

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	藤谷 佳織
<h2>学位論文題目</h2>			
<h3>大腸癌細胞株における IL-18 および IL-18 レセプターの発現について</h3>			
<h4>未公表</h4>			
<h4>研究目的</h4>			
<p>インターロイキン-18(IL-18)は、インターロイキン-12 (IL-12) と共同して T リンパ球からのインターフェロンγ (IFNγ)の産生を刺激する因子として同定された新しいサイトカインである。この IL-18 は、インターロイキン-1β (IL-1β)とアミノ酸配列上の類似性を有しており、IL-1 と同様不活性型の前駆蛋白(proIL-18)として合成され、interleukin-1β converting enzyme (ICE)によって切断され、活性型の IL-18 となることが知られている¹⁾。消化器系においても、正常腸管上皮細胞や一部の大腸癌組織において mRNA の発現や免疫染色反応性が認められると報告されているがその生理的意義は不明である²⁾。</p> <p>一方、IL-18 のレセプター分子は、$\alpha\beta$ のヘテロダイマー構造を示すことが報告されている。またこの IL-18R にリガンドである IL-18 が結合すると、MyD88(myeloid differentiation primary response gene) を介して転写因子 NF-κB 分子の活性化がおこることが報告されている³⁾。IL-18R は、活性化を受けた T リンパ球の表面上に発現している他、皮膚のケラチノサイトや血管内皮細胞にも発現が認められる。しかし、腸管上皮細胞における解析は行われていなかった。</p> <p>本研究において我々は、いくつかの培養大腸癌由来細胞株を用いて解析を行い、これらの細胞のいくつかは活性型 IL-18 および IL-18R を発現していること、IL-18R を発現している細胞株では、培養液に添加した IL-18 が抗 apoptosis 作用を発揮することを見いだした。</p>			
<h4>材料および方法</h4>			
<p>1. 細胞株 大腸癌由来培養細胞株である ATCC 由来 SK-CO1, LS180, HT-29, SW480, Colo320DM, T-84 細胞を用いた。対照としてヒト末梢血単核球 (PBMC) および T 細胞株である Jurkat, CEM を用いた。</p> <p>2. IL-18, IL-18R mRNA 発現の解析 IL-18, および IL-18 レセプター複合体を形成する IL-18Rα鎖, IL-18Rβ鎖, MyD88mRNA の発現は、特異的プライマーを用いた RT-PCR 法で解析した</p> <p>3. IL-18 および IL-18Rα鎖蛋白の免疫染色法による検出 IL-18, IL-18Rα 鎖蛋白の発現を、各々に対する抗体を用いて染色し検討した。IL-18 の染色には、固定後細胞膜を抗体透過性としたのち、goat anti-human IL-18 polyclonal antibody (C-18), IL-18Rα鎖の染色には anti-human IL-18R monoclonal antibody を用いた。</p> <p>4. IL-18 蛋白の Western blot による検出 大腸癌細胞株における pro IL-18 および IL-18 蛋白発現を、可溶性細胞蛋白の Western blot によって解析した。</p> <p>5. 大腸癌細胞の増殖能の解析 大腸癌細胞株の増殖能は MTT assay で測定した。</p>			

結果

大腸癌細胞株における IL-18 mRNA, 蛋白の発現

RT-PCR 法で解析した IL-18 mRNA の発現は、検索したすべての細胞株に認められた。次に、免疫染色法にてこれらの細胞における IL-18 蛋白の発現を検討した。polyclonal anti-IL-18 抗体反応性は、HT-29, T-84, Colo320DM 細胞では明瞭に、SW480 では弱く認められた。この免疫反応性は、抗体を免疫源の合成ペプチドで吸収するといずれの細胞においてもほぼ消失していたことから、免疫反応性は IL-18 に特異的であることが考えられた。

次に HT-29, T-84 細胞を用いて、細胞内の IL-18 を Western blot で解析した。可溶性細胞蛋白の C-18 抗体反応性は、約 23 kDa, 18 kDa のそれぞれ pro IL-18, IL-18 に相当する分子量のバンドとして検出された。これらのバンドは、C-18 抗体を免疫源のペプチドで吸収すると著明に減弱した。これらの細胞では活性型 IL-18 の産生が生じていることを示している。

大腸癌細胞株における IL-18 receptor mRNA, 蛋白の発現

IL-18R α 鎖の発現を、RT-PCR, および免疫染色法で検討した。HT-29, Colo320DM, SW480 細胞において、IL-18R α 鎖 mRNA の発現が認められた。次に anti-IL-18R α monoclonal 抗体で、これらの細胞を免疫染色した。この抗体の免疫反応性は、HT-29, Colo320DM 細胞に認められ、IL-18R α 鎖 mRNA の発現のない T-84 細胞においては検出されなかった。

IL-18R β 鎖および細胞内のシグナル伝達分子 MyD88 の発現についても RT-PCR で検討をおこなった。IL-18R β 鎖 mRNA は、IL-18R α 鎖 mRNA を発現している HT-29, Colo320DM, SW480 細胞において認められた。一方、MyD88 mRNA もこれらのすべての細胞に認められた。これらの結果から、大腸癌細胞株のうち HT-29, SW480, Colo320DM 細胞は、T 細胞と同様に機能的な IL-18R 分子群を発現していることが明らかとなった。

IL-18 receptor 発現大腸癌細胞株における IL-18 の作用

培養液に種々の濃度の rh-IL-18 を、IL-18R を発現する細胞に添加し、細胞増殖に及ぼす影響を MTT assay で検討した。また、これらの細胞が産生している IL-18 を細胞外で捕捉し中和する IL-18R α -Fc キメラ蛋白を種々の濃度で添加し、同様に検討した。rh-IL-18, および IL-18R α -Fc キメラ蛋白は、これらの細胞の増殖に有意な影響を及ぼさなかった。

一方、HT-29 や SW480 細胞は、IFN γ で処理すると種々の apoptosis 誘導因子に対する耐性が消失することが知られている。この条件下で抗 Fas 抗体誘導 apoptosis に対して、IL-18 が影響を及ぼすか否かを検討した。HT-29 および SW480 細胞を IFN γ で全処理し、その後、anti-Fas monoclonal 抗体を添加すると、以後 48 時間で SW480 で約 50%, HT-29 で約 75%の増殖活性が失われた。しかし、IFN γ と同時に、種々の濃度の IL-18 を添加すると、濃度依存的に SW480, HT-29 細胞の増殖抑制が回復した。この程度は、SW480, HT-29 とも最大で約 30%であったが、統計学的に有意な抑制であった。

考案

IL-18 は主に免疫担当細胞によって産生され、T 細胞における Th-1 type のサイトカイン産生を調節する作用が、主な生理作用であると考えられている。この IL-18 の産生は、副腎皮質の神経内分泌細胞や皮膚のケラチノサイト、骨芽細胞にもみられ、免疫担当細胞以外の細胞系とリンパ球との情報伝達に用いられていることが示唆されてきた。腸管においても、正常大腸粘膜における IL-18 抗体反応性が認められることから、IL-18 が腸管粘膜上皮細胞と粘膜内リンパ球との間の刺激伝達に関与している可能性が考えられてきた。本研究において筆者らは、大腸癌細胞株においては、pro IL-18 の産生とプロセッシングが行われており、活性型の IL-18 が分泌されている可能性を示した。また株化大腸癌細胞のすべてに IL-18 mRNA の発現が認められたことは、IL-18 の産生が腸管上皮細胞における基本的性質である可能性を示唆している。

我々は大腸癌細胞における IL-18 receptor 分子の発現を検討し、IL-18R α 鎖、IL-18R β 鎖ともに発現がみられる 3 種の細胞を見いだした。これらの細胞では、IL-18R の細胞内シグナル伝達に関与するアダプタ

一分子である MyD88 も発現が認められることから、機能的なレセプター分子であることが考えられた。

IL-18R はリガンドである IL-18 が結合すると、NF- κ B の活性化がおこることが報告されている。これは細胞増殖を刺激する系であることから、我々は IL-18 の autocrine による自己増殖刺激活性を想定し IL-18 の添加実験を行ったが、増殖能には有意な影響を及ぼさなかった。この結果は、既に十分な増殖刺激経路の活性化がおこっている状況の株化細胞では、IL-18R のシグナルが増殖速度に影響を及ぼすほど大きくないことを示していると考えられた。これは、レセプターの発現分子数が少ないことを示しているかもしれない。

そこで、IL-18R を発現している HT-29 細胞、SW480 細胞が、IFN γ で前処理すると Fas を介した apoptosis 感受性になることから、IL-18 に apoptosis を抑制する活性があるか否かについて検討を行った。実際、添加した rh-IL-18 は、濃度依存的に apoptosis を有意に抑制した。この結果から、apoptosis に陥ろうとしている細胞では、IL-18 の結合によるシグナル伝達が有意に作用すると考えられる。

これらの結果から、IL-18 がこれらの非免疫担当細胞系の turn over に関与する可能性が考えられる。マクロファージ以外の細胞からも分泌され、その産生細胞が生体内で広範な分布を示す IL-18 は、IFN γ 誘導活性以外にも、細胞の増殖にかかわる生理活性を有している、多機能なサイトカインである可能性が考えられた。

結論

大腸癌細胞株では pro IL-18 の合成と活性型 IL-18 へのプロセッシングが行われていることを明らかにした。さらに、この IL-18 は、IL-18 receptor 複合体を発現している大腸癌細胞株においては、抗 apoptosis 活性を有することを示した。

引用文献

- 1) Butler D, et al (1997): Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. Nature 386: 619-623.
- 2) Pages F, et.al (1999): Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: consequences for tumor immune surveillance. Int J Cancer. 84: 326-30.
- 3) Born TL, et.al (1998): Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. J Biol Chem. 273: 29445-50.

参考論文

- 1) 藤谷幹浩ほか 11 名と共著 (2001): sm massive 以深に浸潤した 10mm 以下の大腸癌の X 線診断
胃と腸 第 36 巻第 11 号 1371-1379
- 2) 斉藤裕輔ほか 4 名と共著 (2000): 薬剤性腸炎の起因薬剤と病態・発生機序
胃と腸 第 35 巻第 9 号 1117-1124

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	藤谷佳織
審査委員長 高 後 裕 ㊞ 審査委員 飯 塚 一 ㊞ 審査委員 原 淵 保 明 ㊞			
学 位 論 文 題 目 大腸癌細胞株における IL-18 および IL-18 レセプターの発現について			
インターロイキン18 (IL-18) は、インターロイキン12 (IL-12) と共同してTリンパ球からのインターフェロンγ (IFNγ) の産生を刺激する因子として同定された新しいサイトカインである。この IL-18 は、消化器系においても、正常腸管上皮細胞や一部の大腸癌組織において mRNA の発現や免疫染色反応性が認められると報告されているがその生理的意義は不明であった。また IL-18 のレセプター分子は、活性化を受けた T リンパ球の表面上に発現しているが、腸管上皮細胞における解析は行われていなかった。			

本研究においては数種の大腸癌培養細胞株を用いて IL-18 およびそのレセプター分子の発現を検討し、さらに IL-18 の大腸癌細胞における apoptosis 抑制作用を MTT 法を用いて解析している。

本研究においては、以下の点が明らかにされた。

(1) IL-18 mRNA, 蛋白の発現は、大腸癌由来培養細胞株である ATCC 由来 SK-CO1, LS180, HT-29, SW480, Colo320DM, T-84 細胞に認められた。次に細胞内の IL-18 を Western blot で解析すると約 23 kDa, 18 kDa のそれぞれ pro IL-18, IL-18 に相当する分子量のバンドを検出した。

(2) HT-29, Colo320DM, SW480 細胞において、IL-18R・鎖 mRNA および蛋白の発現が認められた。IL-18R・鎖および細胞内のシグナル伝達分子 MyD88 の発現についても検討を行った結果これらの細胞において発現が認められた。

(3) HT-29 および SW480 細胞 IFN- γ と同時に、種々の濃度の IL-18 を添加すると、濃度依存的に SW480, HT-29 細胞の増殖抑制が回復した。この程度は、SW480, HT-29 とも最大で約 30%であったが、統計学的に有意な抑制であった。

これらの所見から、大腸癌細胞株では活性型 IL-18 の産生が行われていることを明らかにした。さらに、この IL-18 は、IL-18 receptor を発現している大腸癌細胞株においては、抗 apoptosis 活性を有することを示した。本研究は、IL-18 の大腸癌細胞における産生とその生理活性をはじめて明らかにした論文で、高く評価されるべき研究である。

論文審査後、同人に対して諮問審査を行い、その結果、本論文の内容は学位（博士）論文として価値あるものと認め、諮問審査の内容からも審査に合格と判定した。