組織(GALT)が備わっている。特に腸管上皮層に存在する腸上皮細胞間リンパ球(IEL)と小腸上皮細胞(IEC)については、特に小腸粘膜の生体内防御機構への関与について注目されているものの、その詳細については未だ不明である。

そこで本研究課題では、このIELおよびIECの機能検索を行う上で、先に確立している有用な *in vivo* 実験系を用いて、一連の現象に関与する機構について機能形態学的に検討した。

2. 研究の目的

[DNA断片化誘発機構]

予備的な所見で、抗CD3抗体による刺激後、iIELが含有する顆粒を細胞外に放出し、小腸絨毛上皮細胞間に空隙が生じる像をとらえており、小腸絨毛上皮細胞のDNA断片化誘導にはiIELから分泌される細胞障害性顆粒(perforin-granzyme系)が関与する結果も得ている。この顆粒を持ったやや大型のリンパ球の形態を示すiIEL(TCR $\gamma\delta$ -iIELと推察)に注目し、抗CD3抗体刺激後におけるiIELからの顆粒の性状・放出・分泌について、免疫組織化学的に解析し、電顕的に詳細な形態学的解析を加え、顆粒内に含まれると推察されるDNA断片化誘導に関与する因子の同定を行った。

[DNA断片化後のDNA修復機構]

一旦DNAの断片化が生じた小腸上皮細胞にDNA修復(TUNEL染色性の消失)が確実に観察される。したがって報告されている多数のDNA修復関連分子の特異抗体を用いて免疫組織化学的手法を中心に検討を行って。修復はDNA断片化誘発と同一の時系列でみられる現象であるため、DNA断片化とTUNEL染色性の消失、それにDNA修復関連分子の出現・消失過程を詳細に経時的に解析した。

3. 研究の方法

iIEL活性化の生体内解析系(マウス)を利用し、(1)DNA断片化誘発機構と(2)DNA断片化後のDNA修復機構の2点について検討した。

(1) DNA断片化誘発機構

① 抗CD3投与で活性化する顆粒を持つiIELの同定

「特異抗体($\gamma\delta$ -TCR, $\alpha\beta$ -TCR)投与による上皮細胞でのDNA断片化誘発の確認」

「iIELの顆粒に含まれる細胞傷害性因子の免疫組織化学的解析」

② iIEL活性化の生理学的意義の考察

「抗CD3抗体刺激後におけるiIELの形態変化および顆粒放出像のTEM解析」

「iIEL活性化に伴う上皮細胞の剥離および絨毛短縮化現象の形態組織学的解析」

③ 絨毛上皮細胞のDNA断片化を直接誘導する因子の解明

「数種の遺伝子操作マウスを用いた、DNA断片化誘導に関与する細胞障害性因子の同定」

(2) DNA断片化後のDNA修復機構

① 小腸絨毛上皮細胞におけるDNA断片化後のDNA修復機構の解析

「TUNEL染色法およびBrdU標識実験を用いて、DNA断片化誘発した細胞におけるDNA修復の確認」

「DNA修復時に発現する修復関連分子の免疫組織化学的解析」

「DNA修復関連分子発現の部位および動態の免疫組織化学的解析」

「DNA修復関連分子の発現動態とDNA断片化の経時的变化との比較検討」

4. 研究成果

(1) DNA断片化誘発機構

抗CD3抗体投与後に観察される絨毛上皮細胞におけるDNA断片化誘導は、抗 $\gamma\delta$ -TCR抗体投与で再現されるが抗 $\alpha\beta$ -TCR抗体投与ではみられないことより、十二指腸および空腸の絨毛上皮細胞間に多く存在する $\gamma\delta$ -iIELの活性化によるものであること、さらに、TNF α とTNF受容体欠損マウスを使用した実験の結果、TNF α は上皮細胞の剥離には関係するが、DNA断片化は誘導せず、絨毛上皮細胞におけるDNA断片化誘発と細胞剥離誘導の機構は異なることも明らかにした。

iIEL活性化に伴う絨毛上皮細胞のDNA断片化誘発機構については、TEM解析で抗体刺激後にiIELが含有する顆粒が細胞外に放出され、iIELと上皮細胞との間に空隙が生じる形態像が観察された。さらに免疫組織化学的解析ではiIELの細胞質内にgranzymeBが確認され、抗体刺激後に細胞外(上皮細胞との間隙)にgranzymeBが放出される像も観察されたことより、上皮細胞のDNA断片化誘導には、iIELから分泌される細胞障害性顆粒(perforin-granzyme系)が関与していることが強く示唆された。

また、 $\gamma\delta$ -iIELおよびgranzymeB陽性細胞の分布には、絨毛各部位(先端部、中間部、基部)で差がみられないのに対して、TEM

解析によるiIELの形態観察では、顆粒を有するリンパ球と顆粒のないリンパ球が存在することが確認された。またiIEL刺激後に、隣接する上皮細胞との間に隙間（iIELから放出されたと推察される顆粒状の構造物も観察）が生じる形態変化も、絨毛の中央部から先端部位において多く確認されるなど、iIELが存在する部位（絨毛の高さ）の違いで形態的にも機能的にも異なるiIELの亜群が存在する可能性が示唆された。

(2) DNA断片化後のDNA修復機構

iIELの活性化によって一旦DNAの断片化が生じた小腸上皮細胞において、その後TUNEL陽性反応が陰性化する現象を見出している。そこで、一度生じたDNAの断片化が生体内でどのように修復されるのか、DNA修復関連分子の同定と修復機構を解析した。

マウスに抗CD3抗体を投与して空腸のiIELを活性化させると、30分以内に絨毛全体の上皮細胞にDNA断片化が誘発されるが、1時間後にはDNA断片化はほとんど検出されなくなり、2時間後、絨毛内の約半数の上皮細胞が剥離して絨毛が短縮化するが、絨毛内に残った上皮細胞にはDNAの断片化は全く検出されなかった。そこでこの現象における迅速な細胞増殖に伴う絨毛上皮のrenewalの可能性をBrdU標識実験で検討した。その結果、DNA断片化が検出されなくなった1時間後の上皮細胞は、抗体刺激によるiIEL活性化の前から絨毛内に存在していたことが確認された。つまり、一旦DNA断片化が誘発された上皮細胞において、その後、迅速にDNA修復が行われたことを意味する。

酵母やヒトの培養細胞を用いたin vitro実験系では、放射線照射によりDNA二重鎖切断(DSB)を誘導させ、その後の修復機構について調べられているが、放射線等によって誘導されたDSBsは、主にNHEJおよびHRRの二つの修復経路が同じDSB部位において相互作用し傷害が修復されると報告されている。またDSB部位へのDNA修復関連タンパクの共局在についても研究報告されているが、詳細な相互作用や時間的経過については不明な点が多い。そこで、この生体の実験系を用いて、絨毛上皮細胞におけるDNA修復関連分子(γ -H2AX、Nbs1、ATM)の発現動態について免疫組織化学的手法で解析した。

その結果、数種のDNA修復関連分子がDNA断片化を生じた上皮細胞の核内で検出され、修復関連分子が断片化を修復するために集積・動員されることが確認された。また本実験で確認されたDNA修復関連分子の発現動態は、DNA断片化の経時変化と完全に一致していることから、生体内でのDNA

修復が確かな現象であることを強く支持する結果が得られた。

つまり、細胞にDNA断片化が生じて、それは直接的に細胞の死を意味する訳ではなく、迅速にDNAが修復されることが明らかとなった。

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 16 件)

- ① Matsutani T, Ogata M, Fujii Y, Kitaura K, Nishimoto N, Suzuki R, Itoh T. Shortening of complementarity determining region 3 of the T cell receptor α chain during thymocyte development. 査読有 Molecular Immunology. 48(4): 623-629. 2011.
- ② 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏 マウス小腸絨毛における iIEL の分布および形態学的性状. 査読有 リンパ学. 34: 2011. (印刷中)
- ③ Fujii Y, Matsutani T, Kitaura K, Suzuki S, Itoh T, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. Comprehensive analysis and characterization of the TCR alpha chain sequences in the common marmoset. 査読無 Immunogenetics. (6): 383-395. 2010.
- ④ 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏 iIELによる小腸絨毛上皮細胞のDNA断片化後のDNA修復. 査読有 リンパ学. 32: 71-74. 2009.
- ⑤ Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. 査読無 Immunology. 128: e315-24. 2009.
- ⑥ Kitaura K, Kanayama K, Fujii Y, Shiobara N, Tanaka K, Kurane I, Suzuki S, Itoh T, Suzuki R. T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment. 査読無 Experimental Animals. 58: 159-168. 2009.
- ⑦ 北浦一孝, 金山喜一, 藤井克樹, 塩原教之, 田中こなぎ, 倉根一郎, 鈴木さつき, 伊藤恒敏, 鈴木隆二 BALB/c マウスにおける T細胞レセプターレパートア解析 組織・性別・週齢およびヒドロコルチゾン投与による影響. 査読無 Experimental Animals. 58: 159-168. 2009.
- ⑧ 会津清英, 伊藤恒敏.

培養細胞株の微細形態学的検索. 査読無
医学と生物学. 153: 488-492. 2009.

⑨ Ogata M, Oomori T, Soga H, Ota Y, Itoh A, Matsutani T, Nanno M, Suzuki R, Itoh T. DNA repair after DNA fragmentation in mouse small intestinal epithelial cells. 査読有

Cell and Tissue Research. 335: 371-382. 2009.

⑩ Uehara Y, Ikehata H, Komura J, Ito A, Ogata M, Itoh T, Hirayama R, Furusawa Y, Ando K, Paunesku T, Woloschak GE, Komatsu K, Matsuura S, Ikura T, Kamiya K, Ono T. Absence of Ku70 gene obliterates X-ray-induced lacZ mutagenesis of small deletions in mouse tissues. 査読有

Radiation Research. 170: 216-223. 2008.

⑪ 尾形雅君, 松谷隆治, 伊藤亜里, 伊藤恒敏 iIELによる絨毛上皮細胞のDNA断片化誘発機構と上皮細胞におけるDNA修復機構. 査読有
リンパ学. 31: 6-9. 2008.

⑫ Yamane N, Tanaka Y, Ohyabu N, Yamane S, Maekawa K, Ishizaki J, Suzuki R, Itoh T, Takemoto H.

Characterization of novel non-peptide thrombopoietin mimetics, their species specificity and the activation mechanism of the thrombopoietin receptor. 査読無
European Journal of Pharmacology. 586: 44-51. 2008.

⑬ Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor. 査読無
The Journal of Rheumatology. 35: 960-968. 2008.

⑭ Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.

Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. 査読無
Journal of Inflammation (Lond). 5: 5. 2008.

⑮ Yamane N, Takahashi K, Tanaka Y, Kato K, Takayama M, Ohyabu N, Shiota T, Takenaka H, Yoshida Y, Hara S, Murashi T, Nakamura E, Nishitani Y, Ishizaki J, Yamane S, Nagata K, Koizumi K, Yutsudo T, Suzuki R, Itoh T, Takemoto H.

Discovery of novel non-peptide thrombopoietin mimetic compounds that induce megakaryocytopoiesis. 査読無

Bioscience Reports. 28: 275-285. 2008.

⑯ Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T.

Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis. 査読無

The Journal of Rheumatology. 35: 2316-2324. 2008.

[学会発表] (計7件)

① 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏.

マウスの小腸絨毛における iIEL の分布および形態学的性状.

第34回日本リンパ学会総会、東京(2010.6.26)

② 大田祐太, 尾形雅君, 松谷隆治, 伊藤恒敏.

マウス小腸絨毛における腸上皮細胞間リンパ球の解析.

第115回日本解剖学会総会、盛岡(2010.3.30)

③ Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Takasaki Too, Ogata M, Suzuki S, Itoh T, Kurane I, Suzuki R.

コモンマーマセックT細胞受容体 α 鎖および β 鎖配列の網羅的解析.

第39回日本免疫学会総会、大阪(2009.12.4)

④ 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏.

iIELによる小腸絨毛上皮細胞のDNA断片化後のDNA修復.

第33回日本リンパ学会総会、大阪(2009.7.18)

⑤ 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏.

マウス小腸における絨毛上皮細胞のDNA修復機構.

第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、岡山(2009.3.28)

⑥ 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏

腸上皮細胞間リンパ球(iIEL)による小腸絨毛上皮細胞のDNA断片化誘発機構. 日本解剖学会第54回東北・北海道連合支部学術集会、郡山(2008.9.6)

⑦ 尾形雅君, 大田祐太, 松谷隆治, 伊藤恒敏.

iIEL活性化によるマウス小腸絨毛上皮細胞のDNA断片化誘発機構.

第32回日本リンパ学会総会、東京(2008.6.6)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾形 雅君 (OGATA MASAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50311907

(2) 研究分担者

伊藤 恒敏 (ITO TSUNETOSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90004746
松谷 隆治 (MATSUTANI TAKAJI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70372290

(3) 連携研究者

()

研究者番号：