

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390204

研究課題名（和文）

消化管における T ヘルパー 2 型サイトカインの組織障害作用機転の解明

研究課題名（英文）

T helper 2 type cytokines in the gastrointestinal tissue injury

研究代表者

土肥 多恵子 (DOHI TAEKO)

研究者番号：60250221

研究成果の概要（和文）：IL-13 は上皮細胞傷害をもたらすが、間質細胞の存在は必須ではなく、培養上皮細胞や分離精製した上皮細胞に直接作用を持つことが明らかとなった。また IL-13 によるアポトーシス誘導には IL-4 受容体も必要としなかった。IL-13 は消化管上皮細胞でカスパーゼ 3, カスパーゼ 8, カスパーゼ 9 の活性化を誘導して細胞傷害を誘導し、この経路には TNF- α からのシグナルがクロストークしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：IL-13 induced injury in the gastrointestinal epithelial cells. We proved that this effect did not required the presence of mesenchymal cells nor IL-4 receptor α , but was direct effect of IL-13 on epithelial cells. We found the IL-13 induced apoptosis in the epithelial cells by activating caspases 3, 8, and 9. TNF- α was involved in the IL-13 induced apoptosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 消化器病学

キーワード：IL-13, IL-4, アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

現在知られている IL-4, IL-13 のシグナル伝達受容体は IL-4 receptor (R) α /Common γ chain のヘテロ 2 量体と IL-4Ra /IL-13Ra1 ヘテロ 2 量体の 2 種類であり、前者は血球系の細胞にのみ発現しているが、後者は様々な

組織の間質細胞や上皮細胞に発現しており、IL-4 と IL-13 の共通の受容体として機能している。これらの受容体の下流では STAT6 の活性化が起こることが知られており、IL-4, IL-13 は後者の受容体を介して上皮細胞や間質細胞の機能を調節していると考えられる。

実際、呼吸器疾患では Th2 型免疫応答によるアレルギー反応のエフェクター分子が IL-13 であり、上皮細胞からのムチンの分泌、気道過敏性を引き起こすことが明らかにされている。さらに、第 3 の受容体として、IL-4 とは結合しないが IL-13 と強い親和性を持つ IL-13Ra2 が、膜結合型あるいは分泌型として存在するが、細胞内ドメインは短く、IL-13 を中和するデコイ受容体であると考えられている。

申請者はこれまでに、インターロイキン (IL)-4, IL-13 など、T ヘルパー (Th)2 型と呼ばれるサイトカインが消化管炎症時に過剰に存在すると、特異な病理学的形態を示すことをマウスモデルで明らかにしてきた。第一に、CD4+T 細胞が IL-4, IL-13 を過剰に産生するような状況で誘導したハプテン (TNBS) 大腸炎では、湾曲や枝分かかれ変形した再生クリプトが見られるなどの上皮の萎縮性変化に加え、間質が多い (線維化) ことが特徴であった。これは Th1 型サイトカインである IFN- γ 優位の大腸炎では局所的な全層潰瘍形成が主体であることと対照的であった。第二に、Th2 型 CD4+CD45RBhiT 細胞を T 細胞欠損マウスに移入すると、小腸の絨毛萎縮のために吸収上皮の減少が著しく、強い体重減少が見られた。これに対し Th1 型 T 細胞の移入でみられた胃炎・十二指腸炎・大腸炎は上皮の過形成を伴うものであった (Am. J. Pathol. 2004, 165:1257)。第三の実験として、化学発癌剤アゾキシメタンと TNBS 腸炎を組み合わせた炎症発癌モデルを、Th1 優位マウス、Th2 優位マウスで比較した結果、Th2 優位マウスで腫瘍の発生頻度が高く、更に β カテニンの核移行が見られる等、Th2 優位マウスでは癌がより進展しているという結果を得た。以上の結果から、申請者は IL-4 や IL-13 には免疫応答だけでなく、消化管上皮の細胞回転や組織修復の際の細胞再生の調節機能があるという仮説に至った。

この仮説を証明すべく申請者らが次に行った実験は、IL-4R α 遺伝子欠損 (-/-) マウスを用いた放射線照射後の上皮細胞傷害からの再生の解析である。放射線照射により、小腸局所で IL-13 の産生が高まるが、野生型マウスではこの時期に一過性に IL-13R α 2 の発現がみられ、IL-13 の作用を中和していると推測された。これに対して IL-4R α (-/-) マウスでは、小腸上皮の再生が野生型のマウスに比べて遅れる上、デコイ受容体 IL-13R α 2 の発現が全く見られなかった。しかし、可溶性の IL-13Ra2 を投与し IL-13 を中和することによって正常の再生速度に復した。さらに、in

vitro においても小腸の組織培養液中に IL-13 を加えると、上皮細胞の解離と β カテニンの膜染色性の低下を伴う組織傷害が観察された。全く同様の組織傷害が、IL-4R α (-/-) マウス由来の小腸組織でもみられた。しかし、IL-4 を培養液に添加しても、傷害作用は野生型及び IL-4R (-/-) いずれのマウス由来の組織でも見られなかった。この結果は、IL-4R α の発現なしに IL-13 が組織傷害を起こす、と言う重要な発見をもたらした。この現象は既知の IL-4R α /IL-13R α 1 ヘテロ 2 量体では説明できないため、新たに IL-13 と結合する受容体を想定しなければならない。この新たな受容体は、消化管の粘膜傷害だけでなく喘息やアトピー性皮膚炎等 IL-13 の関わるアレルギー疾患の病態に深く関わっている可能性が強い。そこで、本研究は、IL-13 による組織傷害の作用機構を解明と、傷害をもたらす未知の IL-13 受容体を同定することをめざした。

2. 研究の目的

(1) 消化管傷害作用における IL-13 のターゲット細胞を同定する。特に IL-4R (-/-) マウス由来の上皮細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞それぞれを単離した培養系を作製し、最終的に上皮細胞傷害に至るために間質細胞と IL-13 の相互作用が必要かどうかを明らかにする。
(2) Tag 等でラベルしたリコンビナント IL-13 を作製し、細胞あるいは細胞膜画分蛋白に結合した IL-13 を検出する系を作製する。また固層化した IL-13 を作製する。これらの系を利用し、結合蛋白の解析をおこなった。
(3) IL-13 が上皮細胞に直接傷害作用を持つことが明らかになったので、その機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) IL-13 による組織傷害のターゲット細胞の同定

我々はこれまでに IL-4 受容体遺伝子欠損 (IL-4R (-/-) マウス) の小腸組織が IL-13 に応答して上皮細胞間の結合が破壊され、 β カテニンの膜染色性消失とともに、組織障害を起こすことを示してきた。このアッセイは消化管組織の全体をそのまま用いて行っているため、本計画では IL-13 が直接上皮細胞に作用しているのか、線維芽細胞・筋線維芽細胞が IL-13 に応答することによって上皮細胞の細胞間接着を弱めるようなシグナルが入るのかを、消化管からの細胞分離により判定することとした。まず、IL-4R (-/-) マウス小腸より、EDTA を用いて絨毛・陰窩の形態を保ったまま上皮細胞のみを分離し、これを一次培

養した。IL-13 を培養液中に加えたときの細胞傷害を β カテニンの膜染色性を指標に解析した。また、トランスフォームしたマウス小腸上皮細胞株 (MODE-K) 及び大腸上皮株 (MCE301) で exogenous IL-13 による β カテニン染色性の変化の有無を解析した。

(2) IL-13 結合蛋白の分離・同定の試み
His-Tag をアミノ酸末端に融合したマウス rIL-13 を作製しアフィニティレジンを用いて rIL-13 を精製した。作製した IL-13 固層化レジンに細胞・組織膜画分抽出液を加え、IL-13 結合蛋白を分離する。未知の IL-13 受容体蛋白の供給源として、3Gy 放射線照射後 3 日目の IL-4R^{-/-}マウスの小腸を用いた。分離した IL-13 結合蛋白は、電気泳動の後、質量分析によりその一次構造を同定することとした。

(3) IL-13 誘導組織傷害のエフェクター分子の同定。IL-13 結合蛋白の分離が困難であったため、組織障害のメカニズム解明のための解析を行った。

4. 研究成果

(1) IL-13 による組織傷害のターゲット細胞の同定: 野生型および IL-4R^{-/-}マウス小腸より、EDTA を用いて絨毛・陰窩の形態を保ったまま上皮細胞のみを分離し、これを一次培養して IL-13 を培養液中に加えたときの細胞傷害を、アドヘランス蛋白及びタイトジャンクション蛋白の染色を指標に解析した。その結果、上皮細胞のみの系においても、IL-13 の細胞傷害が認められたが、組織全体に IL-13 を作用させたときに比べその作用はやや弱かった。また、大腸上皮細胞株に IL-13 を作用させると、一次培養組織と同様に β カテニン膜染色性が弱くなった。従って、IL-13 は直接に上皮に作用して細胞傷害をもたらすが、間質細胞の存在による相加作用が示唆された。

(2) IL-13 結合蛋白の分離・同定: これまでに同定されていない IL-13 結合蛋白を、IL-4 受容体非依存性の IL-13 作用である β カテニンの分布異常と上皮間結合の破壊を指標にして、消化管上皮から探索するための蛋白作成を行った。His-Tag を融合したマウス IL-13 cDNA を大腸菌に発現させ、マウス recombinant IL-13-His を作製した。抗 His 抗体固相化ビーズにより IL-13 の固相化を行った。これを用いて細胞・組織膜画分抽出液からの IL-13 結合蛋白のアフィニティ精製を試みた。抗 His モノクローナル抗体をセファロースビーズに結合させ、Histag-IL-13 を混合したのちビーズを洗浄して IL-13 を固層化した。蛋白精製源として 3Gy 放射線照射後 3

日目の IL-4 受容体欠損マウスの小腸を用いた。これまでの結果より、この組織においては IL-13 の分泌と組織傷害が強く、かつ IL-13 と高親和性で結合する IL-13R α 2 の発現はほとんどないことがわかっている。小腸全体から膜画分を抽出した。Histag-IL-13 と膜抽出画分を 4°C で overnight 混合した。洗浄の後、1) 6-His ペプチド、2) 0.1M グリシン + 40mM ジエチルアミン pH2.8 による chemical elution 3) pH11 での chemical elution を行った後、結合ビーズもサンプルバッファーで処理し、電気泳動を行って Cypro Ruby 染色により観察した。その結果、His ポリマーによってビーズから遊離するバンドが検出された。候補分子と考えられるバンドについては直接マスペクトリーを試みたが、同定に至らずサンプル量を増加させる必要があると考えられた。その特異性についても現在さらに膜画分の抽出条件、IL-13His との結合条件を修飾して検討を続けている。

(3) 一方前年度に引き続き IL-13 の傷害作用を組織 primary culture で解析していたところ、既知のサイトカインシグナル経路とクロストークしている可能性を示唆する結果が得られたため、この点の検討も開始した。IL-13 を野生型 BALB/c 小腸に加えると 40 分で β カテニンの局在異常を示した。そこで IL-13 の細胞傷害性シグナル伝達経路について、TNF α 及びその関連の経路と相互作用についてアポトーシスに関連するシグナルを中心に解析した。野生型 BALB/c 小腸組織に IL-13 を加えて培養し、ウエスタンブロッティングによって活性化カスパーゼを時間を追って検出した。その結果、IL-13 添加後 40 分でカスパーゼ 3、カスパーゼ 9 の活性化が見られたが、カスパーゼ 2 に大きな変化はなかった。IL-4 の添加ではサイトカインを加えない対照との違いは見られなかった。カスパーゼ 3 の活性化は IL-13 受容体 α 2-Ig キメラ蛋白によって阻害された。また、TNF- α 中和によっても一部阻害された。以上の結果から IL-13 は IL-4 とは異なる経路でカスパーゼを活性化し、上皮細胞のアポトーシスを誘導することがわかった。その経路には一部 TNF- α との相互作用のあることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Kawamura, YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T, DNA

- hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer *Gastroenterology*, 135:142-151, 2008
2. Dohi T and Kawamura YI, Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1780:467-471, 2008
 3. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura Y. I., Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T. Dose-dependent, differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J. Immunol* 79:7478-7487, 2007
 4. Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, Burkly LC. TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology* 136:912-923, 2009.
- [学会発表] (計 13 件)
1. 土肥多恵子: 消化管炎症における免疫応答と組織修復, 神戸免疫アレルギー談話会, 神戸, 2007年6月14日
 2. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Kawamura YJ, Konishi F, Takeshita E, Miyake O, Saito Y, Kannagi R, T Dohi: Silencing of Sda carbohydrate-synthase gene by aberrant methylation in gastrointestinal cancer and ulcerative colitis, 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, 2007, July 10
 3. 土肥多恵子: IL-13作用の調節による消化管上皮細胞の再生促進, 第49回日本消化器病学会大会(JDDW), 神戸, 2007年10月19日
 4. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T: Fractalkine Regulates TNF- α secretion by macrophages with induction of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and its ligand, Digestive Disease Week 2007, Washington D.C., 2007 May 23
 5. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Saito Y, Kawamura YJ, Fumio, Konishi, Dohi T: Aberrant responses of human colonic macrophage-type cells to lipopolysaccharide in ulcerative colitis: upregulated expression of MD-2 and production of inflammatory cytokines, Digestive Disease Week 2007, Washington D.C., 2007 May 22
 6. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Interleukin-13 disrupts the cell-cell adhesion of intestinal epithelial cells, 第37回日本免疫学会, 東京, 2007年11月21日
 7. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. Interleukin-13 Induces Tissue Damage with Relocation of β -Catenin and Modification of Cell-Cell Adhesion in the Epithelial Cells. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 20th, 2008
 8. Dohi T, Borodovsky A, Kawashima R, Wu P, Kawamura YI, Burkly LC. Tweak/Fn14 Pathway: Role in the Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 18th, 2008
 9. V Phongsisay, Y I. Kawamura, R Kawashima, and T Dohi : Comprehensive analysis of lectin-binding in the colitis and colitis-associated tumors in mice. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月28日
 10. Kawashima R, Kawamura YI. Toyama-Sorimachi N, Dohi T. IL-13 disrupts tight junction in the intestinal epithelial cells by modulating expression of ZO-1, occludin and claudin-2. 第38回日本免疫学会学術集会、京都、2008年12月2日
 11. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Kawamura YJ, Konishi F, Saito Y, Kannagi R, Imai K, Dohi T. Inflammation-associated transcriptional silencing of Sda carbohydrate-synthase gene by DNA hypermethylation in ulcerative colitis. Biochemistry and Molecular Biology (BMB) 2008, 神戸、2008年12月11日
 12. Dohi T, Kawashima R, Burkly LC. Role of TWEAK (TNF- α -Like Weak Inducer of Apoptosis) in Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Selected as Poster of distinction, Digestive Disease Week 2009, Chicago, May 31, 2009
 13. Dohi T, Kawashima R, Wu P, Burkly LC. TWEAK/Fn14 Pathway Promotes Epithelial Cell Apoptosis after g-irradiation. International Conference of

Mucosal Immunity 2009, Boston, July 6,
2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

土肥多恵子 (DOHI TAEKO)

独立行政法人国立国際医療研究センター・部
長

研究者番号 : 60250221

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

出原 賢治 (IZUHARA KENJI)

佐賀大学・医学部

研究者番号 : 00270463

西河 淳 (ATSUSHI NISHIKAWA)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・
教授

研究者番号 : 30218127

河村 由紀 (KAWAMURA YUKI)

独立行政法人国立国際医療研究センター

研究者番号 : 10392391