

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：31304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08146

研究課題名(和文)腸上皮細胞間リンパ球(IEL)による自己作用型DNA断片化機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the autocrine DNA fragmentation mechanisms in mouse intestinal intraepithelial lymphocytes

研究代表者

伊藤 恒敏(Itoh, Tsunetoshi)

東北福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号：90004746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 型IELは種々の刺激に迅速に反応する「即時的かつ単発的応答性の防御細胞」で、腸粘膜最前線に位置する「使い捨て型の防御細胞」と推察される。IELの活性化に伴う「上皮細胞でのパーフォリン非依存性のDNA断片化およびその後の迅速なDNA修復現象」はIEL自身においても生じること(自己作用型DNA断片化)が確認され、この現象は結果的に「生体での普遍的な現象」と推察する。さらにIELの活性化後にみられる一過性の下痢(絨毛上皮の剥離)は、粘膜固有層局在マクロファージ由来のTNFによるものと推察され、病原ウイルス等に感染した上皮の排除による生体防御反応へのIELの関連性も示唆された。

研究成果の概要(英文)： -IELs appear to readily and rapidly respond, though at only one time, to various stimulations. They could be recognized as one-shot responders and disposable cells of the defense system present in the front line intestinal epithelium. Activated -IELs not only induced DNA fragmentation in villus epithelial cells (IECs); it induced identical DNA fragmentation in the -IELs themselves (the autocrine DNA fragmentation). The DNA fragmentation as well as the DNA repair thereafter should thus be interpreted in a more generalized phenomenon. The transient diarrhea due to the detachment of IECs induced by activated -IELs was shown to be caused by TNF derived from macrophages located in the lamina propria, suggesting the involvement of the -IELs in the elimination of IECs in a defense system, for example, when IECs are infected with pathogenic viruses.

研究分野：組織学、免疫学

キーワード：マウス 小腸 上皮細胞 -IELs TNF DNA断片化 パーフォリン グランザイム

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管には多くの IEL が存在するが、IEL が果たす腸管局所の生体防御機構に対する機能・役割の詳細については未だに不明な点が多い。小腸上半の十二指腸・空腸では IEL の 70%以上が 型であるので、IEL としてはまず、型 IEL の機能を明らかにしなければならない。しかしながら型 IEL の機能の報告はあるが、型 IEL の報告は少ない。IEL は CD8 陽性で細胞内に顆粒を有し、形態が細胞傷害性 T 細胞と酷似する。顆粒には Granzyme B (GrB) も存在する。申請者らはこの IEL の機能を検索するために生体内実験系において、抗 CD3(T 細胞受容体関連抗原)抗体を投与すると、IEL が活性化し、脱顆粒を起こし、隣接する絨毛上皮細胞 (IEC) の DNA 断片化を誘発することを見出し、その機構を解析してきた。この実験系では、断片化された IEC の DNA が修復されること、さらにこの DNA 断片化が GrB 依存性で、Perforin (Pfn)「非」依存性であることも証明され、貴重な生体内 DNA 断片化であることが確認された。

(2) この一連の現象における抗体刺激後の IEL の活性化とその転帰の検討において、IEL にも IEC と同じ動態で自身の DNA 断片化が誘導され、IEC と同様に断片化 DNA が修復されるということが判明した。IEL 自身が分泌した GrB による自己作用型 DNA 断片化とその修復現象についてはこれまでに報告がない。また IEL の活性化後には IEC 剥離に伴う一過性の下痢が生じる。この現象は病原ウイルス等に感染した IEC の剥離除去(下痢)による生体防御機構への IEL の関連性を示唆するものである。

2. 研究の目的

(1) 申請者らはマウス in vivo 実験系での

抗 CD3 抗体による IEL 刺激後、腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) が誘導する IEC の DNA 断片化機構について解析・報告してきた。活性化 IEL による IEC の DNA 断片化誘導は、GrB によるものだが Pfn 非依存性である他、一旦断片化した DNA が迅速に修復されるなど、既報の DNA 断片化とは大きく異なるが、同時に IEL 自身にも自己作用型 DNA 断片化が Pfn 非依存的に誘導されることが判明した。本課題研究では、抗体刺激後の IEL の活性化機構、GrB による細胞傷害 (DNA 断片化) 機序およびその転帰を調べ、さらに IEL 自身に生じる自己作用型 DNA 断片化現象についてもその機構を解析する。さらには

IEL 活性化に伴う IEC の剥離(下痢)の誘発機序を解析し、IEL の腸管免疫における役割や意義について考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 「抗体刺激後の IEL の活性化とその転帰」の機序の解析。顕微鏡および電顕による組織形態学的解析 (H&E 染色、免疫染色、TUNEL 染色他) を行った。

(2) 「抗体刺激後の IEL の自己作用型 DNA 断片化」の機序を行った。特に IEL と IEC の単離精製および細胞傷害解析および DNA 断片化誘導因子 GrB の IEL 細胞内への取り込み機序の解析を試みた。

(3) 「 IEL 活性化に伴う小腸上皮細胞 (IEC) の剥離(下痢)」の機構解明を行った。IEC 剥離の誘導因子として TNF が考えられたのでその血中動態解析 (ELISA 解析) を行った。また IEL 活性化後に放出される TNF の産生細胞(各種臓器局在マクロファージ)を探索した。

4. 研究成果

(1) 「抗体刺激後の IEL の活性化とそ

の転帰」

このマウス *in vivo* 系でみられる、**型** IEL の活性化に伴う脱顆粒 (GrB 放出) 後に生じる、IEC および IEL 自身の DNA 断片化は、多くの点 (DNA 断片化誘導がきわめて速い(30 分以内)、 Pfn 非依存性 (= 細胞膜の穿孔形成が無い)、 DNA 断片化反応が急速に停止する (1 時間以内に断片化 DNA の修復が開始される)、 迅速な DNA 修復現象 (1 時間後には断片化 DNA は検出されなくなる)、 直接的な細胞死を誘導しない (断片化 DNA は修復される)、 IEL 活性化に伴う T 細胞抗原受容体の不可逆的なインターナリゼーション (= 単発的反応性)、 カスパーゼ 3 (Casp3) の活性化が検出されない) で既報の DNA 断片化機構とは大きく異なることが判明した。さらに、**型** IEL は活性化後に絨毛を離れることなく長期間絨毛内にとどまり続け、最終的に上皮組織内で約 3 日後に死の転帰をたどることが確認され、

型 IEL は種々の刺激に迅速に反応する「即時的かつ単発的反応性の防御細胞」で、最前線に位置する「使い捨て型の防御細胞」であると推察される。

(2) 「抗体刺激後の **型** IEL の自己作用型 DNA 断片化」

型 IEL の活性化に伴い IEC に DNA 断片化が誘導されるが、IEL 自身の DNA も断片化する「自己作用型 DNA 断片化」が確認され、さらには IEC と同様に IEL 自身の断片化 DNA も迅速に修復されることを確認した。IEL 自身から分泌された GrB が Pfn 非存在下で自身の細胞内に取込まれる機構について、各種 (クラスリン依存性、カベオラ依存性、脂質ラフト依存性) エンドサイトーシスの阻害剤を用いた検討を試みたが、IEC と IEL の単離精製後の細胞生存率の低さを十分に改善出来ず、GrB の細胞内移行および細胞傷害についての *in*

vitro 解析は現在も進行中である。しかし、これまでの検証で確認された「IEC でみられる Pfn 非依存性の DNA 断片化およびその修復現象」が IEL においても全く同様のパターンで生じることが確認されたことより、この現象は結果的に「生体での普遍的な現象」であると推察される。

(3) 「**型** IEL 活性化に伴う小腸上皮細胞 (IEC) の剥離 (下痢)」

IEL の活性化に伴い、小腸 IEC (先端側半分) の剥離に伴う一過性の下痢が生じるが、この現象は TNF によるもので (既報)、病原ウイルス等に感染した IEC の排除という面において、興味深い生体防御反応である。ELISA 解析の結果、TNF は正常時の血中では検出されないが、IEL の抗体刺激 1 時間後に一過性に上昇する (Max:200pg/ml) ことが認められ、2 時間後に生じる IEC の剥離現象との関連性が確認された。TNF の産生分泌細胞及びその機構の検証として、TNF の主要な産生細胞としてマクロファージ (M ϕ) が知られていることより、脾臓摘出マウスとクロロロン酸処理 (肝 M ϕ 除去) マウスを用いて脾臓と肝臓に局在する M ϕ の関連性について調べたが、コントロールマウスと同様に IEL 活性化に伴い下痢が生じることが確認され、IEC 剥離を誘発する TNF のソースは脾臓および肝臓ではないことが確認された。腸粘膜における免疫組織学的探索の結果、パイエル板の旁濾胞域と小腸絨毛の粘膜固有層 (先端側に多く検出) に TNF 免疫反応陽性 M ϕ が存在することが確認された。この絨毛で検出される TNF の免疫反応について、IEL 活性化後の時間経過に伴う動態変化を調べた結果、IEL 刺激前および刺激 1 時間後では、TNF の免疫反応はみられるが、2 時間後の絨毛では TNF は検出されなくなることが確認された。これらの結果は血中 TNF 動態と

一致するものであり、IEC の剥離を誘導する TNF のソースは、腸粘膜、しかも IEC 剥離が生じる絨毛先端側の固有層にあることが示唆された。外来抗原の侵襲を受けた絨毛先端部では、IEL の活性に伴い、IFN などのリンホカインのパラクライン放出、もしくは、IEL と M の直接的接触を介した情報伝達によって M が活性化し、放出された TNF によって IEC が剥離するという、非常に局所的な免疫機構の存在が推察される。今後この IEL 活性化の機序、および M 活性化誘導因子を明らかにすることで、IEL の腸管免疫における役割がさらに詳細に解明されるものと考えられる。

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6件)

Yasumoto Y, Miyazaki H, Ogata M, Kagawa Y, Yamamoto Y, Islam A, Yamada T, Katagiri H, Owada Y., Glial Fatty Acid-Binding Protein 7 (FABP7) Regulates Neuronal Leptin Sensitivity in the Hypothalamic Arcuate Nucleus., *Mol Neurobiol.*, 査読有, 2018, DOI: 10.1007/s12035-018-1033-9.

Matsubishi T, Sato T, Kannno S, Suzuki T, Matsuo A, Oba Y, Kikusato M, Ogasawara E, Kudo T, Suzuki K, Shinbo H, Nannto F, Yamaguchi H, Saigusa S, Mukaiyama Y, Watabe A, Kikuchi K, Shima H, Mishima E, Akiyama Y, Suzuki C, Uematsu M, Ogata M, Kumagai N, Toyomizu M, Hozawa A, Mano N, Owada Y, Aiba S, Yanagisawa T, Kure S, Ito S, Nakada K, Hayashi K, Osaka H, Abe T., Mitochondrial acid 5 (MA-5) facilitates ATP synthase oligomerization and cell survival in mitochondria diseases.,

EBioMedicine, 査読有, 20, 27-38, 2017, DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.05.016.

Imai H, Shoji H, Ogata M, Kagawa Y, Owada Y, Miyakawa T, Sakimura K, Terashima T, Katsuyama Y., Dorsal forebrain-specific deficiency of Reelin-Dab1 signal causes behavioral abnormalities related to psychiatric disorders., *Cereb Cortex*, 査読有, 27, 3485-3501, 2017, DOI: 10.1093/cercor/bhv334.

Ogata M, Itoh T., Gamma/delta intraepithelial lymphocytes in the mouse small intestine., *Anat Sci Int.*, 査読有, 91, 301-312, 2016, DOI: 10.1007/s12565-016-0341-2.

Yasumoto Y, Miyazaki H, Koshy L, Kagawa Y, Ebrahimi M, Yamamoto Y, Ogata M, Katsuyama Y, Sadahiro H, Suzuki M, Owada Y., Inhibition of fatty acid synthase decreases expression of stemness markers in glioma stem cells., *Plos One*, 査読有, 11, e0147717, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0147717.

尾形雅君, 香川慶輝, 安本有希, 宮崎啓史, 伊藤恒敏, 大和田祐二, マウス小腸における IEL の活性化および転帰の形態学的解析, *Proceedings Clinical Electron Microscopy*, 査読無, 35, 13-17, 2016

[学会発表](計9件)

尾形雅君, 上条桂樹, 伊藤恒敏, 大和田祐二, 腸上皮細胞間リンパ球の活性化に伴う小腸絨毛上皮細胞の剥離機構、第123回日本解剖学会総会、2018

小林祐太, 尾形雅君, 南都文香, 香川慶

輝、山本由似、宮崎啓史、伊藤将人、香取幸夫、阿部高明、大和田祐二、Ndufs4 欠損マウスにおける顎下腺・副腎の形態異常とステロイド合成障害、第 123 回日本解剖学会総会、2018

山本由似、木田裕之、美津島大、福永浩司、尾形雅君、上条桂樹、大和田祐二、脂肪酸結合蛋白質 FABP3 による介在ニューロンのエピゲノム調節機構、第 123 回日本解剖学会総会、2018

尾形雅君、香川慶輝、安本有希、伊藤恒敏、大和田祐二、腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) の抗体刺激に伴う絨毛上皮細胞の剥離機構、第 122 回 日本解剖学会総会、2017

香川慶輝、Ariful Islam、尾形雅君、大和田祐二、細胞核内 FABP7 は caveolin-1 遺伝子発現をエピジェネティックに制御する、第 122 回 日本解剖学会総会、2017

香川慶輝、Ariful Islam、尾形雅君、大和田祐二、核内 FABP7 はエピジェネティックな caveolin-1 の発現制御に関与する、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016

尾形雅君、香川慶輝、安本有希、伊藤恒敏、大和田祐二、腸上皮間リンパ球 (IEL) における自己作用型 DNA 傷害および DNA 修復、第 62 回 日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会、2016

香川慶輝、Ariful Islam、尾形雅君、大和田祐二、脂肪酸結合蛋白質 FABP7 の細胞核局在の意義-caveolin-1 遺伝子発現制御との関連-、第 62 回 日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会、2016

尾形雅君、マウス小腸における上皮細胞

間リンパ球 (IEL) の活性化および転帰の形態学的解析、

第 67 回 東北臨床超微形態懇話会、2016

〔図書〕(計 1 件)

尾形雅君 他、南光堂、新臓腑病学 (下瀬川徹編) 2017、528 (2-10)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

伊藤 恒敏 (ITO, Tsunetoshi)
東北福祉大学・健康科学部・教授
研究者番号：90004746

(2) 研究分担者

尾形 雅君 (OGATA, Masaki)
東北医科薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：50311907

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()