

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590695

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における腸管上皮細胞間接着蛋白の研究

研究課題名（英文） Tight junction proteins in inflammatory bowel disease

研究代表者

押谷 伸英（OSHITANI NOBUHIDE）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20231235

研究成果の概要：クローン病、潰瘍性大腸炎、対照大腸組織を用いて細胞間接着蛋白の免疫染色法における局在を検討した。細胞間接着蛋白に対する抗 Rab13 抗体、抗 VASP 抗体、抗リン酸化 VASP 抗体、抗 ZO-1 抗体を使用した。対照正常粘膜では ZO-1、VASP、Rab13 はタイトジャンクションに一致して染色されたが、クローン病では ZO-1、VASP、Rab13 ともに細胞質側への変位をみとめ、Rab13、ZO-1 は杯細胞内の粘液も染色された。潰瘍性大腸炎では変位は認められず、対照正常粘膜と同様に染色された。これらにより、クローン病において、細胞間接着蛋白である Rab13、VASP の変位はクローン病の腸管粘膜の透過性亢進に関与し、クローン病の病態に寄与していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

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：①炎症性腸疾患②クローン病③潰瘍性大腸炎④細胞間接着蛋白

1. 研究開始当初の背景

下部消化管には各種外来性抗原物質が常在し、身体にとって有用な微生物や栄養物は腸管内に共存し、あるいは腸管から吸収されるが、有害と判定される微生物や有害な分子は排除される。腸管上皮細胞はこのように外界と接しており、第一線の防御機構として働いている。クローン病において、腸管粘膜の透過性亢進が指摘されており、種々の物質の侵入が容易となることから、種々の免疫反応が起こっていることが想定されている。この透

過性亢進は腸管粘膜における細胞間接着蛋白の異常によって起こる可能性がある。申請者らは、この細胞間接着蛋白である ZO-1 がクローン病の非活動性炎症性粘膜において細胞骨格である F-actin の破綻がみられない段階において、その局在に変移がみられることをすでに報告していた。

2. 研究の目的

細胞間接着蛋白がどのようなメカニズムで細胞質の骨格蛋白系と連携しているのか、

またその発現を規制する因子や局在を保証するメカニズムに関しては不明な点が多い。腸管透過性亢進異常を是正することが将来クローン病の有用な治療法となることが期待される。細胞間接着蛋白がどのような分子を介して細胞膜および細胞質の骨格と相互関係を構築しているのか、またこれら細胞間接着蛋白の局在変移に関与する分子が何であるのかに関して細胞間接着蛋白を腸管から分離抽出し、その性状に関して検討することを目的とした。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントの得られている炎症性腸疾患患者の大腸手術標本と、主に大腸癌患者の手術標本の正常大腸部位をコントロールとして使用した。手術標本はコントロール10例、クローン病(非炎症部)10例、潰瘍性大腸炎(UC)(非炎症部)7例を用いた。periodate-lysine-4% paraformaldehydeにて固定し、OCT compoundにて包埋し凍結した後薄切した凍結切片を作成して、蛍光免疫染色に使用した。細胞間接着蛋白であるRab13、VASPの発現量の比較検討及び、発現局在の変位を抗ヒト抗体を使用した蛍光免疫染色により検討し、ZO-1の局在変異との関連を検討した。TNF- α ・IL-4についても、蛍光免疫染色を行い、炎症性腸疾患における特徴・細胞間接着蛋白との関係を検討した。

4. 研究成果

コントロールにおいてZO-1、VASP、Rab13は腸管上皮の最もApical側に存在した(Figure 1)。

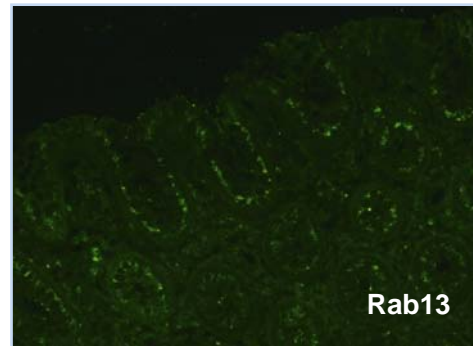
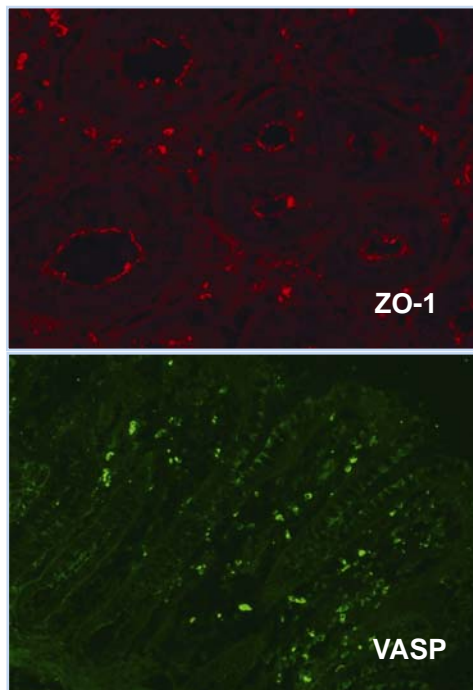


Figure 1 コントロール群

一方、クローン病患者の手術標本の免疫染色では、ZO-1、VASP、Rab13のApical側から細胞質への発現局在の変位をみとめた(Figure 2)。

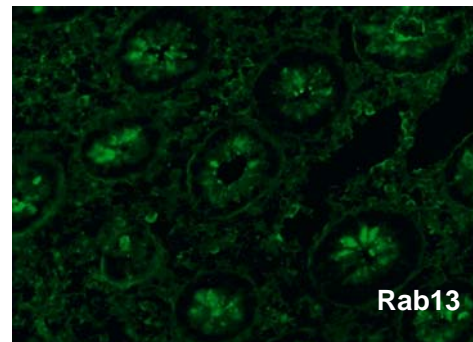
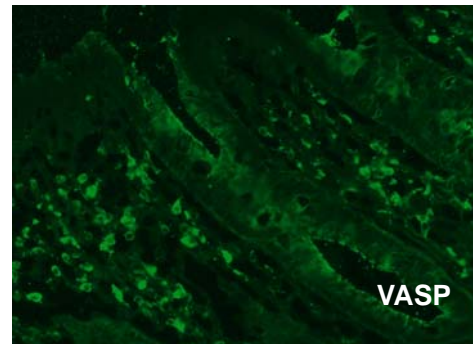
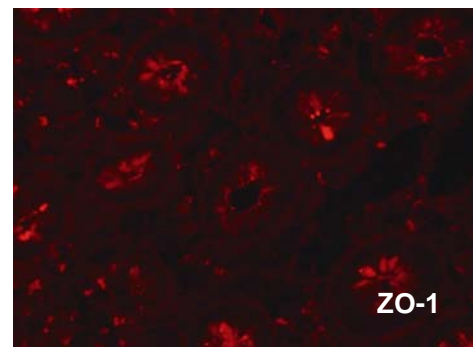


Figure 1 クローン病群の蛍光免疫染色

クローン病におけるVASP・Rab13の発現局在変位は、ZO-1とのMerged imageから、ZO-1の局在変位と同部位であることが確認された。

一方、潰瘍性大腸炎患者の手術標本の蛍光

免疫染色結果から、これらの細胞間接着蛋白は全例コントロールと同様に正常部位に局在していることが明らかとなった。

以上の結果は、コントロール群 10 例、クローン病群 10 例、潰瘍性大腸炎群 7 例の検討結果からの統計学的検討 (chi-square test) においても、優位にクローン病に特徴的な変化であることが確認できた (Table 1, 2)。

Table 1. dislocation of VASP

	dislocation -	dislocation +	total
control	10	0	10
CD	3	7	10
UC	6	1	7
total	19	8	27

P=0.0016

Table 2. dislocation of Rab13

	dislocation -	dislocation +	total
control	10	0	10
CD	3	7	10
UC	7	0	7
total	20	7	27

P=0.0003

サイトカイン発現と細胞間接着蛋白発現に、今回の実験では関連性は見いだせなかった。

今回の我々の検討および VSAP の細胞骨格リモデリングにおける役割から、VSAP の変位が ZO-1 の変位をもたらしていると推測された。更に Rab13 は VASP や ZO-1 および他の細胞間接着蛋白をコントロールするとの報告があり、Rab13 の局在の異常によってもたらされた VASP や ZO-1 の変位がクローン病における腸管上皮の透過性亢進の原因となり、クローン病の病態形成に関与する可能性が示唆された。

本研究により、クローン病の腸粘膜上皮細胞における Rab13、VASP、ZO-1 の発現局在の変位は非炎症部においてなお見られる変化であった。このことは、難渋するようなクローン病の初期病変の診断に寄与する可能性や、透過性亢進が病因の一つと考えられているクローン病にとって、これらの細胞間接着蛋白の修復が新たな治療のアプローチとなる可能性が期待される結果を導くことができた。

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 14 件)

①Hosomi S, Oshitani N, Arakawa T.(計 12) Phenotypical and functional study of ghrelin and its receptor in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 14(9) 1205-1213. 2008, 査読有り

②Hirata N, Oshitani N, Arakawa T.(計 12) Proliferation of immature plasma cells in pouchitis mucosa in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 14(8), 1084-1090. 2008, 査読有り

③Kamata N, Oshitani N, Arakawa T. (計 7) Usefulness of magnetic resonance imaging for detection of asymptomatic osteonecrosis of the femoral head in patients with inflammatory bowel disease on longterm corticosteroid treatment. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 43 (3), 308-313. 2008, 査読有り

④Yukawa T, Oshitani N, Arakawa T.(計 6) Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptor 1 expression in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 161-167, 2007, 査読有り

⑤Noguchi A, Watanabe K, Oshitani N, Arakawa T. (計 8, 7 番目) The production of interferon-r-inducible protein-10 (IP10) by granulocytes and monocytes is associated with ulcerative colitis disease activity. *J Gastroenterol* 42: 947-956, 2007, 査読有り

⑥Okuyama M, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. (計 10, 8 番目) Roles of ZO-1 and epidermal growth factor in esophageal epithelial defense against acid. *Digestion.* 75, 135-141, 2007, 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

①Hosomi S. Phenotypical and functional study of ghrelin and its receptor in the pathogenesis of Crohn's disease. *Digestive Disease Week 2008 AGA.* 2008 年 5 月 25 日, アメリカ サンディエゴ

②Yamagami H. Clinical impact of double balloon endoscopy on the diagnosis of malignant small bowel tumors: A single

center experience. Digestive Disease Week 2008 AGA. 2008年5月25日, アメリカ サンディエゴ

③Watanabe K. The efficacy of infliximab for small bowel lesions of patients with Crohn's disease according to the evaluation by using capsule endoscopy and double balloon enteroscopy. Digestive Disease Week 2008 ASGE. 2008年5月25日, アメリカ サンディエゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押谷 伸英 (OSHITANI NOBUHIDE)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20231235

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし