

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590955

研究課題名(和文) 消化管上皮のDNA傷害におけるTWEAKの意義解明

研究課題名(英文) TWEAK is involved in DNA damage in intestinal epithelial cells

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・研究所 肝炎・免疫研究センター 消化器疾患研究部・部長

研究者番号：60250221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：TWEAKはTNF superfamily分子の一つで、TWEAKの受容体として同定されたのがFn14である。DNA傷害は抗癌剤や放射線治療様々な状況で起こりうるが、これによる消化管粘膜傷害は、治療の副作用として治療限界を規定する重要なものである。本研究ではTWEAKを介する経路が抗癌剤や放射線治療の際のDNA傷害メカニズムの重要な因子であることを見いだした。特に、Tumor necrosis factor- α による細胞死シグナルを増幅・増強する作用を見いだした。これらの結果から、TWEAK/Fn14シグナル経路の阻害によって、消化管粘膜傷害の予防が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a member of TNF superfamily (TNFSF). Its receptor FGF-inducible molecule-14 (Fn14) has been identified. DNA damage is induced by gamma-irradiation and anti-cancer drugs. Gastrointestinal mucosal damage is one of the most significant side-effects of these treatments, which limits the dose of treatment. In this study, we found that TWEAK/Fn14 pathway is significantly involved in the DNA damage of intestinal mucosa that induced by gamma-irradiation and some type of anti-cancer drugs. Particularly, TWEAK enhances death signal mediated by Tumor necrosis factor (TNF)- α . results suggest the possible application of TWEAK inhibitors to prevent mucosal damage in cancer therapy.

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：消化管上皮細胞 TWEAK Fn14 DNA傷害 炎症

1. 研究開始当初の背景

TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)はTNF superfamily (TNFSF)分子の一つでマクロファージや T 細胞から産生される。TWEAKの細胞外ドメインは分解を受けて可溶性のサイトカインとしても作用する。TWEAKの受容体として同定されたのが FGF-inducible molecule-14 (Fn14)である。Fn14は上皮細胞、間質細胞、内皮細胞にその発現が認められるが、リンパ球には発現していないのが特徴である。

TWEAK/Fn14は、細胞死、炎症、細胞増殖、血管新生など、細胞によって様々なシグナルを伝えるため、生物にとって基本的なシグナルを担っていると予想された。しかしながら、TWEAK/Fn14 ノックアウトマウスは正常に発生し、肉眼的にも組織学的にも目立ったフェノタイプを示さない。さらに、免疫応答にも影響が見られなかった。したがって、器官形成や発達、恒常性の維持における TWEAKの意義は大きくないといえる。一方、Fn14は正常組織にはほとんど発現しておらず、その発現が大きく亢進するのは、腎臓、肝臓、心臓、骨格筋などの疾患モデルで傷害を受けた組織である。とくに、持続する炎症の組織再構築の場での作用が重要であることが明らかになってきた。消化管に関しては我々の成果により以下のような事項が明らかになってきた。

- (1) マウス、ヒトいずれにおいても TWEAKは定常状態の消化管上皮で発現が認められるが、受容体の Fn14の発現は極めて低い。しかし、*in vivo*で大腸炎誘導や、*in vitro*で炎症刺激により上皮細胞で Fn14の発現が亢進し、ケモカインや MMPの産生を促す。
- (2) ノックアウトマウスや抗 TWEAK 抗体を用いた実験では、TWEAK/Fn14の経路を遮断するとハプテン誘導性大腸炎が軽減することから、TWEAK/Fn14が消化管上皮細胞に作用して炎症応答を促進する新たな経路であることを見いだした。
- (3) 放射線照射により上皮細胞傷害を誘導したところ、TWEAKまたは Fn14 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて放射線照射後アポトーシスに陥る上皮細胞数が少なく、抵抗性を示す。

これらの結果から、消化管上皮細胞において「炎症」と「DNA 傷害」の両方の系で TWEAK/Fn14 経路が活性化し、重要な役割を果たしていることになる。しかし DNA 傷害・修復機構と TWEAK/Fn14 を関連づけた研究は世界的にも全くなかった。DNA 傷害は様々な状況で発生するが、その要因の一つとして、近年注目されている、ヒトゲノム上の遺伝子以外の配列に着目した。Long interspersed

nuclear element, L-1 と呼ばれる配列はヒトゲノムの 17% を占め、レトロトランスポゾンとして DNA に挿入されるが、挿入部位によっては遺伝子機能を傷害して疾患発症の誘因となり、また chromosomal rearrangement を引き起こすため、活性化 L-1 は、ゲノム不安定性の原因としても重要であると考えられるようになった。また最近になって L-1 レトロトランスポゾン発現は、二重差切断による DNA 傷害シグナル発現を誘導し、ATM を介してアポトーシスにつながるという報告もみられる。L-1 は炎症によって活性化が誘導される可能性があるため、炎症と DNA 傷害の二つの異なる *in vivo* モデルで共通して TWEAK/Fn14 が活性化されていることに、L-1 が関与している可能性を想定し実験計画を立てた。

2. 研究の目的

- (1) 放射線照射における傷害によるアポトーシス細胞内イベントのうち TWEAK・Fn14 に依存する経路を明らかにする。
- (2) 放射線照射以外の外因性 DNA 傷害においても TWEAK/Fn14 が関与しているかどうかを明らかにする。
- (3) レトロトランスポゾン L-1 の活性化と TWEAK/Fn14 による細胞傷害の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 放射線照射 DNA 傷害によるアポトーシス細胞内イベントのうち TWEAK・Fn14 に依存する経路の同定 (野生型及び TWEAK ノックアウトマウスを比較する網羅的遺伝子発現解析した)
- (2) TWEAK・Fn14 に依存する細胞傷害経路の解析 (リコンビナント TWEAK をマウスに投与し、活性化 Caspase 3 の検出を行った。また腸炎モデルに対する抗 TNF- α 中和剤と抗 TWEAK 抗体の単独投与、混合投与を行い、抗炎症効果と遺伝子発現の網羅的解析によってそれぞれの相互作用を解析した。)
- (3) 炎症によるレトロトランスポゾン L-1 の活性化と TWEAK/Fn14 による細胞傷害の関連の解明 (LI-transgenic マウスに誘導した炎症における L-1 活性化の起こる細胞を同定)
- (4) 抗癌剤およびその他の原因による DNA 傷害における TWEAK/Fn14 の関与 (様々な抗癌剤 DNA 傷害を誘導し TWEAK ノックアウトマウスを用いて検証)

4. 研究成果

野生型および TWEAK 欠損マウスに 3Gy 放射線全身照射を行い、照射後 6 時間後及び 24 時間後の小腸及び大腸の粘膜より RNA

を抽出し、照射を行わないマウスと発現の差異を生じる遺伝子を探索した。さらにこれらの遺伝子のうちで、TWEAK 欠損マウスと野生型マウスで統計学的に有意な差異を認められた遺伝子について解析を行った。この結果、Fn14 が小腸大腸のいずれにおいても照射後 6 時間、24 時間で発現亢進していた。遺伝子発現プロファイルとしてみると、野生型マウスでは DNA 合成や細胞分裂など Cell cycle に関連する遺伝子の広範な発現低下があり、細胞回転の停止と細胞死を反映しているのに比べて、TWEAK 欠損マウスではこのような変化がきわめて小さく、上皮細胞が生存してナイーブマウスと同等の細胞回転を行っていることが示唆された。これらの結果から、TWEAK/Fn14 経路が DNA 傷害ストレスによる cell cycle の停止とそれに続く細胞死において、そのシグナル経路のかなり上流で、必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

そこで、リコンビナント TWEAK ナイーブマウスに 3-5 回 TWEAK を繰り返し投与したのち消化管粘膜の Caspase3 を組織学的に検出する方法で細胞死の誘導を調べたが、TWEAK 単独による細胞死誘導は明らかでなかった。以上より TWEAK の作用機構は既存の細胞死シグナル経路を増強するものと推測された。本研究によらない別の *in vitro* 実験結果から、このシグナルは TNF- α による経路であることが強く示唆された。このためハプテン誘導腸炎モデルに対して抗 TNF- α 中和剤と抗 TWEAK 抗体の混合投与を行ったところ、それぞれの単独投与の相加作用を遥かに越える高い抗炎症効果が得られた。したがって、TWEAK 経路は TNF- α のシグナルを強く増幅・持続させることが明らかとなった。この際の遺伝子発現の網羅的解析、及びリン酸化タンパクの検出によるシグナル解析により、NF- κ B がその主な経路であることが明らかとなった。

さらに、DNA 傷害物質による炎症発癌モデルで L-1 が病変に関与している可能性を想定し石坂らにより作製されたヒト L1-GFP トランスジェニックマウスを用いて、発癌剤アゾキシメタンとデキストラン硫酸飲水内投与による大腸炎誘導を行い、L1 活性化を調べた。本実験系では L1 活性化は非常に頻度が低く、GFP の発現では検出が困難であったため、活性化 L1 を増幅する定量 PCR 系をまず確立した。これにより、活性化 L-1 を定量的に検出できるようになった。その結果、この L1-Tg マウスでも腫瘍は形成されたが、それらの腫瘍の大部分では L1 活性化を検出することができなかった。また、大腸組織では、急性炎症時に最も高い頻度で活性化 L1 検出されるが、上皮細胞よりも粘膜固有層細胞でその頻度が高いことがわかった。したがって活性化

L1 は、上皮細胞の遺伝子異常に直接関わっているのではなく、上皮細胞以外の細胞分画で炎症反応に関わっていると考えた。Fn14 経路は主に上皮細胞内で作用しているため、マウス腸炎モデルで TWEAK と L1 が直接関連している可能性は低いと考えた。

放射線照射以外の DNA 傷害を誘導する実験として、抗癌剤の投与を行いその感受性を調べた。まず、野生型マウスを用いて DNA アルキル化剤、代謝拮抗剤など機序の異なる抗癌剤を投与し、消化管粘膜傷害を誘導する条件を検討した。その結果、空腸全体で絨毛の顕著な短縮と減少が認められることがわかった。Fn14 遺伝子欠損マウスは同様に DNA アルキル化剤の投与に対して野生型マウスに比較して強い耐性を示した。TUNEL 染色により、アポトーシス細胞を検出したところ、野生型マウスでは絨毛基部に多くのアポトーシス細胞が出現していたが、Fn14 遺伝子欠損マウスではアポトーシス細胞の顕著な増加は認めなかった。以上の結果より、放射線照射だけでなく、抗癌剤による DNA 傷害による細胞死シグナル経路も、Fn14 に強く依存していることが明らかとなった。

今後の展望として、抗癌剤や放射線照射の重篤な副作用である消化管粘膜傷害を、TWEAK/Fn14 シグナル経路の阻害によって予防できる可能性が考えられる。

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 14 件)

- Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S, Morita H, Dohi T, Oota H, Hattori M. Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers. DNA Research; 21:15-25, 2014, DOI 10.1093/dnares/dst037
- Inagaki-Ohara K, Mayuzumi H, Kato S, Minokoshi Y, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Matsuzaki G, Yoshimura A. Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice. Oncogene; 33:74-84, 2014, DOI 10.1038/onc.2012.540
- Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Doi A, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Kawamura YI, Otsubo T, Dohi T, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition of long interspersed element-1.

Retrovirology;10:83, 2013, DOI 10.1186/1742-4690-10-83

Son A, Oshio T, Kawamura YI, Hagiwara T, Yamazaki M, Inagaki-Ohara K, Okada T, Wu P, Iseki M, Takaki S, Burkly LC, Dohi T. TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice. *Mucosal Immunology*, 6: p. 1131-1142, 2013. DOI 10.1038/mi.2013.10

Sugiura T, Kageyama S, Andou A, Miyazawa T, Ejima C, Nakayama A, Dohi T, Eda H. Oral treatment with a novel small molecule alpha 4 integrin antagonist, AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice. *J Crohns Colitis*, 7:e533-42, 2013 DOI 10.1016/j.crohns.2013.03.014

Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H, Dohi T. Microbiota derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nature Communications* 4:1654, 2013 DOI 10.1038/ncomms2668

土肥多恵子 IBD 実験腸炎の病理を知る *IBD research* 7(3): 176-181, 2013 http://www.koyodo.com/goods_detail.cgi?hwsbid=90196&msb=1

岡田俊彦, 土肥多恵子 マイクロバイオームと絶食-再摂食における消化管上皮細胞応答/ マイクロバイオームと疾患医学のあゆみ 246(3): 1084-1088, 2013 <http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=924613&AC=13168>

土肥多恵子 炎症性腸疾患に関連した動物実験モデル *日本臨床 増刊号 炎症性腸疾患* 70:122-127, 2012 http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7002ensho.html

Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Mizutani N, Okada T, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T. Comprehensive analysis of chemokines and cytokines secreted in the peritoneal cavity during laparotomy. *J Immunoassay Immunochem* 2011 ; 141:2119-2129 2012. DOI 10.1080/15321819.2011.638409

Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura YI, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, Dohi T, Kannagi R. Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9. *J Immunol*;188:4690-700, 2012 DOI 10.4049/jimmunol.1100605

Dohi T, Burkly LC. The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating

factor in inflammatory diseases; focus on inflammatory bowel diseases. *J Leukoc Biol*, 92:265-279, 2012, DOI 0.1189/jlb.0112042

Burkly LC, Dohi T. The TWEAK/Fn14 Pathway in Tissue Remodeling: For Better or for Worse. *Adv Exp Med Biol* 2011;691:305-322. DOI 10.1007/978-1-4419-6612-4_32

Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T. Interleukin-13 Damages Intestinal Mucosa via TWEAK and Fn14 in Mice - a Pathway Associated with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2011;141:2119-2129. DOI 10.1053/j.gastro.2011.08.040

〔学会発表〕(計 12件)

Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T. Cell type-specific, genome-wide epigenetic analysis for lamina propria cells isolated from the colon with ulcerative colitis. 第42回日本免疫学会学術集会. 2013年12月11日、千葉

萩原 輝記、秋山 純一、三宅 大、大坪 武史、櫻井 俊之、清水 利夫、土肥多恵子、河村 由紀. パレット食道および食道腺癌におけるDNAメチル化異常 第86回日本生化学会大会 2013年9月13日

土肥多恵子, <招待講演>消化管炎症の重症化・慢性化機構を担う因子. 第50回日本消化器免疫学会ランチョンセミナー. 2013年8月1日、東京

Dohi T, Kawamura YI, Kawashima R, Son A, Oshio T, Wu P, Burkly LC. TWEAK/Fn14 pathway promotes chronic colitis and fibrosis mediated by IL-13-TSLP axis. *Immunology* 2013, May 3-7, 2013, Honolulu.

Otsubo T, Kawamura YI, Ishizaka Y, Dohi T. Involvement of L1 retrotransposition in murine experimental colitis-cancer model. DDW2013, May 20, 2013, Orlando.

Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Ichikawa T, Saito Y, Burkly LC And Dohi T. TWEAK/Fn14 pathway mediates IL-13 induced intestinal epithelial cell death. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日、神戸

Dohi T, Son A, Kawamura YI, Inagaki-Ohara K, Oshio T, Burkly LC. TWEAK/Fn14 pathway promotes chronic colitis with Th2-type cytokine responses. (Oral presentation) 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日、神戸

Dohi, T. <招待講演>The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory bowel diseases. The 2nd Kinshukai International Symposium: Inflammatory Bowel Disease: Science, Safety and Clinical Care in IBD. October 27, 2012, Osaka

土肥多恵子. <招待講演>炎症性腸疾患のマウスモデルを用いた病態解析. 第40回日本臨床免疫学会総会ワークショップ. 2012年9月28日, 東京

川島 麗, 土肥多恵子, 河村由紀, 川上文貴, 市川尊文. IL-13による消化管粘膜傷害におけるTWEAK/Fn14経路の関連性. 第40回日本潰瘍学会, 2012年7月14日, 東京

T Dohi, R Kawashima, YI Kawamura, T Oshio, M Yamazaki, T Hagiwara, T Okada, P Wu, S Szak, YJ Kawamura, F Konishi, O Miyake, H Yano, Y Saito, L. C. Burkly, IL-13 induces TWEAK-dependent activation of TNF- α and intestinal epithelial cell damage –a pathway associated with ulcerative colitis. Digestive Disease Week, 2012, San Diego, U. S. A, May 19, 2012, Abstract in ; Gastroenterology, Volume 142, Issue 5, Supplement 1, May 2012, Pages S-346-S-347

Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T. Interleukin-13 links to TWEAK/Fn14 pathway in intestinal epithelial cell injury. TNF 2011 May 16, 2011, Awajishima, Hyogo

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.rincgm.jp/individual/hep02/yan_jiu_n ei_rong.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

土肥 多恵子 (DOHI, Taeko)

国立国際医療研究センター研究所 肝炎・免疫研究センター 消化器疾患研究部・部長

研究者番号: 60250221

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

河村 由紀 (KAWAMURA, I Yuki)

国立国際医療研究センター研究所 肝炎・免疫研究センター 消化器疾患研究部 病態生理研究研究室長・室長

研究者番号: 10392391

石坂 幸人 (Ishizaka, Yukihito)

国立国際医療研究センター研究所・副所長

研究者番号: 30281687

研究協力者

大坪 武史 (OTSUBO, Takeshi)

国立国際医療研究センター研究所 肝炎・免疫研究センター 消化器疾患研究部・特任研究員

研究者番号: 00623034

川島 麗 (KAWASHIMA, Rei)

北里大学医療衛生学部・助教

研究者番号: 70392389

Linda C. Burkly

Distinguished Investigator

Departments of Immunobiology and Drug Discovery,
Biogen Idec