

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20590733

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患における小胞体分子シャペロン異常の解析

研究課題名(英文) Analysis of the ER molecular chaperone in inflammatory bowel disease.

研究代表者

伊藤 貴博 (ITO TAKAHIRO)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30396361

研究成果の概要(和文)：

単離小腸陰窩 1 個から分泌されるパネート細胞 α -defensin である HD5 および HD6 の定量に世界で初めて成功した。クローン病では HD5 の発現が低下していた。正常のパネート細胞では Protein disulfide isomerase (PDI) という分子を細胞質内に発現しており、これは defensin の構造を保つために必要な分子である可能性を示した。パネート細胞分泌物は T84 細胞から IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-13, RANTES, TGF- β 1 といったサイトカイン, ケモカインを分泌させた。パネート細胞は自然免疫のみならず獲得免疫にも間接的に関わっている可能性があり、パネート細胞の機能低下が特にクローン病の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The amount of HD5 and HD6 secreted from a single small bowel crypt was estimated. In Crohn's disease patients, the ileal expression of HD5 mRNA was significantly reduced compared with controls. Protein disulfide isomerase (PDI) was expressed in Paneth cells. This study suggested that it was important for disulfide bond formation of defensin. The Paneth cell secretions induced IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-13, RANTES and TGF- β 1 from T84 cells. Human Paneth cells contribute to innate as well as adaptive immunity by defensin-dependent and -independent processes, which appear to be mediated by induction of pro-inflammatory cytokines. A deficiency of the α -defensins derived from Paneth cells is considered to be associated with various gut diseases, including Crohn's disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：免疫学，感染症，蛋白質，ストレス

1. 研究開始当初の背景

クローン病と潰瘍性大腸炎は炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, 以下 IBD) と総称され、若年者から発症し再燃を繰り返す難治性の経過をとる。近年その患者数は確実に増加しているが、その病因は未だ明らかではない。近年、クローン病の病態に細菌の関与が再度見直され、腸内細菌と腸上皮細胞との相互作用が重要視されてきている。パネート細胞は、小腸上皮細胞群のなかで唯一内因性抗菌ペプチドである α -defensin を有しており、マウスの小腸パネート細胞について、我々は California 大学 Irvine 校との共同研究で、 α -defensin が腸管の感染に対して自然免疫による強力な防御機構を形成していることを証明してきた (Ayabe, Nat Immunol, 2000, Tanabe, Infect Immun, 2005)。

Defensin の構造の大きな特徴は分子内に 3 つのジスルフィド結合が存在することである。その意義について、Maemoto らはマウスの小腸パネート細胞 α -defensin である Cryptdin-4 のジスルフィド結合が Cryptdin の活性化酵素である MMP-7 の酵素分解から保護していること、逆に正しくジスルフィド結合がされていない場合には、蛋白分解酵素によってペプチドが崩壊し、活性が消失することを明らかにした (Maemoto, J Biol Chem, 2004)。このことは、蛋白分解酵素による defensin の構造破壊が起きた原因として、ジスルフィド結合のフォールディング異常が存在する可能性を示している。一方、アルツハイマーなどの神経疾患の病因に関しては、既にフォールディング異常が指摘され、小胞体内分子シャペロンであるストレス蛋白がフォールディングに大きく関与しているとの報告が注目されている。

そこで我々はクローン病の病態においても小胞体での分子シャペロンを介したフォールディングの異常が、その病態に関与している可能が極めて高いと考えた。すなわち、クローン病などの慢性炎症状態ではストレスや NO が関与して、小胞体内での様々な分子シャペロンの働きの異常により、ジスルフィド結合をはじめとする蛋白のアンフォールディング、あるいは正しくフォールディングされなかった蛋白の除去の異常がおり、それが病態形成に密接に関与しているものと推察した。我々はこれまでに、ヒト消化管粘膜上皮細胞の *ex vivo* での役割を解析するアッセイ系を独自に確立し、 α -defensin をはじめとする内因性抗菌ペプチドの活性解析を行ってきた。その成果から、ヒトの小腸パネート細胞もマウスと同様に粘膜感染防御に貢献していること、クローンでは α -defensin の殺微生物作用が減弱しているこ

とを明らかにした (前本, 北海道医学雑誌, 2004)。

2. 研究の目的

本研究では、腸管上皮における蛋白のフォールディング機構を検討することで、疾患との関連を明らかにすることを目的とする。具体的には、ヒト IBD 切除腸管から単離した腸管上皮を利用して、(1)ジスルフィド結合に関わる protein disulfide isomerase (PDI) および Glutathione の局在および機能の検討、(2)小胞体ストレス関知機構である PKP-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), IRE1, activating transcription factor 6 (ATF6) の発現や活性化機構を検討し、最終的には defensin の構造への関与を明らかにすることで、クローン病が一種の分子シャペロン異常であることを証明し、本疾患の新たな分子標的治療としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) recombinant ペプチドの合成

正常ではヒト消化管上皮の抗菌ペプチドは小腸パネート細胞にのみ発現し HD5 と HD6 が知られている。HD5 とその前駆体である proHD5, および HD6 の recombinant ペプチドを発現する系を既に持ち、精製された peptide を得る。さらにこれら recombinant HD5 および HD6 を兔に免疫して得られた抗血清から抗 HD5 および抗 HD6 polyclonal 抗体を作成し、以下の研究に使用する。

ヒト β -defensin の hBD1 および hBD2 は腸管上皮に恒常的あるいは反応性に発現する。本研究において、これらの hBD1 と hBD2 の recombinant ペプチドを発現させ以下の研究に用いる。hBD1 および hBD2 の抗体は購入して以下の研究に用いる。

(2) ヒト正常対照および IBD 患者の小腸・大腸上皮細胞におけるペプチドの抽出および folding の確認方法の確立

インフォームド・コンセントの元に得た腸管切除手術材料および内視鏡的腸管生検材料から、EDTA 法により腸管粘膜の陰窩および絨毛を単離する。単離上皮細胞からペプチドを酸抽出し、RP-HPLC にて分離精製し、MALDI-TOF 質量分析装置にて defensin を同定する。また、2次元電気泳動にて展開し、既報に準じて free sulfhydryl 基を同定する。すなわち抽出したペプチドを Iodoacetamide free のシステイン基へ付加し、DTT にて還元する。その後 fluorescent にラベルされた

monobromobimane と混和して、結合していたシステイン基を標識した後に 2 次元電気泳動にて分離し、UV light にて fluorescent spot を確認する。

(3)ジスフィルド結合関連シャペロン分子である PDI の機能解析

一般的にシステイン結合は小胞体内にある PDI-gultathione-NADPH での反応でコントロールされている。Real-time PCR にて PDI の mRNA を、Western blotting にて蛋白発現を確認し、正常と IBD の差異を解析する。また、正常対照および IBD 患者粘膜上皮細胞から超遠心で microsome を得て PDI を抽出する。PDI の redox 状態は、free のシステイン基を 4-acetamido-4'-meleimidylstilbene 2,2'-disulphonic acid でラベルして SDS-PAGE で確認する。また、抽出 PDI を、あらかじめ還元した recombinant HD5, HD6, hBD1, hBD2 と混和し、そのシステイン結合性について質量分析および Western blotting にて確認し、PDI 活性を評価する。

4. 研究成果

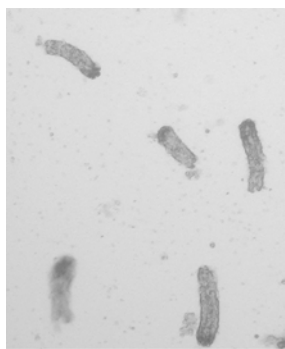
(1) recombinant ペプチドの合成

HD5 とその前駆体である proHD5, および HD6 の recombinant ペプチドを大腸菌発現系を用いて得た。さらにこれら recombinant HD5 および HD6 をウサギに免疫して得られた抗血清から、抗 HD5 および抗 HD6 polyclonal 抗体を作成しヒト小腸粘膜標本でパネート細胞の顆粒に特異的に発現することを確認した。

(2)ヒト正常対照および IBD 患者の小腸・大腸上皮細胞におけるペプチドの抽出および folding の確認方法の確立

インフォームド・コンセントの元に得た腸管切除手術材料から、EDTA 法により腸管粘膜の陰窩および絨毛を単離した。単離小腸陰窩が多く含まれている分画を回収し(図 1)、後の研究に使用した。

(図 1)



小腸陰窩に富む分画を *Salmonella typhimurium* に 30 分間暴露しその上清を回収しペプチドを酸抽出した。RP-HPLC にて分離精製し、MALDI-TOF 質量分析装置にて defensin を同定した。蛋白抽出物を 2 次元電気泳動にて展開する系を確立し、そのスポットを切り出しゲルのトリプシン消化後にペプチドマスフィンガープリンティングによる蛋白の同定に成功した。Folding の確認方法の確立については成功しなかったが、免疫ブロット法により健常人パネート細胞分泌物に含まれる HD5 および HD6 の定量に世界で初めて成功した。すなわち、HD5 量は 1 個の小腸陰窩あたり分泌物中に平均 1.25ng 含まれており HD6 量は 1 個の小腸陰窩あたり平均 0.06ng 含まれていた。

(3)ジスフィルド結合関連シャペロン分子である PDI の機能解析

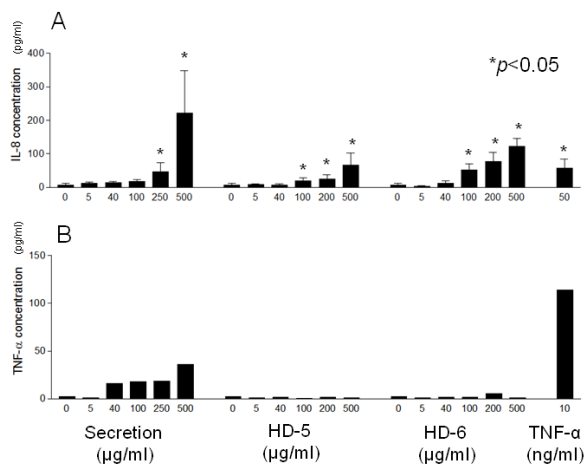
PDI の小腸粘膜での発現を免疫染色にて検討し、健常者のパネート細胞に強発現することを確認した。HD5 抗体との二重染色では、HD5 は顆粒内に、PDI は細胞質内に局在していた。PDI の活性を評価するために、還元型 HD5 ペプチドを酸化型および還元型 glutathion と PDI の存在下で反応させた。ジスルフィド結合が再構成されることを HPLC および MALDI-TOF MS にて確認した。したがって、PDI がパネート細胞内で defensin 蛋白のフォールディングに機能している可能性を示した。IBD 患者の検討はできなかったため、今後健常者と IBD 患者の差異について明らかにしてゆく。

健常者とクローン病患者の小腸切除手術材料から上記と同様の方法で得たピュアな単離小腸陰窩における HD5 の mRNA 発現を Real-time PCR で解析したところ、クローン病患者で HD5 の発現が低下していた。実際クローン病患者においてペプチドレベルで HD5 の分泌量が低下しているかどうかは今回検討できず今後明らかにしてゆきたい。

次に健常人のパネート細胞分泌物や recombinant HD5, HD6 でヒト大腸癌細胞株 (T84 細胞) を刺激しその培養上清中の IL-8 および TNF- α 濃度を ELISA 法で測定した。分泌物, HD5, HD6 とともに T84 細胞を刺激し、好中球などを遊走させる IL-8 を分泌させた。また、分泌物は T84 細胞からの TNF- α 分泌を誘導したが HD5, HD6 にその作用はなかった(図 2)。

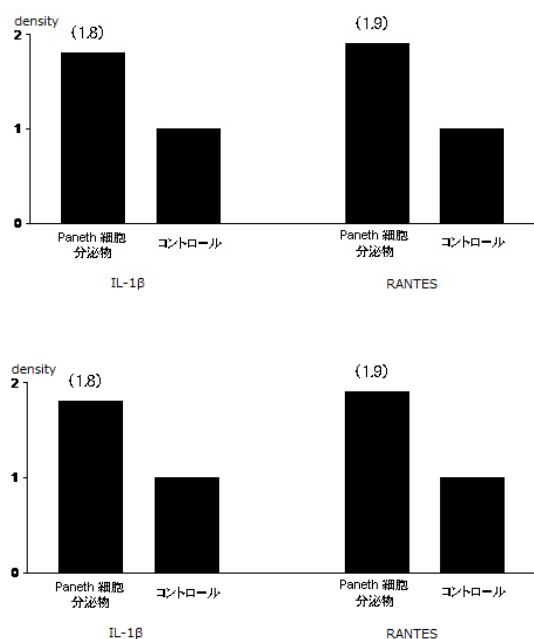
さらに健常人のパネート細胞分泌物で T84 細胞を刺激しその培養上清を 40 種類の既知の炎症関連蛋白を検出する inflammation antibody array で解析したところ、IL-8, TNF- α

(図 2)



以外に IL-1 β , IL-13, regulated upon activation normal T expressed and secreted(RANTES), TGF- β 1 といったサイトカイン・ケモカインを分泌させることを発見し(図 3), パネート細胞が自然免疫としての働きのみならず他の腸管上皮細胞にはたらき間接的に獲得免疫に関与していることを示唆する研究結果となった. クローン病患者におけるこうしたパネート細胞分泌物による作用の検討はできなかったが, クローン病において HD5 を含めた抗菌ペプチドの分泌低下によって間接的に他の上皮細胞からのサイトカイン・ケモカインの産生が変化することにより病態に少なからず関与している可能性が示唆された.

(図 3)



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 9 件)

- ① 伊藤貴博ら, 『Crohn病小腸病変に対する診断と治療の進歩』 1.Crohn病小腸病変の診断と経過 1) 小腸X線検査の有用性と位置づけ, 胃と腸, 査読無, 2010;45: 1586-1594
- ② 上野伸展, 伊藤貴博ら, 麦芽乳酸菌(L.brevis SBC8803)死菌の腸管組織に対する生理活性の解明, 消化器と免疫, 査読無, 2010;46 巻: 164-167
- ③ 野村好紀, 伊藤貴博ら, 潰瘍性大腸炎の重症度分類とその臨床的意義, 消化器の臨床, 査読無, 2010;13:73-77
- ④ Inaba Y, Ashida T, Ito T, Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Watari J, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y. Expression of the antimicrobial peptide alpha-defensin/cryptdins in intestinal crypts decreases at the initial phase of intestinal inflammation in a model of inflammatory bowel disease, IL-10-deficient mice. Inflamm Bowel Dis. 査読有, 2010;16:1488-1495
- ⑤ Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Ito T, Watari J, Kono T, Fujiya M, Ashida T, Ayabe T, Kohgo Y. Precursor processing of human defensin-5 is essential to the multiple functions in vitro and in vivo. J Innate Immun. 査読有, 2009;2:66-76.
- ⑥ 伊藤貴博, ヒトPaneth細胞分泌物による炎症反応の制御, 消化器と免疫, 査読無, 2009;45 巻:34-38
- ⑦ 伊藤貴博ら, 潰瘍性大腸炎の初期病変直腸病変の口側進展, 胃と腸, 査読無, 2009;44 巻: 1541-1548
- ⑧ 田邊裕貴, 伊藤貴博ら, 抗菌ペプチドによる消化管バリア療法の可能性は?, 分子消化器病, 査読無, 2009;6 巻:133-139
- ⑨ Tanabe H, Sato T, Watari J, Maemoto A, Fujiya M, Kono T, Ashida T, Ayabe T, Kohgo Y. Functional role of metaplastic paneth cell defensins in Helicobacter pylori-infected stomach. Helicobacter. 査読有, 2008;13:370-379.

〔学会発表〕（計2件）

- ① 伊藤貴博, 潰瘍性大腸炎術後pouchitisの現状と発症の予測に関する検討, JDDW2010(2010年)
- ② 伊藤貴博, ヒトPaneth細胞分泌物による炎症反応の制御, 第45回日本消化器免疫学会総会(2008年)

〔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

伊藤 貴博 (ITO TAKAHIRO)
旭川医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：30396361

(2)研究分担者(平成20年度)

田邊 裕貴 (TANABE HIROKI)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：50396363

(3)連携研究者

なし