

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2009
 課題番号： 19590201
 研究課題名 (和文) 免疫関連因子 PKR が小腸上皮細胞の発生・分化・アポトーシスに果たす役割の解析
 研究課題名 (英文) The expression and function of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) in rat intestinal epithelial cells
 研究代表者
 土肥 良秋 (DOI YOSHIAKI)
 産業医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 30258602

研究成果の概要 (和文)：二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (PKR) は抗ウイルス作用、細胞増殖、細胞分化及びアポトーシスの誘導等、極めて多彩な機能を持つ。今回、様々な病原体に対する防御機能を持つラット小腸上皮細胞 (IECs) において、PKR の発現や機能を解析したところ、PKR がラット IECs で発現し、細胞の分化・成長とアポトーシスに関与していることが明らかとなった。また、副腎皮質ホルモンにより IECs における PKR の発現が抑制されたことから、PKR が同細胞の免疫応答に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Intestinal epithelial cells (IECs) are exposed to microbial and viral products, and serve as essential barriers to them. Since double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is involved in cellular antiviral response, cell differentiation and apoptosis, we tried to investigate the expression and roles of PKR in rat IECs. In this study, we showed that the expression of PKR in IECs of adult rats. We also demonstrated that PKR was expressed in cultured rat IECs. The level of PKR protein expression and the activity of alkaline phosphatase (ALP) increased in the cultured IECs in a time-dependent manner. Treatment with PKR inhibitor decreased ALP activity in the IECs. The addition of synthetic double-stranded RNA induced apoptosis in a dose-dependent manner in these cells. Treatment with hydrocortisone also provoked suppression of PKR expression in such cells. Thus, we concluded that PKR is expressed in IECs as potent barriers to antigens and is a possible modulator of the differentiation and apoptosis in rat IECs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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： 細胞分化・小腸上皮細胞・アポトーシス・二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (PKR) ・ハイドロコルチゾン・STAT-1

1. 研究開始当初の背景

(1) Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) はウイルス感染やインターフェロン等に応答する蛋白であり、細胞の防御機構やアポトーシスに関与する酵素である。PKR は自己リン酸化により活性化し、自身が持つキナーゼ活性により下流転写調節因子 eIF-2 α 等をリン酸化し、シグナルを伝達する。我々は天然毒素オカダ酸を培養細胞へ加えると PKR 経路が活性化し、アポトーシスが誘導されることを発見した (Morimoto et al, J Biochem, 2004)。また、変異 PKR 遺伝子を導入した骨芽細胞株を作成したところ、この細胞ではオカダ酸による I κ B リン酸化を介した炎症関連転写因子 NF- κ B の活性化機序に変化が生じていた (Morimoto et al, Mol Cell Biochem, 2005)。こうした結果は PKR と、そのリン酸化を介した活性化が様々な部位におけるアポトーシスや炎症の誘発過程において非常に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

(2) さらに我々は PKR 変異骨芽細胞や PKR 阻害軟骨芽細胞が STAT1 蛋白を強く発現し、それらの細胞が有する骨・軟骨形成能が低下することを明らかとした (Yoshida et al, Exp Cell Res, 2005)。これらの結果より PKR は炎症やアポトーシス誘導における役割以外に、骨や軟骨の細胞分化・組織形成過程においても重要な働きをなすことが示された。

(3) 小腸上皮は細胞の分化からアポトーシスまでに至る各表現型が同時に観察されるため、初期発生のみならず、成体における幹細胞の分化等を研究するのに適した組織であるが、消化器系上皮における PKR 研究はウイルス感染や免疫応答に関する研究を除き、

ほとんど行われていない。さらに、発生的見地から PKR の発現様式を検索した研究もほとんど見当たらない。また、腸管上皮は微生物が腸管内に進入してきた場合、感染症の危険に曝される最前線となるため、機械的な防御機構に加え、サイトカインをはじめとする種々の免疫関連因子による緻密な防御機構が構築されている。したがって、免疫関連分子でもある PKR が小腸の防御機構に関与する可能性は高いと考えられるが、小腸の免疫機能と PKR の関連性を題材とした研究も皆無である。

以上(1)~(3)を背景として、我々は PKR が小腸上皮細胞の発生・分化過程やアポトーシス誘導及び生体防御機構に果たす役割を発生的、形態学的、分子生物学的に多方面より解明することを目的とし、今回の研究を立案した。

2. 研究の目的

細胞レベルでの生体防御機構の一つの因子として、二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (double-stranded RNA-dependent protein kinase; PKR) がある。PKR は interferon (IFN) による抗ウイルス作用への関与に加えて、細胞増殖、細胞分化及びアポトーシスの誘導等、極めて多彩な機能を併せ持ち、その発現及び調節に種々の因子が関与することが解明されつつある。一方、小腸上皮細胞 (IECs) はウイルスなどの様々な病原体や抗原に常に曝されており、それらに対する重要なバリア機能を果しているが、PKR の発現やその調節機構等については全く報告がない。そこで申請者らは IECs における PKR の発現と局在、さらには細胞増殖・分化およびアポトーシスへの関与等の機能面に

ついて *in vivo* 及び *in vitro* の実験系で解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*: 8 週齢の Brown Norway rat より採取した空腸を材料とし、①抗 PKR 抗体と抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織化学を行った。②抗 PKR 抗体を用いたウエスタンブロット解析と RT-PCR により PKR のタンパクおよび mRNA の検出を行った。

(2) *in vitro*: 培養 IEC6 細胞 (ラット小腸上皮細胞株) から経時的に採取したサンプルに対して、①抗 PKR 抗体を用いた免疫細胞化学とウエスタンブロット解析を行った。また、細胞分化の指標となる alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定した。②PKR 阻害薬 (2-aminopurine もしくは PKR-inhibitor) を添加して ALP 活性を比較した。③IECs の細胞分化に影響を与えることが知られている ハイドロコルチゾンが PKR 発現に影響を与えるか否かを検討した。④IFN 応答における PKR の関連因子の一つである STAT-1 についてウエスタンブロット解析を行った。⑤PKR を介したアポトーシスが誘導されることを確認するために合成 2 本鎖 RNA (poly [I:C]) を添加し、生存細胞数の割合を WST-1 アッセイで測定した。

4. 研究成果

(1) *in vivo*: 空腸において、①PKR 免疫陽性反応は絨毛部の吸収上皮細胞の細胞質内に、PCNA 免疫陽性反応は陰窩部の上皮細胞にそれぞれ限局して認められた。②ウエスタンブロット解析および PCR 産物の DNA 泳動の結果、PKR と考えられるバンドがそれぞれ検出された。

これらの研究成果により、*in vivo* において、空腸絨毛部の吸収上皮細胞に PKR の強い

発現を認めたが、PCNA 陽性で増殖能を有する陰窩部の上皮細胞には PKR の発現は認められなかったことから、PKR は増殖能の亢進していない細胞に発現することが示された。

(2) *in vitro*: IEC6 細胞において、①PKR 免疫陽性反応は細胞質内に認められ、PKR のタンパク発現と ALP 活性は共に経時的に増加した。②PKR 阻害剤添加によって濃度依存性に ALP 活性の減少が認められた。③ハイドロコルチゾン添加によって PKR 発現と ALP 活性は共に抑制された。④ハイドロコルチゾン添加による PKR 発現並びに ALP 活性の抑制と STAT-1 発現との相関が認められた。⑤poly [I:C] 添加によって濃度依存性にアポトーシスが誘導された。

これらの研究成果より、*in vitro* において、PKR の発現と ALP 活性が正の相関を示したことから、PKR は細胞の分化や成長に影響を与えていることが推察された。また、poly [I:C] によりアポトーシスが誘導され、PKR が機能的に発現していることが確認された。さらに、ハイドロコルチゾンによる PKR 抑制機序において、STAT-1 が PKR の発現調節因子として働いている可能性が示された。

今回の研究において、PKR は IECs において機能的な発現を示すことが確認されたが、特にストレス応答に関わり、免疫抑制剤でもあるハイドロコルチゾンが小腸上皮細胞における PKR の発現を抑制することを世界に先駆けて報告できた (Sato et al, J Cell Biochem, 2010) ことが本研究における最大の成果と考える。今後は、この PKR 抑制機序において STAT-1 がどのような調節を行っているかに関してより詳細な解析を展開したい。

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 8 件)

- ① Sato, N.、Morimoto, H.、Baba, R.、Nakamata, J.、Doi, Y.、Yamaguchi, K.、Functional expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase in rat intestinal epithelial cells、J. Cell. Biochem.、Vol.110、査読有、2010、pp.104-111
- ② Kudo, H.、Doi, Y.、Fujimoto, S.、Expressions of the multidrug resistance-related proteins in the rat olfactory epithelium: A possible role in the phase III xenobiotic metabolizing function、Neurosci. Lett.、査読有、Vol. 468、No.2、2010、pp.98-101
- ③ Kudo, H.、Doi, Y.、Ueda, H.、Kaeriyama, M.、Molecular characterization and histochemical demonstration of salmon olfactory marker protein in the olfactory epithelium of lacustrine sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*)、Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.、査読有、Vol. 154、No.1、2009、142-150
- ④ Fujimura, T.、Suzuki, H.、Udaka, T.、Shiomori, T.、Mori, T.、Inaba, T.、Hiraki, N.、Kayashima, K.、Doi, Y.、Immunoreactivities for glutathione S-transferases and glutathione peroxidase in the lateral wall of pigmented and albino guinea pig cochlea、Med. Mol. Morphol.、査読有、Vol. 41、No.3、2008、pp. 139-144

- ⑤ Shiraishi, M.、Doi, Y.、Kayashima, K.、Fujimoto, S.、Antioxidant enzyme immunoreactivity in rat von Ebner gland after nickel treatment、Med. Mol. Morphol.、査読有、Vol.41、No.1、2008、pp. 44-52
- ⑥ 馬場良子、佐藤永洋、土肥良秋、藤田 守、乳飲期回腸吸収上皮におけるエンドサイトーシスの膜系と細胞骨格の関連、医学生物学電子顕微鏡技術学会誌、査読無、Vol. 22、No.2、2008、p. 62
- ⑦ Morimoto, H.、Ozaki, A.、Okamura, H.、Yoshida, K.、Amorim, B.R.、Tanaka, H.、Kitamura, S.、Haneji, T.、Differential expression of protein phosphatase type 1 isotypes and nucleolin during cell cycle arrest、Cell Biolchem. Funct.、査読有、Vol. 25、No.4、2007、pp. 369-375
- ⑧ 土肥良秋、怒ると怖い血管内皮細胞、ミクロスコピア、査読無、Vol. 24、No.2、2007、pp. 98-104

[学会発表] (計 9 件)

- ① 馬場 良子 他、新生仔ラット回腸吸収上皮細胞におけるエンドゾームの局在、第 115 回日本解剖学会、2010 年 3 月 28 日、盛岡
- ② 佐藤 永洋 他、小腸上皮における PKR の発現と機能、第 115 回日本解剖学会、2010 年 3 月 28 日、盛岡
- ③ 森本 景之 他、蛍光を用いたタンパク質相互作用と翻訳後修飾の解析、第 41 回日本臨床分子形態学会、2009 年 9 月 4 日、神戸
- ④ 馬場 良子 他、新生児 (仔) 回腸吸収上皮細胞のエンドサイトーシスに関する膜系の発達、第 41 回日本臨床分子形態学会、2009 年 9 月 4 日、神戸

- ⑤ 森本 景之 他、蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤によるアポトーシス誘導における蛋白質相互作用、第 18 回日本アポトーシス研究会、2009 年 8 月 2 日、長崎
- ⑥ 森本 景之 他、タンパク質相互作用の細胞内可視化法を用いた PKR と基質タンパク質の解析、第 65 回日本顕微鏡学会、2009 年 5 月 29 日、仙台
- ⑦ 馬場 良子 他、胃粘膜における二本鎖 RNA 依存プロテインキナーゼ (PKR) の局在、第 114 回 日本解剖学会、2009 年 3 月 29 日、岡山
- ⑧ 馬場 良子 他、胎盤栄養から母乳栄養への移行期における小腸吸収上皮細胞の形態と機能の変化、第 40 回 日本臨床分子形態学会、2008 年 10 月 3 日、福岡
- ⑨ 佐藤永洋 他、ラット小上皮における PKR の局在と経時的变化、第 39 回日本臨床分子形態学会、2007 年 9 月 28 日、甲府

[図書] (計 1 件)

- ① 土肥良秋、他、ヌーヴェルヒロカワ、第 7 章内分泌系、pp. 207-229、第 11 章感覚器系、pp. 333-363、ビジュアル解剖生理学、2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土肥 良秋 (DOI YOSHIAKI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号： 30258602

(2) 研究分担者

森本 景之 (MORIMOTO HIROYUKI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 30335806