

3238

炎症性腸疾患におけるステロイド抵抗性免疫異常の制御

(研究課題番号 12670451)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金
(一般(C))

研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 蘆 田 知 史

旭川医科大学医学部助手

はしがき

研究組織

研究代表者 : 蘆田 知史(旭川医科大学医学部助手)
研究分担者 : 高後 裕 (旭川医科大学医学部教授)
研究協力者: 折居 史佳(旭川医科大学医学部研究生)

交付決定額(配分額) (金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	1900		1900
平成 13 年度	800		800
平成 14 年度	500		500
総計	3200		3200

研究発表

(1) 学会誌等

Orii F, Ashida T, Nomura M, Maemoto A, Fujiki T, Ayabe T, Imai S, Saitoh Y, Kohgo Y. Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD.

Biochem Biophys Res Commun 2002 Sep 6;296(5):1286-1292

F.Orii, T.Ashida, Y.Kohgo. Molecular Mechanism of Glucocorticoid Resistance, Gastroenterology 119 (4) ,2000, 1178-1179

(2) 口頭発表

F.Orii, T.Ashida, Y.Kohgo, et al. #1881; Induction of dominant-negative regulator for glucocorticoid receptor observed in IBD patients

米国消化器病学会(AGA) 2000,5.20

研究目的

グルココルチコイド（以下 GC）は潰瘍性大腸炎（以下 UC）の治療法として広く用いられるが、再燃例においてはしばしば不応例となることが知られている。cDNA のクローニングにより、ヒトグルココルチコイドレセプター（以下 hGR）は二つのアイソフォーム、hGR α と hGR β を持つことが知られている 1)。hGR β は hGR α の活性に対して dominant-negative な阻害物質としての役割を果たしており、hGR β の相対的過剰発現が GC 抵抗性の調節に寄与している可能性が示唆されている 2)。

われわれは、これまで hGR β mRNA が GC 抵抗性 UC 患者の末梢血単核球（以下 PBMC）において GC 感受性患者よりも有意に高率に検出されることを報告してきた 3)。本研究では hGR mRNA の選択的スプライシングの誘導因子やその経時的な変化を明らかにすることを目的として、炎症性腸疾患患者の末梢血単核球における hGR α/β mRNA を定量 PCR を用いて経時的に測定した。また、培養 T 細胞株や末梢血単核球を GC や種々のサイトカイン存在下で培養し、hGR α/β mRNA の発現量を解析した。その結果、UC 患者では GC 抵抗性症例で hGR β mRNA の発現量が有意に多いこと、またこの hGR β mRNA は繰り返す再燃によって発現が誘導され、そのメカニズムは IL-18 などの炎症性サイトカインによることを明らかにした。

材料・方法

材料

34 人の UC 患者、13 人の Crohn 病（以下 CD）患者、19 人の健常人の末梢血単核球を材料とした。UC 患者の疾患活動性は colitis activity index（以下 CAI）にて評価し、採血時の CAI が 5 以上の患者を活動期とした。CD は血清 CRP が 0.3mg/dl より高い患者を活動性とした。UC 患者の GC 反応性は、20mg/day のプレドニゾロン投与によって 4 週以内に緩解導入された患者（CAI が 4 以下となった患者）を GC 感受性と判定し、4 週の治療によっても CAI が 4 以下とならなかったか、またはこの期間に手術を必要とした患者を GC 抵抗性と分類した。

PBMC 中の hGR α および hGR β mRNA の定量

PBMC 中の hGR α および hGR β mRNA の発現は定量的 RT-PCR により測定した。PBMC からの全 RNA は AGPC 法により抽出し、DNase 処理し、oligo dT primer により逆転写して、Light Cycler により PCR 法で解析した。PCR 産物の増幅は二本鎖 DNA に結合する蛍光色素である SYBR Green I を測定することにより観察した。同じ

cDNA から内部標準として human Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)を同時に増幅した。hGR α および hGR β mRNA を発現している Jurkat cell line から合成した cDNA を段階的に希釈して増幅し外部標準とした。

PCR 生成物の同一性と均質性は初期増幅プログラムの後の T_m 値解析により確認した。遺伝子配列を確認するために、ダイレクトシーケンシング法により PCR 生成物を解析した。

GC、サイトカインの hGR mRNA 発現量に及ぼす影響の解析

hGR mRNA 発現におけるサイトカインと GC の影響を調べるために、ヒト T 細胞株である CEM 1x10⁷ 個および健常人の PBMC 1x10⁸ 個を 6 穴培養プレートにまき、リコンビナントヒト TNF α 、IL-7、IL-1 β 、IL-18 を種々の濃度で添加し、10%FCS 加 RPMI medium で培養した。24 時間後 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を行った。

統計学的検討

各群間の hGR α および hGR β mRNA の定量値、疾患活動性、罹病期間、GC 総投与量などの臨床的指標に関する統計学的差異は、Mann-Whitney U test により検定した。hGR α および hGR β mRNA 発現と血清 CRP、CAI との関係は単回帰分析により解析した。長軸解析においては、hGR α および hGR β mRNA のレベルに関する有意差は Wilcoxon's signed rank test により検定した。p 値 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。

結果

定量的 RT-PCR の最適化とその感度

Light Cycler のシステムを用いることによって従来のアガロースゲル電気泳動法よりも、より高感度に hGR α および hGR β の PCR 産物を増幅し検出することができた。測定感度は 5copy/ml であった。外部標準として用いたコントロール cDNA 内の hGR β の実際のコピー数は特異的 hGR β 配列を持つベクターとの比較により、1ml の cDNA 当たり 8.9x10² コピーであることが判明した。この cDNA の hGR α : hGR β 比はこのシステムでは 621 : 1 と計算された。

UC、CD 患者および健常対照の PBMC における hGR mRNA の発現

hGR α mRNA の発現量は活動性 UC 患者群、非活動性 UC 患者群、CD 患者群および健常対照群で分布に差はなかった。これに対し hGR β mRNA の発現量は活動性 UC 患者群において非活動性 UC 患者群および健常対照群よりも有意に高値であった。

活動性 UC 患者群における hGR β /hGR α 比も、他の群よりも有意に高値であった。(Fig1)。

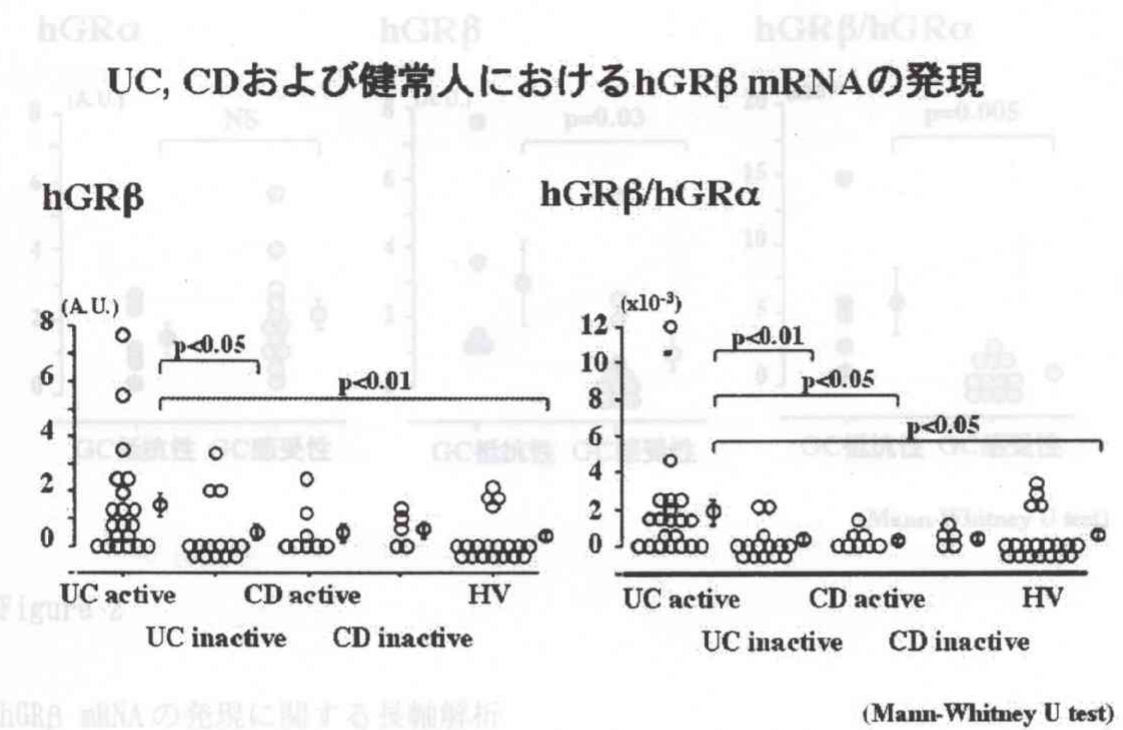


Fig 1 UC患者34人中22人のhGR α およびhGR β mRNAの発現量の経時的変化を解析した。22症例中14症例に観察期間中の再燃を認めた。hGR β mRNAの発現は再燃患者群において有意に増大していたが、非再燃患者群では有意な変化は認められなかった。年齢、性別およびGC総投与量は活動性UC患者群と非活動性UC患者群の各群に差はなかった。

UC患者群におけるhGR α 、hGR β mRNAの発現量とCAIまたは血清CRP値の間に有意な相関関係は認められなかった。

hGR β mRNA発現とGC抵抗性との関係

対象症例のうち17例でGCに対する反応が評価可能であり、そのうち5例はGC抵抗性と分類された。hGR α mRNAにGC感受性および抵抗性各群で有意な差は認められなかった。これに対して、hGR β mRNAはGC抵抗性群では感受性群に比べて高値であった。hGR β /hGR α 比もまたGC抵抗性群では感受性群に比べて高値であった。(Fig.2) 各群の採血時の平均CAI値(GC抵抗性群 11.0 ± 4.2 (SD)、GC感受性群 7.5 ± 1.2)や血清CRP値(GC抵抗性群 0.47 ± 0.019 (SD)、GC感受性群 0.75 ± 0.38)に有意差はなかった。

GC抵抗性、感受性UC患者群におけるhGR mRNAの発現

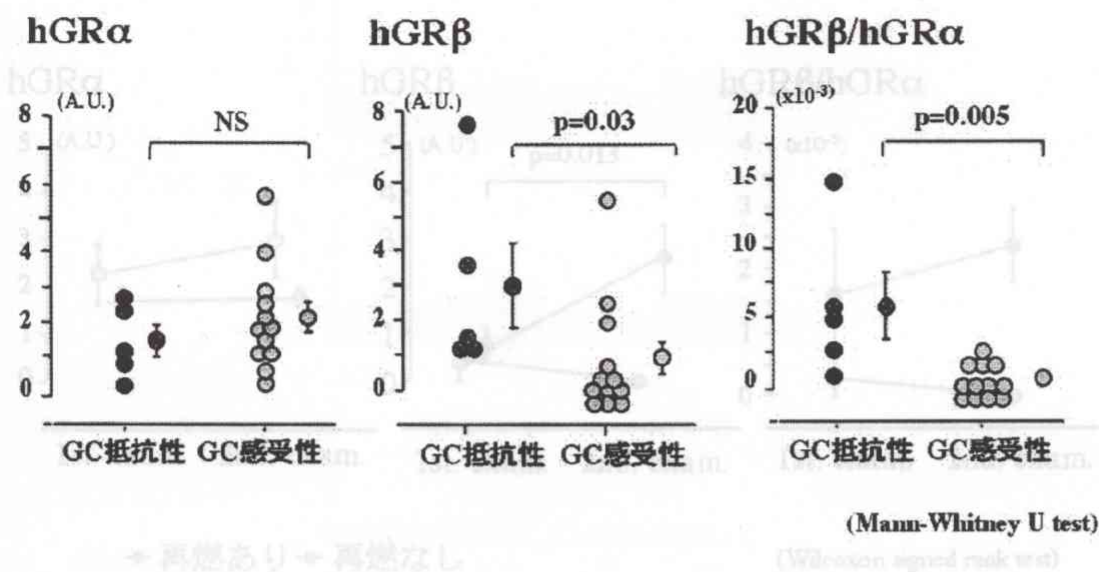


Figure 2

hGRβ mRNA の発現に関する長軸解析

UC 患者 34 人中 22 人の hGRα および hGRβ mRNA の発現量の経時的変化を解析した。22 症例中 14 症例に観察期間中の再燃を認めた。hGRβ mRNA の発現は再燃患者群において有意に増大していたが、非再燃患者群では有意な変化は認められなかった。観察期間中 hGRα の発現は両群において変化しなかった (Fig 3)。

in vitro 培養実験

培養 T 細胞株 CEM や末梢血単核球を GC や種々のサイトカイン存在下で培養し、hGRα、mRNA の発現量を解析した。CEM 細胞を 10 から 1000nM の DEX を添加し 24 時間培養後、hGR mRNA を測定したが、hGRα、mRNA 発現に変化は見られなかった (Fig 4)。

UC患者におけるhGR mRNAの経時的変化

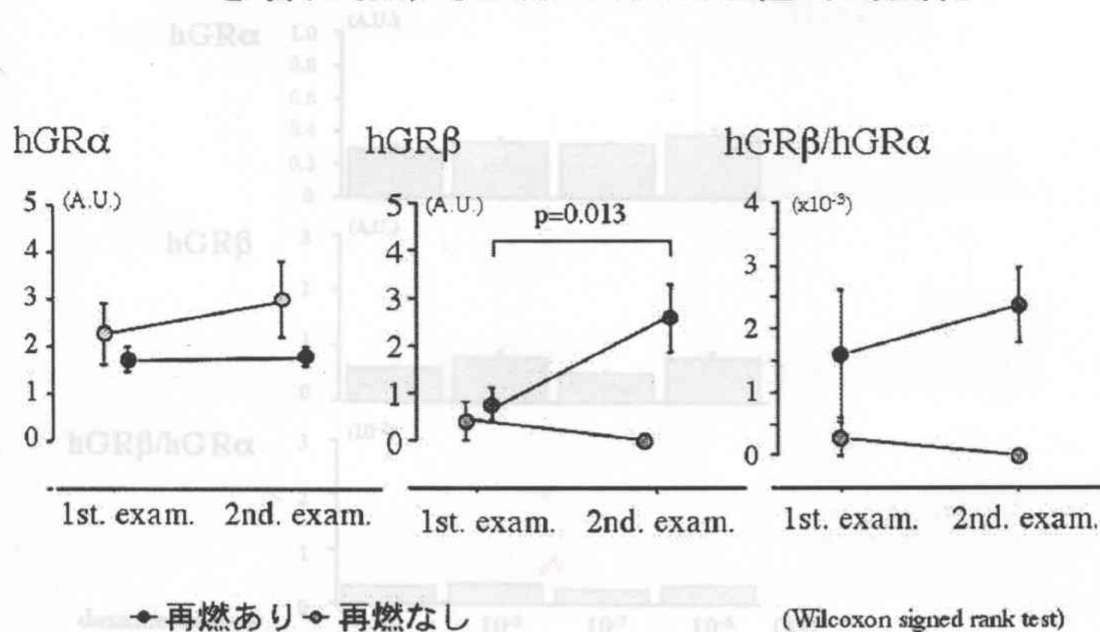


Figure 3

各群の初回および2回目採血時のCAIに差はなかった。期間中再燃患者群に投与されたGC投与量の平均値($681 \pm 442.9\text{mg}$)は、非再燃患者群の平均値($222 \pm 138.7\text{mg}$)の約3倍の量であった。しかしPBMC中のhGRβ mRNAの発現量はGCの総投与量および採血日投与量に単純には相関しなかった。

in vitro 培養実験

培養T細胞株CEMや末梢血単核球をGCや種々のサイトカイン存在下で培養し、hGRα、mRNAの発現量を解析した。CEM細胞を10から1000nMのDEXを添加し24時間培養後、hGR mRNAを測定したが、hGRα、mRNA発現に変化は見られなかった (Fig 4)。

Dexamethasone添加によるCEM細胞のhGR mRNA発現の変化

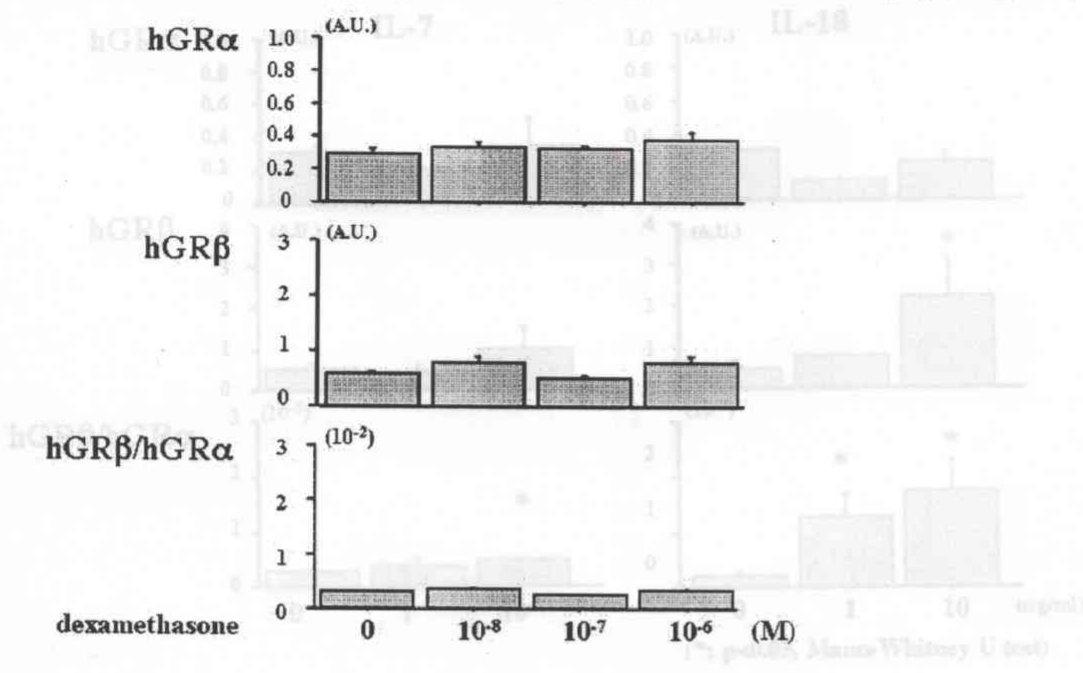


Figure 4

最近、NFκB の活性化を誘導する IL-1β、TNFαが hGRβ mRNA の発現量を増大させるとの報告が見られることから、われわれも TNFα、IL-1βおよび炎症性腸疾患において産生の亢進が報告されている IL-18、IL-7 が hGR mRNA の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、10ng/ml の IL-7 が CEM における hGRβ/hGRα比を増大させた。さらに、1 および 10ng/ml の IL-18 が hGRα mRNA は変化させず hGRβ mRNA および hGRβ/hGRα比を有意に増大させた。

IL-7, IL-18添加によるCEM細胞のhGR mRNA発現の変化

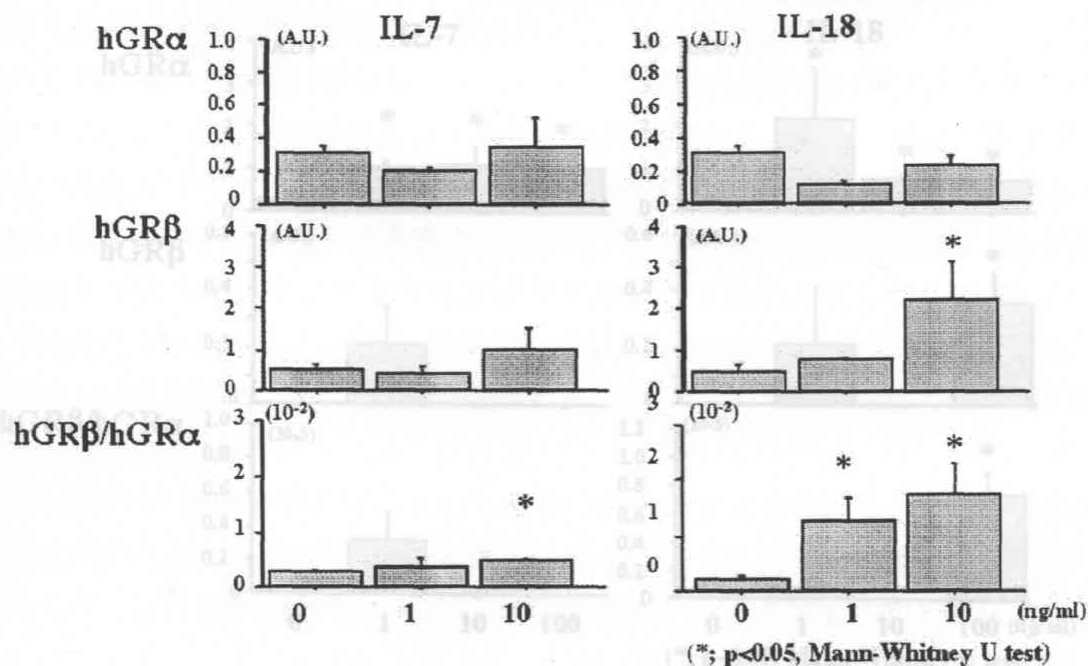


Figure 5

Figure 5

考

CEM細胞と対照的に、IL-7とIL-18はPBMCにおいてhGRα mRNAの発現を有意に増大させた。PBMCにおいて100ng/mlのIL-18存在下でhGRβ mRNAの発現が誘導された。IL-7ではPBMC中のhGRβ mRNAの発現の誘導を確認できなかった(Fig 6)。

3) UC 症例においてhGRβ mRNA発現量、およびhGRβ/α比はUC抵抗性群では感受性群に比べて有意に高値であった。

4) UC 症例において経時的にhGRβ mRNAの発現量を比較した。その結果、hGRβ mRNAの発現量およびhGRβ/α比は非再燃患者群に比べ再燃患者群において有意に増大していた。

5) hGRβ mRNAの発現量を増加させる因子を解析する目的で、dexamethasoneおよび各種の炎症性サイトカインの影響をin vitroで検討した。その結果、dexamethasoneの存在下で24時間培養してもT細胞株CEMのhGRβ mRNAの発現量に影響を及ぼさなかった。一方、炎症性腸疾患で産生の炎症性サイトカイン

IL-7, IL-18添加によるPBMCのhGR mRNA発現の変化

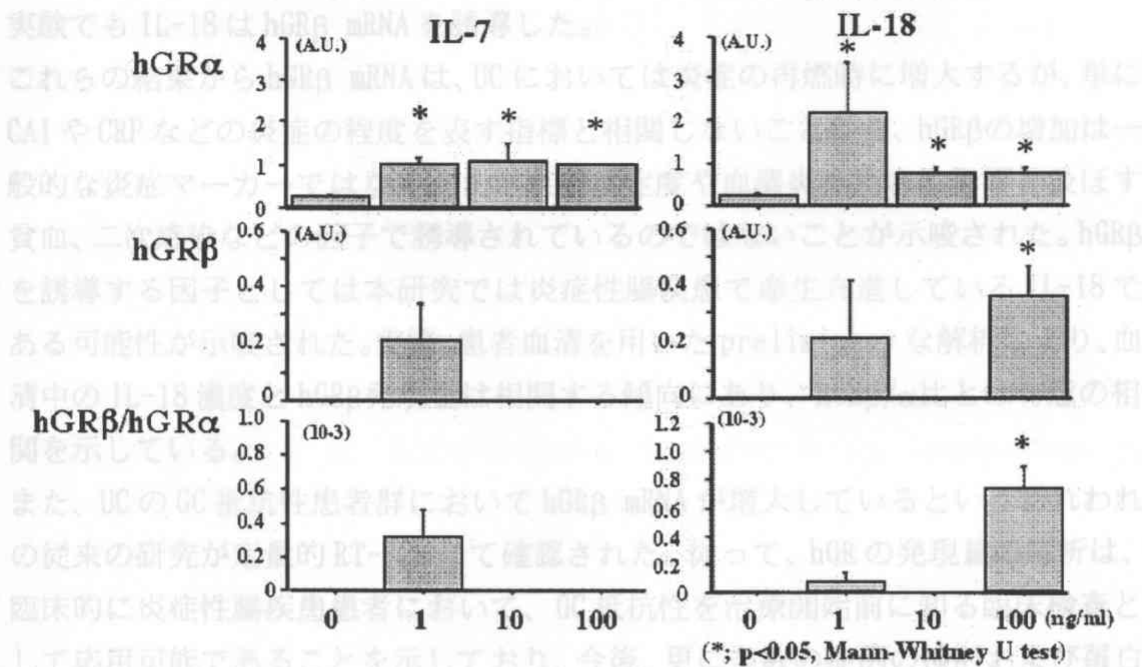


Figure 6

考按

本研究における解析の結果、以下の点が明らかになった。

- 1) hGRβ mRNA の発現量は活動性 UC 患者群において非活動性 UC 患者群および健常対照群よりも有意に高値であった。
- 2) UC 患者において末梢血単核球の hGRβ mRNA の発現量および hGRβ/α比は CAI および CRP 値と有意の相関を示さなかった。
- 3) UC 症例において hGRβ mRNA 発現量、および hGRβ/α比は GC 抵抗性群では感受性群に比べて有意に高値であった。
- 4) UC 症例において経時的に hGRβ mRNA の発現量を比較した。その結果、hGRβ mRNA の発現量および hGRβ/a 比は非再燃患者群に比べ再燃患者群において有意に増大していた。
- 5) hGRβ mRNA の発現量を増加させる因子を解析する目的で、dexamethasone および各種の炎症性サイトカインの影響を in vitro で検討した。その結果、dexamethasone の存在下で 24 時間培養しても T 細胞株 CEM の hGR mRNA の発現量に影響を及ぼさなかった。一方、炎症性腸疾患で産生の亢進が報告されている

IL-18、IL-7 は CEM 細胞の hGR β mRNA の発現を有意に増大させた。PMC を用いた実験でも IL-18 は hGR β mRNA を誘導した。これらの結果から hGR β mRNA は、UC においては炎症の再燃時に増大するが、単に CAI や CRP などの炎症の程度を表す指標と相関しないことから、hGR β の増加は一般的な炎症マーカーではなく、また疾患重症度や血清炎症反応に影響を及ぼす貧血、二次感染などの因子で誘導されているのではないことが示唆された。hGR β を誘導する因子としては本研究では炎症性腸疾患で産生亢進している IL-18 である可能性が示唆された。実際、患者血清を用いた preliminary な解析により、血清中の IL-18 濃度と hGR β 発現量は相関する傾向にあり、hGR β / α 比とは有意の相関を示している。また、UC の GC 抵抗性患者群において hGR β mRNA が増大しているというわれわれの従来の研究が定量的 RT-PCR にて確認された。従って、hGR の発現量の解析は、臨床的に炎症性腸疾患患者において、GC 抵抗性を治療開始前に知る臨床検査として応用可能であることを示しており、今後、更に多数の症例の検討および蛋白レベルのでの検討が必要であると考えられた。

結論

炎症性腸疾患患者末梢血単核球における hGR α 、mRNA の発現量を、最適化した定量 PCR 法を用いて解析した。その結果、ステロイド投与で治療効果の見られない UC 患者で増加している hGR β mRNA は、繰り返す再燃によって増加し、その誘導因子として炎症性サイトカインの一つである IL-18 が重要な役割を担っている可能性を明らかにした。

引用文献

1) Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.

2) Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. (1996) The human glucocorticoid receptor isoform: expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 271, 9550-9559.

3) Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, Kohgo Y. (2000) Expression of Glucocorticoid Receptor b in Lymphocytes of Patients With Glucocorticoid-Resistant Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 118, 859-866.

We have previously reported that in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), the augmented expression of the β isoform of human glucocorticoid receptor (hGR β), as a putative dominant negative regulator of glucocorticoid action, is associated with glucocorticoid (GC) unresponsiveness of UC patients. In this study, we quantified the levels and serial changes of hGR transcripts in UC of IBD patients by a real-time fluorescence monitoring of PCR. As results, relative hGR β mRNA expression was significantly higher in the active stage of UC than in inactive periods of UC or CD patients. Longitudinal analysis revealed that hGR β mRNA expression in UC was increased after the relapse of inflammation, suggesting that the overproduction of cytokines during inflammation may be responsible. In *in vitro* culture experiments of human lymphoid cell (CEM) and human PBMC, IL-3, and IL-12 increased hGR β mRNA expression in these cells but GC itself did not. Through these analyses, it is indicated that the inflammatory cytokines altered the splicing condition of the primary transcript of hGR gene in IBD patients. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Human glucocorticoid receptor β ; Ulcerative colitis; Inflammatory bowel disease; Glucocorticoid-resistant; Quantitative RT-PCR; IL-12

Glucocorticoid (GC) treatment can be effective in patients with active inflammation of ulcerative colitis and it is widely used as the standard therapy for this disease [1]. However, in relapsed cases, the patients are frequently refractory, even when a high dosage of GC is administered. For these refractory patients, we now have some tentative medical treatments such as intravenous cyclosporin [2]. If we could evaluate the responsiveness of patients to GC, prior to its administration, we do not have to wait for the unsuccessful results of the GC treatments and select other therapeutic protocols.

The glucocorticoid receptor (GR) is essential for glucocorticoid action on various effector cells. It has been shown by the cloning of GR cDNA that the human glucocorticoid receptor (hGR) has two isoforms, namely hGR α and hGR β [3]. These two isoforms are produced by alternative splicing of the 5' end of the primary transcript of the hGR gene at exon 9 on chromosome 5, resulting in hGR β that has 15 unique amino acids in its carboxyl terminus instead of the last 50 amino acid sequence found in hGR α . This alteration modulates the functional property of ligand-activated transcription factor of hGR. It is reported that hGR β isoform is inactive as a transcriptional factor, because it does not bind to its natural ligand GC [4]. By co-transfection experiments, it was demonstrated that the expression of hGR β inhibited hGR α -derived transcription signal [5-8]. Therefore, it has been hypothesized that hGR β has a role as a dominant-negative inhibitor of hGR α activity and a relative over-expression of the hGR β isoform may participate in the site- or cell type specific regulation of GC resistance.

Abbreviations: IBD, inflammatory bowel disease; PBMC, peripheral mononuclear cells; hGR α , human glucocorticoid receptor α ; hGR β , human glucocorticoid receptor β ; GC, glucocorticoid; GR, glucocorticoid receptor; GRF, glucocorticoid response factor; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease; CAI, colitis activity index; PDE, glucocorticoid-phosphatidylcholine-defecting gene; HV, healthy donors.

Corresponding author. Fax: +81-166-68-2460.
E-mail address: ashida@nathis.evim.ac.jp (T. Ashida).