

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	馬 艶菊
-------	----	----	------

学位論文題目

Oxazolone-induced over-expression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model

(Oxazoloneによって誘導される炎症性腸疾患マウスモデルの大腸上皮細胞でのFAKの過剰発現)

共著者名

仙葉 慎吾、前本 篤男、竹内 昌之、亀下 勇、石田 敦彦、加藤 早苗、
加藤 剛志、劉 曇鵬、谷口 隆信

掲載雑誌

FEBS Letters 584巻3949頁～3954頁
平成22年9月24日

研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) は、潰瘍性大腸炎とクローン病の二つを代表的な疾患とする慢性の疾患である。IBDは原因不明の難治性疾患であるが、腸における免疫応答異常が発病に関与する要因の一つとして考えられている。腸における炎症制御には、免疫細胞によるものの他に、腸の上皮細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。即ち、腸の上皮細胞が整然と配列して、相互に接着し、強固な物理的バリアを形成することで、腸内の細菌や抗原が腸壁内に侵入してくることを防いでいる。

チロシンキナーゼは、細胞の分化、増殖、接着、免疫反応などに関与していると考えられており、我々はチロシンキナーゼに対するユニークなモノクローナル抗体、YK34を開発している⁽¹⁾。この抗体は、様々なチロシンキナーゼでアミノ酸配列が良く保存されている領域、ドメイン6Bを抗原とする抗体であり、様々なチロシンキナーゼを網羅的に検出できる。

我々は、腸上皮細胞によるバリア機能において、チロシンキナーゼが重要な役割を担っていると仮定した。そこで、oxazoloneの注腸によって腸に炎症が誘導される炎症性腸疾患マウスモデル⁽²⁾を用いて、腸上皮細胞におけるチロシンキナーゼの発現量変化をYK34を用いたWestern blotで調べた。さらに、発現量の変化したチロシンキナーゼを同定し、このチロシンキナーゼが上皮バリア機能を維持するためにどのような役割を果たしているかを検討した。

材 料 ・ 方 法

1 材料

(1) 実験動物

実験には成雄のBALB/cマウス（体重20-25g）を用いた。

(2) 抗体

YK34抗体は報告⁽¹⁾のように作製した。Focal adhesion kinase (FAK) 抗体はAbcam社から入手した。

2 実験方法

(1) 潰瘍性大腸炎マウスモデルの作成

マウスに100 μ lの1% oxazoloneを注腸し、その24時間後に大腸を摘出した。大腸の炎症の程度を以下のclinical scoreに従って評価した。0 - no inflammation; 1 - swelling or redness; 2 - swelling and redness; 3 - one or two ulcers; 4 - more than two ulcers or one large ulcer; 5 - mild necrosis; 6 - severe necrosis。

(2) 腸上皮細胞抽出液の作製

摘出した大腸から腸上皮細胞を採取し、lysis bufferでタンパク質を抽出後、遠心上清を抽出液として用いた。

(3) 二次元電気泳動

腸上皮細胞抽出液をアガロースゲルを用いた等電点電気泳動 (ATTO、AgarGEL、pH 3-8) で分離した後、SDS-PAGEでさらに展開した。

(4) Western blot

電気泳動で分離したタンパク質をPVDF膜上に転写し、2% skim milkでブロッキング後、1次抗体と反応させた。結合した抗体は化学発光法で検出した。

(5) 免疫染色

マウス大腸の組織切片を作成して、FAKの抗体で免疫染色し、コントロールとoxazoloneで炎症を誘導したマウスを比較した。

3 統計学的処理

2群間の比較には、Student's t検定を行った。危険率5%未満を統計学的有意とした。炎症の程度とFAKの発現量の相関は、ピアソンの積率相関係数で評価した。

成 績

1 潰瘍性大腸炎モデルの作成

Oxazoloneを注腸した24時間後には下痢や血便、体重減少が見られた。剖検において、腸管の短縮や腸管壁の肥厚が見られ、腸に炎症が生じたことが確認された。また、炎症の程度をclinical scoreで評価したところ、clinical scoreが0から1のマウスが30%、2から4が40%、5から6が30%であった。

2 腸上皮細胞におけるチロシンキナーゼ発現量の変化

腸上皮細胞抽出液を二次元電気泳動で分離後、YK34を用いたWestern blotを行ったところ、炎症誘導により、等電点が6.0から6.5、分子量が約120kD付近にシグナルの増強するスポットを認めた。このスポットに含まれるチロシンキナーゼを同定するため、TagIdentという検索プログラムでデータベース検索を行ったところ、候補となるチロシンキナーゼの一つとして、focal adhesion kinase (FAK) が同定された。

3 腸上皮細胞でのFAKの発現の確認

腸上皮細胞抽出液と抗FAK抗体を用いたWestern blotでFAKの発現量の変化を調べたところ、炎症の誘導によってFAKの発現が約1.68倍上昇することが確認された。

4 炎症の程度とFAKの発現量の関係

各々のマウスの大腸の炎症の程度とFAKの発現量を比較すると、炎症が増強するとFAKの発現が上昇する傾向が観られた。そこで、clinical scoreとFAKの発現量の相関を検討したところ、ピアソンの積率相関係数は+0.681となり、緩やかではあるが、正の相関があることが示された。

5 大腸組織におけるFAKの発現

FAKは大腸の粘膜固有層ではなく、主に腸上皮細胞に限局して発現していた。Oxazoloneによって炎症を誘導すると、腸上皮の連続性が失われ、はがれかけた上皮細胞においてFAKの発現が増強する傾向が認められた。

考 案

Oxazoloneをマウスに注腸投与することにより、T-helper type2(Th2)優位な炎症を大腸に誘導することができ、これは潰瘍性大腸炎のモデルとされている⁽²⁾。このモデルマウスを用いた解析の結果、腸に炎症が生じると腸上皮細胞においてFAKの発現量が上昇することが明らかになった。Clinical scoreとFAKの発現量に正の相関があったことから、炎症発生にFAKが関与していることが示唆される。また、免疫組織学的検討からFAKの発現は腸上皮に限局していることも確認された。これらの結果から、FAKは免疫担当細胞ではなく、腸上皮細胞で何らかの働きを担っているものと推察された。

本研究では、炎症発生に伴う腸上皮細胞でのFAKの発現上昇のメカニズムは明らかではない。しかし、本研究で用いたモデルマウスでは炎症を誘導することによりIL-4やIL-13などのサイトカインや、TGF- β などの成長因子の発現が上昇することが知られている。このことから、炎症に伴って免疫細胞から分泌されたこれらの因子が腸上皮細胞に作用し、FAKの発現を上昇させた可能性が考えられる。また、FAKのプロモーター領域にはNF- κ Bの結合領域があることから、腸上皮細胞のToll like receptorへの刺激からNF- κ Bの活性化が生じ、その結果FAKの発現が上昇するというメカニズムも考えられる。

FAKは非受容体型チロシンキナーゼの一つとして、細胞の運動と増殖を促進することが知られている。しかし、腸上皮細胞でのFAKの発現上昇が上皮バリアの崩壊を引き起こすことで潰瘍の形成に関与しているのか、それとも崩壊した上皮バリアを再形成することで潰瘍の治癒に関与しているのかは不明である。胃潰瘍の研究において、潰瘍辺縁部の粘膜上皮でFAKの発現が上昇していることが報告されており、FAKは潰瘍の修復に関与している可能性が示唆されている⁽³⁾。したがって、本研究で示されたFAKの発現上昇は潰瘍の修復過程の中で機能している可能性が考えられる。今後、大腸がん由来のCaco-2細胞を用いて、Transwell上にCaco-2細胞を単層培養することによって腸上皮バリアのモデルを作り、上皮バリアの崩壊、再形成におけるFAKの関与について検討し、腸上皮によるバリア機能にFAKがどのような働きを担っているかを明らかにして行きたいと考えている。

結 論




- 1、Oxazoloneで腸に炎症を惹起することにより、腸上皮細胞において、FAKの発現量が上昇した。
- 2、炎症の程度とFAKの発現量には、正の相関が見られた。
- 3、FAKの発現は腸上皮に局在していた。

以上の結果から、FAKは腸上皮のバリア機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

引 用 文 献

1. Sugiyama Y, Sueyoshi N, Shigeri Y, Tatsu Y, Yumoto N, Ishida A, Taniguchi T, Kameshita I. Generation and application of a monoclonal antibody that detects a wide variety of protein tyrosine kinases. *Anal Biochem.* 2005; 347(1): 112-20.
2. Kojima R, Kuroda S, Ohkishi T, Nakamaru K, Hatakeyama S. Oxazolone-induced colitis in BALB/C mice: a new method to evaluate the efficacy of therapeutic agents for ulcerative colitis. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96(3): 307-13.
3. Walsh MF, Ampasala DR, Hatfield J, Vander Heide R, Suer S, Rishi AK, Basson MD. Transforming growth factor-beta stimulates intestinal epithelial focal adhesion kinase synthesis via Smad- and p38-dependent mechanisms. *Am J Pathol.* 2008; 173(2): 385-99.

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	馬 艶菊
<p>審査委員長 若宮伸隆 </p> <p>審査委員 高橋 正 </p> <p>審査委員 山崎文隆 </p>			
学 位 論 文 題 目			
<p>Oxazolone-induced over-expression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model (Oxazolone によって誘導される炎症性腸疾患マウスモデルの大腸上皮細胞での FAK の過剰発現)</p>			
<p>炎症性腸疾患 (IBD) は、潰瘍性大腸炎とクローン病を代表とする慢性の疾患である。IBD は、原因不明の疾患であるが、腸における免疫応答異常が発病の要因の一つと考えられている。腸の炎症の制御には、腸上皮のバリア機能が重要な役目を果たしていることが知られている。申請者は、腸上皮細胞における、腸のバリア機能にチロシンキナーゼが重要な役割を担っていると仮説を立て、本研究を行った。</p> <p>実験方法としては、Oxazolone の注腸による炎症性腸疾患マウスモデルを作成し、腸上皮細胞におけるチロシンキナーゼの発現量を、チロシンキナーゼ特異的抗体を用いて、炎症に関与するキナーゼを同定しようとした。次に、発見したキナーゼが上皮バリア機能を介して IBD 病態に関与するメカニズムを検証した。</p> <p>結果としては、既報の如く、Oxazolone 投与により、マウスに下血、血便、体重減少を伴う、潰瘍性大腸炎実験モデルが作成できた。肉眼的には、腸管の短縮や腸官壁の肥厚が観察され、IBD 様の変化が認められた。さらに、炎症の clinical score としては、0-1 が 30%、2-4 が 40%、5-6 が 30%であった。</p> <p>つぎに、腸上皮細胞を用いて、lysis buffer で抽出後、2次元電気泳動を行い、メンブレンに転写後、YK34 抗体を用いて Western blot を行った。Oxazolone 投与</p>			

マウスと非投与マウスのチロシンキナーゼの発現量の比較では、等電点 6.3 で 120KDa の分子量を呈するタンパク質の増強を観察した。TagIdent というプログラムを用いてデータベース検索を行ったところ、この位置に一致するチロシンキナーゼ候補として、focal adhesion kinase (FAK) を同定した。さらに、上記腸上皮細胞における、抗 FAK 抗体を用いた Western blot により、Oxazolone 投与により FAK が 1.7 倍増加することを認めた。さらに、Oxazolone 投与マウスにおける組織免疫化学染色により、腸上皮細胞における FAK の発現増強と腸上皮の連続性や組織損傷を観察した。また、同時に腸の clinical score と FAK の発現の相関性は $r=0.681$ と緩やかな正の相関性を認めた。次に、Caco-2 細胞を用いて、Ethanol 処理によるバリア損傷モデルで、バリア損傷からの回復時に FAK の活性化が何らかの役割を有すること、さらに、バリアの回復に伴って FAK の自己リン酸化がおこることを認めた。蛍光免疫染色により、Caco-2 細胞では正常状態やバリア損傷回復期には、チロシンリン酸化タンパク質や FAK が細胞接着部に集積するが、FAK のリン酸化阻害処理を行うと、FAK の局在が変化することを明らかにした。

これらの実験事実から、①マウス腸炎モデルでは Oxazolone 投与による炎症性腸炎の損傷程度と緩やかな正の相関性をもって FAK の発現が亢進すること、②腸上皮細胞バリア損傷実験系ではバリア回復期に FAK がリン酸化されてその活性が亢進すること、さらに細胞接着部局在の FAK が重要な役割を果たしていることを、明らかにした。

本研究は、IBD 病態解析研究にチロシンキナーゼの視点を持ち込んだ、初めの研究であり、IBD による損傷回復や損傷回避の新しい薬剤候補の探索に重要な知見を示したものであり、臨床医学的に大変意義があると考えられる。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。