

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 19 年度博士課程 進学
氏名 石本容子
指導教員名 清水 誠

論文題目 複合培養系を用いた腸管上皮細胞とマクロファージ様細胞の相互作用の解析

小腸は栄養素の吸収器官としての働き以外に異物に対する防御機構を備えている。その 1 つが腸管免疫系であり、小腸上皮細胞とその直下の粘膜固有層等に存在する免疫細胞から構成されている。小腸上皮細胞と免疫細胞は液性因子などを介して互いに制御しあっており、その破綻が腸管の炎症の一因であることが知られている。例えば、近年患者数が増大しているクローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease : IBD）は小腸や大腸に潰瘍ができる治療困難な腸疾患であり、腸管免疫系を制御するサイトカインの産生異常に起因する。特にクローン病では異常亢進したマクロファージが産生する炎症性サイトカインである $\text{TNF-}\alpha$ により腸管上皮細胞が傷害を受けることが明らかにされており、臨床では抗 $\text{TNF-}\alpha$ 抗体が症状緩和に効果をあげている。しかしながらその副作用には十分な注意が必要であり、より安全な治療法が期待されている。本研究では、腸炎症発症の分子メカニズムに関するさらなる情報取得をめざして、小腸上皮様細胞と小腸の炎症時に活性化されていることが知られているマクロファージ様細胞からなる複合培養系を構築した。この複合培養系を、サイトカインの異常産生により引き起こされる腸炎症の *in vitro* モデル系として用い、2 種の細胞間相互作用時に起きる現象の詳細な解明をおこなった。

第 1 章 複合培養時の Caco-2 細胞における傷害誘導の機構解析

腸管上皮細胞およびマクロファージ様細胞のモデルとして、それぞれヒト結腸癌由来株化細胞

Caco-2 細胞およびヒト急性単球性白血病由来細胞株 THP-1 細胞を用いた。Transwell の透過性膜上に Caco-2 細胞を単層培養して小腸上皮様に分化させ、その basal 側に PMA 処理によりマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞を配置することで複合培養開始とした (図 1)。今までに、複合培養することで Caco-2 細胞層が傷害を受けること、その傷害に THP-1 細胞の産生する TNF- α が関与していることが、経上皮電気抵抗測定や細胞傷害試験である LDH 放出量測定により分かっている。これらの現象は炎症時の小腸の状態と似ており、Caco-2 細胞と THP-1 細胞からなる複合培養系を小腸炎症状態のモデルとみなして以下進めていくことにした。

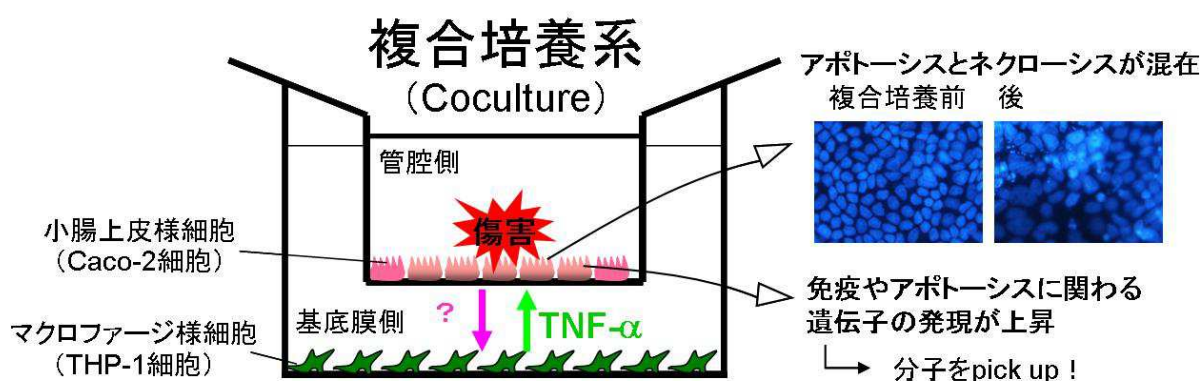


図 1. 小腸上皮様細胞とマクロファージ様細胞の複合培養系を用いた腸炎症の *in vitro* モデル系

第 1 節 複合培養時に Caco-2 細胞が示す傷害の性質に関わる検討

複合培養により Caco-2 細胞が受ける傷害が細胞膜損傷を伴う細胞死に起因することが、LDH 細胞傷害試験の結果から考えられた。そこで Caco-2 細胞の形態変化の観察やカスパーゼ活性の測定をおこなうことで、Caco-2 細胞層の受ける傷害がどのようなものであるか詳しく調べた。Hoechst 染色を用いた顕微鏡観察より、複合培養する時間が長くなるにつれて透過膜上に接着している細胞の密度が低くなり、膨らんだ細胞の数が増えるなど、ネクローシス様の形態が観察される一方で、24 時間以上複合培養した Caco-2 細胞で典型的なアポトーシス像が観察された。同時にアポトーシス時に誘導されることが知られているカスパーゼ 3 の活性化も見られ、複合培養による Caco-2 細胞の傷害にアポトーシスとネクローシスの両方が混在しているという興味深い知見が得られた。また、アポトーシス時のミトコンドリア膜の透過性を制御する Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量を調べたところ、Bcl-2 の発現量低下が観察され、複合培養した Caco-2 細胞の傷害にミトコンドリアからのアポトーシス誘導タンパク質の漏出が関与している可能性が示された。

第 2 節 複合培養時に Caco-2 細胞が示す傷害に関わるシグナル伝達経路の解析

TNF- α の結合しうる受容体には TNFR I 及び TNFR II の 2 種類がある。また、MAP キナーゼカスケード及び NF- κ B は TNF- α 刺激により活性化されることが一般的に知られている。そこで THP-1

細胞と複合培養することで Caco-2 細胞が受ける傷害がどのようなシグナル伝達経路を介しているか調べるために、各種阻害剤や中和抗体をそれぞれ培地に添加して複合培養をおこなった。その結果、THP-1 細胞の産生する TNF- α は Caco-2 細胞膜上の TNFR I を介してそのシグナルを伝達すること、Caco-2 細胞の受ける傷害に NF- κ B 経路が関与することが示唆された。NF- κ B の活性化は TNF- α などのサイトカインや外来の菌体成分刺激に加え、ROS の生成によっても誘導されるという報告が数多くされている。そこで ROS の除去において主要な働きを担う抗酸化物質グルタチオン (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine : GSH) 量を測定したところ、複合培養 48 時間後の細胞内 GSH 量は未処理時の半量程度まで減少しており、複合培養により Caco-2 細胞内で ROS が生成している可能性も示された。

第 3 節 Caco-2 細胞との複合培養により THP-1 細胞が受ける影響

Caco-2 細胞と複合培養したときに THP-1 細胞が受ける影響について調べるべく、単独で培養した THP-1 細胞および複合培養後の THP-1 細胞について、形態の観察および LDH 放出量・タンパク質量の測定をおこなった。その結果、複合培養群の THP-1 細胞において紡錘状の形態が破壊した様子や細胞密度の低下が観察された。さらに顕著な LDH 放出量の上昇とタンパク質量の減少がみられ、複合培養することで THP-1 細胞は傷害を受けることが考えられた。また THP-1 細胞が分泌する TNF- α 量を測定したところ、複合培養した THP-1 細胞の TNF- α 分泌量が減少し、この減少が TNF- α mRNA 発現量の減少に起因する可能性が示された。

第 2 章 複合培養時の Caco-2 細胞における遺伝子発現プロファイルの網羅的解析

複合培養時の Caco-2 細胞層における遺伝子発現パターン変化を網羅的に解析すべく、THP-1 細胞と 0、1、3、6、24、48 時間複合培養した Caco-2 細胞について DNA マイクロアレイをおこなった。複合培養初期、特に 1 時間後に発現量が変動する遺伝子を抽出するために、maSigPro という時系列解析用にデザインされた R のパッケージを用いた。発現量の経時変化が 2 次関数で表現できるプローブセットを抽出したところ、複合培養初期に発現量が上昇する遺伝子群の中では Immediate early response gene (IEX-1) が、低下する遺伝子群の中では annexin a2 pseudogene 2 が最も p-value が小さい、すなわち発現量変動が大きい遺伝子として選抜された。次に IEX-1 ならびに annexin a2 pseudogene 2 をテンプレートにしてパターンマッチングをおこない、相関係数の高い順に並び替えた。並び替えたプローブセットについてそれぞれ上位 5% までを選抜しクラスタリングをおこなった結果、複合培養初期に発現量が上昇する遺伝子群には、免疫やアポトーシス、プロテインキナーゼカスケードに関わる遺伝子が、発現量が低下する遺伝子群には酸化的リン酸化や転写、翻訳、細胞周期に関わる遺伝子が多く含まれていることが分かった。ここから、複合培養した Caco-2 細胞が炎症状態にあるということ、また初期防御反応と細胞死へと向かう動きが同時に起こり、結果的に死んでいくという示唆が得られた。

第3章 IEX-1による複合培養時のCaco-2細胞の傷害抑制機構の解析

発現量が上昇した遺伝子の中から最も発現量変動が大きいIEX-1に注目し、複合培養時のCaco-2細胞でみられる現象にどのように関与しているか調べることにした。まずIEX-1が腸管において発現しているか調べるために、C57BL/6マウスの小腸粘膜組織からRNAを抽出し、このRNAから作製したcDNAをテンプレートにRT-PCRをおこなった。その結果、IEX-1が正常な腸管粘膜に発現していることが分かった。

IEX-1は細胞周期の促進、増殖、アポトーシスの調節などに関与している初期応答遺伝子で、炎症性サイトカインにより転写が誘導されることが知られている。そこで複合培養開始時に抗TNF- α モノクローナル抗体を添加したところ、複合培養時に増加するIEX-1mRNA発現量が抑制され、THP-1細胞の産生するTNF- α がCaco-2細胞におけるIEX-1mRNAの発現を誘導していることが示された。

次に、IEX-1が複合培養時に生じるCaco-2細胞の傷害に実際に関与しているかを調べるために、IEX-1を安定的に過剰発現させた細胞株を作製した。この細胞を用いてTHP-1細胞と複合培養したところ、過剰発現株においてLDH放出量の減少がみられ、複合培養時のCaco-2細胞においてIEX-1は傷害を抑制する方向に働く可能性が示された。

総括

本研究により、活性化マクロファージにより傷害がひきおこされた腸管上皮細胞は死に向かうことが示された。またこのとき腸管上皮細胞は傷害を受けるだけでなく、マクロファージ側に作用してその傷害をも引き起こすことが分かった。このような一種の自己防御反応があるにも関わらずそれを上回る刺激に対して腸管上皮細胞が死んでいくという現象は、炎症時の腸管の一側面を表しており、絶え間ない刺激に曝された時に腸管上皮細胞で引き起こされる現象について分子レベルでの情報を得るのに、本系が有用であると思われる。炎症時の反応を腸管に存在する細胞間のやり取りの面から解析した研究はあまりない。本研究により得られた腸炎症に関わる傷害の性質やシグナル伝達経路、傷害発生時の遺伝子発現パターンなどの新たな知見を活かすことで、腸炎症の治療や予防につながる事が期待できる。

参考文献

Satsu, H., Ishimoto, Y., Nakano T., Mochizuki T., Iwanaga T., Shimizu M. Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor-alpha. *Exp Cell Res.* (2006) Vol.312 No.19 pp.3909-3919

Ishimoto, Y., Nakai, Y., Satsu, H., Totsuka, M., Shimizu, M., Transient Up-regulation of Immunity- and Apoptosis-related Genes in Caco-2 Cells Cocultured with THP-1 Cells Evaluated by DNA Microarray Analysis. *Biosci Biotechnol Biochem.* in press