

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 15 年度博士課程進学
氏 名 望月鉄之祐
指導教員名 清水 誠

論文題目 腸管上皮細胞におけるタウリン輸送担体の TNF- α による制御

タウリンは細胞内に遊離した状態で存在する含硫 アミノ酸であり、魚介類などの食品に多く含まれている。その生理作用としては、浸透圧調節、神経保護、解毒、抗酸化などが知られている。

食品として摂取されたタウリンは、腸管上皮に存在するタウリン輸送担体(taurine transporter:TAUT)を介して生体内に吸収される。この腸管上皮の TAUT は細胞外のタウリン濃度や浸透圧などの変化や、黒ゴマ抽出成分であるリゾフォスファチルコリンといった食品因子により制御、調節を受けることがこれまでに見出されてきたが、その体内での調節の仕組みについては不明な点が多い。

腸管上皮は食物の消化・吸収の場であると同時に生体外の有害な異物と接触する最前線の間でもある。このため、腸管には全末梢リンパ球の 60~70%が分布し、高度に発達した独特な生体防御システムである腸管免疫系が存在する。この系における免疫応答にはサイトカインが重要な役割を果たしている。サイトカインとは主に免疫担当細胞から分泌され、免疫、炎症反応の制御作用、抗ウイルス作用、細胞増殖・分化の調節作用など細胞間相互作用を媒介するタンパク質性因子の総称である。本研究では腸管上皮における TAUT を制御する新たな因子としてこのサイトカインに注目し、TAUT 活性に影響を及ぼすサイトカインがないか検討したところ、tumor necrosis factor (TNF- α)が TAUT 活性を亢進することが見出された。そこで、TNF- α によ

る TAUT 活性の制御メカニズムとこの現象の持つ生理的な意義について検討を行った。

1. Caco-2 におけるタウリン輸送活性に及ぼすサイトカインの影響

ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来株化細胞である Caco-2 細胞を用いた。まず、プレート上で 2 週間培養した Caco-2 細胞を各サイトカインを添加した培地で 24 時間培養した。細胞を洗浄し、トリチウムラベルされたタウリンを含んだハクス液で 37 °C、10 分間インキュベートしてその際に細胞内に取り込まれたトリチウム量をタウリン輸送活性(TAUT 活性)とした。その結果、tumor necrosis factor (TNF- α) で約 2 倍、IL-1 β で約 1.5 倍の TAUT 活性の亢進がみられた。TNF- α と IL-1 β を同時に Caco-2 に作用させたところ、相加相乗的な TAUT 活性の亢進はみられず、TNF- α を単独で作用させた時と同程度の TAUT 活性の亢進しかみとめられなかった。このことから TNF- α と IL-1 β による TAUT 活性の亢進は共通の経路を介していることが示唆された。TNF- α による TAUT 活性の亢進は TNF- α 濃度依存的かつ TNF- α 作用時間依存的であった。また、TNF- α により細胞内タウリン量が増加することもわかった。他のアミノ酸(ロイシン、リジン、グルタミン酸)の輸送活性は TNF- α によって亢進しなかった。他の組織由来の細胞株として HepG2 細胞(肝臓)、HEK293 細胞(腎臓)、マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞のそれぞれを TNF- α で処理したところ、THP-1 においてわずかな TAUT 活性の亢進がみられただけで他の細胞は応答しなかった。このことから TNF- α は腸管上皮という特定の部位で TAUT 活性を特異的に亢進させていることが示唆された。

TNF- α で処理した Caco-2 細胞における TAUT 活性の Kinetics を解析したところ、コントロールに対して Vmax 値の増加と Km 値の減少がみられ、この制御にはタウリン輸送担体数の増加と基質との親和性の増加が関与していることが示唆された。また、ノーザン解析において TNF- α 処理した Caco-2 では未処理のものにくらべて TAUT mRNA の発現量が増加していた。

2. TNF- α によるタウリン輸送担体制御における NF- κ B の関与

TNF- α からのシグナル伝達については、nuclear factor kappaB(NF- κ B)を活性化させることがよく知られている。また、1 における結果から TNF- α と IL-1 β は共通の経路を介して TAUT 活性を亢進させていることが示唆されたが、IL-1 β についても NF- κ B を活性化させることが知られている。このことから TNF- α による TAUT 活性の亢進には、NF- κ B が関わっていることが考えられた。そこで、NF- κ B の活性化を阻害することが知られている阻害剤 4 種類を TNF- α と共に細胞に作用させて TAUT 活性亢進に対する影響を調べた。その結果、4 種類の阻害剤はいずれも TNF- α による TAUT 活性の亢進を有意に抑制した。最も阻害効果の強かった pyrrolidine

dithiocarbamate (PDTC) は TNF- α による TAUT mRNA の発現増加についてもこれを抑制した。NF- κ B は細胞質中に I κ B と会合した形で存在し、上流のシグナルから I κ B がリン酸化され、引き続いてユビキチン化を受けてプロテアソームにより分解されることで活性化する。TNF- α による I κ B の分解に対する PDTC の効果について I κ B のウェスタンブロットにより調べたところ、PDTC により I κ B の分解が遅れることがわかった。このことから PDTC がこの系において実際に NF- κ B の活性化を抑制していることが確かめられた。さらにヒト TAUT 遺伝子 5'上流約 2.4kbp に NF- κ B のコンセンサス様配列(GGGTCATTTCC)を見出し、この配列を含むレポーターベクターを Caco-2 に導入し TNF- α による応答をみたところ、TNF- α 未処理にくらべ約 2 倍の応答がみられた。また、ゲルシフトアッセイによりこの配列と NF- κ B が結合しうることが示された。以上の結果から、TNF- α による TAUT 活性の亢進は NF- κ B により転写レベルで制御されていることが示唆された。

3. TNF- α による TAUT 制御における NF- κ B 以外の因子の関与

TNF- α による TAUT 制御に関わる NF- κ B 以外の因子を調べるため、いくつかの情報伝達阻害剤を用いて TAUT 活性への影響を調べた。その結果、c-Jun N-terminal kinase(JNK) の阻害剤が TAUT 活性の亢進を抑制した。この阻害剤は I κ B の分解は抑制しなかったことから JNK は NF- κ B の下流もしくは別経路で機能していることが示唆された。

TNF- α に対するレセプターは TNF レセプター-1(TNFR1)と 2(TNFR2)があることが知られている。Caco-2 で両レセプターの発現を確認後、それぞれの中和抗体を用いて TAUT 活性への影響を調べたところ、TNFR1 の中和抗体が TNF- α による TAUT 活性の亢進を抑制した。このことからこの制御において TNFR1 が関わっていることが示唆された。

TNF- α により活性化した TNFR1 には TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) が会合して下流にシグナルを伝達することが知られている。そこで、TRAF2 ステアブルノックダウン細胞を用いて TNF- α による TAUT 活性の亢進への影響を調べたところ、ネガティブコントロールでは TNF- α により TAUT 活性が亢進したのに対して TRAF2 ノックダウンでは TAUT 活性は亢進しなかった。このことから TRAF2 も TAUT 制御に関わっていることが示唆された。

4. THP-1 との複合培養により示される Caco-2 の細胞障害とそれに対するタウリンの効果

以前の研究において、マクロファージ様に分化させた THP-1 と Caco-2 細胞層とを透過性膜を隔てて複合培養すると、Caco-2 の lactate dehydrogenase (LDH) 放出が増加し、経上皮電気抵抗(trans epithelial electrical resistance: TER)値が減少する

という現象がみられ、Caco-2 が細胞障害を引き起こすことがわかっていました。この細胞障害は複合培養液中に TNF- α の中和抗体を添加することで軽減されたことから、TNF- α が細胞障害の一因になっていることが示唆されていた。この複合培養系においてタウリンを作用させると、タウリン濃度依存的に Caco-2 の LDH 放出を抑制し、減少した TER 値を回復させた。このことからタウリンには TNF- α が原因で起こる腸管上皮の炎症性ダメージを和らげるという新たな生理作用があることが示唆された。

本研究のまとめ

腸管上皮細胞において、炎症性サイトカインである TNF- α により TAUT 活性が亢進することが見出され、この制御には主として NF- κ B が転写レベルでヒト TAUT 遺伝子の発現を増加させることによることが示唆された。また、タウリンは腸管上皮において TNF- α が一因となって起こる細胞へのダメージを抑制する働きがあることが見出された。NF- κ B は転写レベルで種々の炎症性サイトカインの発現を制御しており、腸管上皮細胞においても IL-1 β 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインまたはケモカインの発現が NF- κ B により制御されていることが知られている。これらのことを考慮すると、生体外の異物に対する免疫応答としてマクロファージなどから分泌される TNF- α に対し、腸管上皮細胞は NF- κ B を介して炎症性サイトカインの分泌を増加して炎症を促進すると同時に、自身へのダメージについては同じく NF- κ B により誘導される TAUT が細胞へのタウリン取り込みを上昇させることで防いでいるという生理的意味がこの現象にはあると推察された。

参考文献

- (1) Mochizuki, T., Satsu, H. and Shimizu, M. (2002) FEBS Letters Vol.517, No.1-3, pp.92-96
- (2) Mochizuki, T., Satsu, H. and Shimizu, M. (2004) BioFactors Vol.21, pp.141-144
- (3) Mochizuki, T., Satsu, H. and Shimizu, M. (2005) FEBS Letters Vol.579, No.14, pp.3069-3074