

学位論文

抗CD3抗体誘発小腸障害マウスにおけるRNA結合蛋白
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1による
腸管上皮の細胞死制御に関する研究

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

安藤 勝祥

論著の種類 学位論文

表題 抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスにおける RNA 結合蛋白 **heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1** による腸管上皮の細胞死制御に関する研究

ランニングタイトル
腸炎における hnRNP A1 による細胞死制御

著者 安藤 勝祥

所属機関 旭川医科大学内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

原稿総頁数 26

図及び表の総数 8

連絡者氏名宛先 安藤 勝祥
〒078-8510 北海道旭川市緑ヶ丘東 2 条 1 丁目 1-1

電話番号 0166-68-2462

FAX 番号 0166-68-2469

電子メールアドレス k-ando@asahikawa-med.ac.jp

学位論文

抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスにおける RNA 結合蛋白 **heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1** による腸管上皮の細胞死制御に関する研究

旭川医科大学内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

安藤 勝祥

主任：高後 裕教授

緒言

潰瘍性大腸炎(Ulcerative colitis; UC)やクローン病(Crohn's disease; CD)に代表される炎症性腸疾患(inflammatory bowel diseases; IBD)は、原因不明の慢性、再発性の腸炎であり、根治的治療法は確立されていない。その病態には、腸管免疫の異常や腸内細菌叢の変化に加え、アポトーシスの異常亢進が関与するとされる[1][2]。アポトーシスはプログラミングされた細胞死であり、正常腸管上皮では陰窩底部で増殖した上皮細胞が管腔側へと向かいアポトーシスによって脱落することで腸管上皮の恒常性が維持されている[3]。一方、IBD ではアポトーシスの異常亢進が認められ[1][2]、その機序として腸管局所の T 細胞の異常活性化[4]-[6]、腫瘍壊死因子- α [7]、インターフェロン- γ [8]、Fas/Fas-リガンド[9][10]などの産生亢進が明らかにされている。腸管上皮の過剰なアポトーシスは腸管における潰瘍形成の一因とされており[11][12]、T 細胞異常活性化によるアポトーシスの亢進は IBD における腸管障害の形成・増悪に深く関与していると考えられる。

一方、様々な RNA 結合蛋白が特定の mRNA やマイクロ RNA と結合して蛋白翻訳を制御していることが知られている[13]。heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)ファミリーは、30 種類の RNA 結合蛋白から構成され、様々な臓器の細胞核内で RNA の成熟に関与し、細胞質で mRNA と結合しその翻訳を調節している[14][15]。関節リウマチや SLE などの自己免疫疾患では hnRNPs に対する自己抗体が認められ、

病態への関与が示唆されている[16]. 近年, UC 患者において RNA 結合蛋白の一種である polypyrimidine tract-binding protein (PTB)-binding 2(RAVER2)の遺伝子多型が報告された[17]. また, Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (Nod2) の変異により RNA 結合蛋白 hnRNP A1 のインターロイキン-10 プロモーター領域への結合が阻害され, インターロイキン-10 産生が抑制されることで腸炎が増悪する可能性が示されている[18]. 我々は, この hnRNP A1 がマイクロ RNA-18a との直接結合を契機に分解が促進され, 大腸癌細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした[19]. すなわち, hnRNP A1 は腸管上皮のアポトーシス誘導を制御する重要な分子であると推測されるが, 腸管炎症における作用は不明である.

本研究は, T 細胞の異常活性化によるアポトーシス誘導モデルである抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウス[20][21]を用いて, RNA 結合蛋白である hnRNP A1 の腸管炎症における役割を解明することを目的とした.

材料と方法

1. マウス

6 週齢 C57Bl6/J(Sanlyo Labo Service, Tokyo, Japan)を用いた.

2. 抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスの作成

6 週齢 C57Bl6/J マウスにハムスター抗 CD3e 抗体(145-2C11, Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, US) 12.5 μ g/マウスをリン酸緩衝生理食塩水(PBS) 200 μ l に希釈後、マウス腹腔内へ注入した。

3. 遺伝子導入の方法

ハムスター抗 CD3e 抗体を腹腔内注入する 24 時間前に, HVJ Envelope VECTOR KIT (石原産業, 大阪, 日本) を用いて hnRNP A1 の siRNA (SignalSilence® hnRNP A1 siRNA I #7668, Cell Signaling Technology, Denvers, MA, US)およびスクランブル RNA(5'-aucgcgcgauaguacgua-3')を腹腔内注入した。

4. 腸管浮腫の検討方法

C57Bl6/J マウス(6 週齢)に抗 CD3 抗体を腹腔内注入した 24 時間後に, 近位空腸を切除し, 切除した腸管の重量(mg)と長さ(cm)を計測し, 腸管 1cm あたりの腸管重量(mg/cm)を算出した。これを腸管浮腫の程度の指標として用いた。

5. Extra vivo intestinal loop study

C57Bl6/J マウス(6 週齢)に抗 CD3 抗体を腹腔内注入した 24 時間後に, 近位空腸を 6cm 切除し, 切除腸管内に RPMI 1640 を 1ml ずつ注入し, 両端を糸で結紮した。細胞培養ディッシュ(Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)内に, 上記で作成した腸管ループを 25ml の RPMI 1640 で満たし, 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C 2 時間インキュベーションした。結紮した空腸ループ内それぞれに 1mCi/ml [³H]-マンニトールを注入して 3 ml/well の RPMI で満たし

た 6 well ディッシュ中でインキュベートし、腸管外のメディウム 100 μ l 中のアイソトープ活性 (cpm 値) を Beckman シンチレーションスペクトルメーターで計測した。20 分・35 分後のアイソトープ活性から 5 分後のアイソトープ活性を引くことで、15 分間・30 分間の露出したマンニトール量とした。

6. TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-end Labeling)染色

抗 CD3 抗体腹腔内注入後の C57Bl/6J マウスより切除した空腸組織を 10%緩衝ホルマリンで固定後、パラフィンで包埋し、4 μ m の切片を作成した。これをキシレン・エタノールで脱パラフィン処理した後、プロテイナーゼ K(20 μ g/ml, Tris-HCl 10mM, pH 7.4)で 37 $^{\circ}$ C 30 分インキュベートした。PBS で 2 回洗浄後、In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red(Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA)を用い、37 $^{\circ}$ C 60 分間反応を行い、PBS で 3 回洗浄後、DAPI(Lonza)を 5 分間加え、核染を行い、anti-fade mounting medium を加えた後、蛍光顕微鏡 (KEYENCE corporation)で観察した。200 倍の視野でランダムに 5 視野を観察し、絨毛・陰窩の TUNEL 陽性細胞数をカウントした。絨毛・陰窩それぞれ 1 視野あたりの TUNEL 陽性細胞数 (平均 \pm 標準偏差) を検討した。

7. Western Blotting

抗 CD3 抗体腹腔内注後の C57Bl/6J マウスより空腸を摘出し、空腸粘膜を回収して Mammalian Cell Extraction Kit (BioVision, Mountain View, CA)を用い可

溶化した。吸光光度計を用いてこの可溶化物内の蛋白質濃度を測定して、5-30 μ g の濃度になるように調整し、Laemmli を加え沸騰させた。これを 12.5% sodium dodecyl sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)にて泳動し、バッファー(25 mM Tris, pH 8.8, 192 mM グリシン, 20% (vol/vol)メタノール)中でニトロセルロース膜に転写した。その後、1% (wt/vol) bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を添加した 0.05% (vol/vol) Tween 20 (T-PBS) を用いて、ニトロセルロース膜の非特異的反応をブロックし、各種一次抗体 [抗 hnRNP A1 単クローン抗体(abnova), 抗 NF- κ B 単クローン抗体(Cell signaling technology), 抗 PARP(nuclear poly(ADP-ribose) polymerase)多クローン抗体(Cell signaling technology), 抗 Fas-リガンド多クローン抗体(Novus Biological), 抗 Fas 多クローン抗体(Novus Biological), 抗トレフォイル因子 2(Tff2)多クローン抗体(Protein tech), 抗アクチン単クローン抗体(BD transduction laboratories, Lexington, KY)]と 4°Cで 16 時間反応させた。T-PBS で 3 回洗浄後、それぞれの特異的二次抗体[horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (R&D systems, Minneapolis, MN)]で 1 時間反応させ、Super-Signal West Pico (Thermo science)を用いて発色させた。検出したバンドの強度を画像解析ソフト(ImageJ)にて数値化し、アクチンの発現量を内部コントロールとして、それぞれの蛋白発現量を標準化した。

8. Real-time PCR

マウス腸管上皮からRNeasy mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いてRNAを抽出した. hnRNP A1 mRNAの発現については, High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いてcDNAを作製し, hnRNP A1 mRNA特異的プライマー(sense, 5'-tggaagcaatthttggaggtg-3', anti-sense, 5'-ggtccgtggttagcaaagt -3')を用いてreal-time PCRにて検出した.

炎症関連サイトカインの発現については, 腫瘍壊死因子- α (TaqMan® Gene Expression Assays, Life Technology, Mm99999068_m1), インターロイキン- γ (TaqMan® Gene Expression Assays, Life Technology, Mm9999907_m1), インターロイキン- 1β (TaqMan® Gene Expression Assays, Life Technology, Mm01336189_m1), インターロイキン-4(sense, 5'-ggcattttgaaggaggtcaca-3', antisense, 5'-aggacgtttggcacatcca- 3', probe, 5'-agaagggacgcatgcacggag - 3'), インターロイキン-6(sense, 5'-aagccagagctgtgcagatgagta- 3', antisense, 5'-tgtcctgcagccactggttc-3'), インターロイキン-10 (sense,5'-gaccagctggacaacatactgctaa-3', antisense, 5'-gataaggcttgcaaccaagtaa-3'), インターロイキン-12(sense,

5'-tgtcttagccagtcgccgaaacc-3', antisense, 5'-tcttcatgatcgatgtcttcagcag-3'), インターロイキン17a(sense, 5'-acgcgcaaacaatgagtccag-3', antisense, 5'-aggctcagcagcagcaacag-3')の特異的プライマーを用いてreal-time PCRにて検出した. 18S rRNAの発現量を内部コントロールとして標準化した.

9. cDNA アレイ

hnRNP A1 の siRNA もしくはスクランブル RNA 腹腔内注入 24 時間後のマウス腹腔内に抗 CD3 抗体を注入し, 24 時間経過後に空腸を切除し, 空腸粘膜を回収し, トライゾールにて RNA を抽出した. 両マウスの mRNA 発現のプロファイルを 3D-Gene[®] 全遺伝子型 DNA チップ(Toray Industry, Inc, Tokyo, Japan) を用いて解析し, 2 倍以上の変化があったものを有意な変化とした.

10. 統計学的解析

統計学的処理には t 検定を用いた. $p < 0.05$ をもって統計学的有意差ありと判断した.

結果

1. 抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスにおける hnRNP A1 の発現変化

本モデルでは, ハムスター抗 CD3e 抗体投与直後から絨毛のアポトーシスが認められ, 3 時間後にピークに達し, 粘膜固有層の浮腫と絨毛の短縮が認められた. ま

た、24 時間後には陰窩のアポトーシスがピークに達し、粘膜固有層の肥厚が認められ、その後は軽快していった(図 1a,b). そこで、ハムスター抗 CD3e 抗体 $12.5 \mu\text{g}$ /マウスを腹腔内注入したのち、3 時間後、8 時間後、24 時間後にそれぞれマウスより空腸粘膜を回収し、タンパク・RNA を抽出し、hnRNP A1 の経時的発現変化を Western Blotting, Real-time PCR にて検討した. hnRNP A1 タンパク発現は 24 時間後において有意に増加していた(図 1c). RT-PCR では注入前 の hnRNP A1 発現量を 1 として比較 (平均±標準偏差) したところ、3 時間後で 1.11 ± 0.36 , 8 時間後で 2.32 ± 1.01 , 24 時間後で 2.44 ± 1.51 であり、8, 24 時間後において有意に増加していた ($p < 0.05$). 以下の実験では、24 時間後の小腸サンプルを用いた.

2. hnRNP A1 発現抑制による抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスの腸管障害の変化

抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスにおける hnRNP A1 の作用を解明する目的で、C57Bl6/J(6 週齢)マウスに対し、HVJ Envelope VECTOR KIT を用いて hnRNP A1 の siRNA を腹腔内注入し、hnRNP A1 発現抑制モデルマウスを作製した. 対象群として無処置のコントロールマウス群、スクランブル RNA を腹腔内注入したマウスを用いた. RNA 腹腔内注入 24 時間後に抗 CD3 抗体 $12.5 \mu\text{g}$ /マウスを腹腔内注入し、24 時間後にそれぞれのマウスより空腸粘膜を回収した. 摘出空腸組織のヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色標本を検討したところ、無処置コントロール群

に比較してスクランブル RNA 群で絨毛短縮・腸管浮腫がみられるが、hnRNP A1 発現抑制マウスでは、この絨毛の短縮と絨毛先端の浮腫が著しく増悪していた(図 2). 摘出空腸組織の腸管重量と腸管長を測定し、腸管重量/腸管長比(mg/cm)を比較(平均±標準偏差)したところ、無処置コントロールマウス群で 35.2 ± 4.2 mg/cm, スクランブル RNA 群 44.8 mg/cm であったのに対し、hnRNP A1 発現抑制マウスでは、 53.8 ± 9.8 mg/cm と有意な増加を($p < 0.05$)を認め、腸管浮腫の増悪が示された. また、RI-標識マンニトールを摘出空腸に充填し、15 分後・30 分後の腸管外漏出したマンニトール濃度(cpm)を各群において比較した(平均±標準偏差)ところ、無処置コントロールマウス群でそれぞれ 57 ± 20.5 , 121 ± 30.7 cpm, スクランブル RNA マウス群ではそれぞれ 98 ± 51.4 , 174 ± 82.6 cpm であったが、hnRNP A1 発現抑制マウスではそれぞれ 122 ± 29.2 , 230 ± 49.8 cpm であり、30 分後のマンニトール濃度が両群に比べ有意に増加していたことから($p < 0.05$), 腸管バリア機能の低下が明らかとなった. 以上より、hnRNP A1 発現抑制下において、抗 CD3 抗体誘発小腸障害が増悪することが明らかとなった.

3. hnRNP A1 発現抑制による小腸粘膜のアポトーシスの変化

抗 CD3 抗体誘発小腸障害において hnRNP A1 発現抑制によるアポトーシスの変化を明らかにする目的で、抗 CD3 抗体 $12.5 \mu\text{g}$ /マウスを腹腔内注入し 24 時間後に

回収した空腸粘膜組織に TUNEL 染色(図 3)を行った。1 視野 (200 倍) あたりの絨毛・陰窩での TUNEL 陽性細胞数を計測した結果 (平均±標準偏差), 無処置コントロール群でそれぞれ 0.94 ± 0.68 , 0.73 ± 0.60 個/視野, スクランブル RNA 群でそれぞれ 9.3 ± 4.5 , 10.6 ± 3.2 個/視野であったのに対し, hnRNP A1 発現抑制マウスではそれぞれ 16.7 ± 5.1 , 17.1 ± 4.8 個/視野であり, 絨毛・陰窩とも TUNEL 陽性細胞数の有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。

4. hnRNP A1 発現抑制による腸管組織中の炎症・アポトーシス関連メディエーターの変化

抗 CD3 抗体腹腔内注入 24 時間後に切除した空腸粘膜よりタンパク・RNA を回収し, サイトカイン・アポトーシス関連分子の発現変化について検討した。RT-PCR を行い, 炎症・アポトーシス関連サイトカイン(腫瘍壊死因子- α , インターフェロン- γ , インターロイキン- 1β , インターロイキン-4, インターロイキン-6, インターロイキン-10, インターロイキン-12, インターロイキン-17a)の発現量を解析した(表 1)。腫瘍壊死因子- α , インターロイキン-6, 17a では, 無処置コントロール群に比較して両群で有意に上昇しており, かつスクランブル RNA の投与群と比較して, hnRNP A1 の siRNA の投与によって hnRNP A1 の発現を抑制した群において, 有意な発現上昇が認められた ($p < 0.05$)。インターフ

エロン- γ 、インターロイキン-10 では無処置コントロール群と比較し、スクランブル RNA 群と hnRNP A1 発現抑制マウス群で有意に増加していたが、両群間に有意な差はみられなかった。インターロイキン-4, 12 では 3 群間に有意差は認められなかった。インターロイキン-1 β では無処置コントロール群に比べ、両群で低下する傾向がみられた。

Western blotting でアポトーシス関連分子 (NF- κ B, リン酸化-NF- κ B, PARP, cleaved PARP, Fas-リガンド, Fas) の発現について検討したところ、hnRNP A1 発現抑制マウスにおいて、cleaved PARP, Fas-ligand の著明な発現亢進を認めた($p < 0.05$)(図 4)。hnRNP A1 発現抑制により、腫瘍壊死因子- α や Fas-リガンドの発現が亢進し、アポトーシスが亢進したものと考えられた。

5. cDNA アレイによる hnRNP A1 の標的分子の検討

hnRNP A1 発現抑制マウスにおける、抗 CD3 抗体誘発小腸障害の増悪にアポトーシス亢進が関連していることが明らかとなったが、RNA 結合タンパクである hnRNP A1 がどのようなメカニズムでアポトーシスに関与しているかを検討するため、hnRNP A1 発現抑制マウスとスクランブル RNA マウスにおいて抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスを作製し、投与 24 時間後の空腸粘膜を回収し、cDNA アレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。hnRNP A1 発現抑制マウスにおいて、スクラ

ンブル RNA マウスと比較して 2 倍以上の発現亢進を示した cDNA が 9 種類(表 2a), 2 倍以上の発現低下を示した cDNA が 15 種類であった(表 2b). この中で, 最も発現が低下しており, hnRNP A1 の高親和性結合部位 (5'-UAGGGA/U-3')[22]と相同性のある配列を持つ抗アポトーシス分子である, トレフォイル因子 (Trefoil factor)2 に着目した. Western Blotting によるトレフォイル因子 2 タンパク発現変化を検討したところ, hnRNP A1 発現抑制マウスにおいて有意な発現低下を認め(p<0.05), 無処置コントロールマウスの発現レベルと同等であった(図 5). 以上から, hnRNP A1 の発現抑制によりトレフォイル因子 2 の mRNA・タンパクの発現低下をきたすことが明らかになった. hnRNP A1 の発現抑制によるトレフォイル因子 2 mRNA の安定化が阻害され, 発現が減少した結果, アポトーシスが亢進したものと考えられた.

考察

本研究では, 抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスを用いて, 過剰な腸管上皮アポトーシスおよび腸管障害に対する[2]-[4], RNA 結合蛋白 hnRNP A1 の作用を検討した. その結果, hnRNP A1 発現抑制下において, 小腸粘膜のアポトーシスが亢進し, 粘膜障害が増強されることを明らかにした. 本モデルは T 細胞誘導性アポトーシスモデルであり, IBD にみられる腸管上皮アポトーシスの発生機序と類似した病態を呈することから

[20][21], hnRNP A1 は IBD における腸管上皮アポトーシスの制御に寄与していると考えられる。これまで, hnRNP A1 がインターロイキン-10 遺伝子のプロモーター領域に結合しその発現を亢進することが報告されている[18]。本研究結果を合わせると, hnRNP A1 はインターロイキン-10 遺伝子の発現亢進, および過剰なアポトーシスに対する抑制効果の両面から腸炎による腸管障害を改善するものと考えられた。また, 我々は hnRNP A1 が大腸癌細胞において抗アポトーシス作用を有すること, マイクロ RNA-18a との複合体形成により分解が促進し, 大腸癌細胞のアポトーシス誘導が亢進することを明らかにしており[19], さらに本研究により, 腫瘍細胞のみならず炎症腸管においても hnRNP A1 が腸管上皮アポトーシスを制御していることが明らかになった。

hnRNP A1 による抗アポトーシスの作用機序を明らかにする目的で, cDNA アレイを行った結果, hnRNP A1 発現抑制によりトレフォイル因子 2 mRNA の著明な発現低下がみられた。また, western blotting による検討から, トレフォイル因子 2 タンパクの発現も有意に低下していた。トレフォイル因子は腸管上皮の杯細胞に広く発現する 7-12kDa のプロテアーゼ抵抗性の小さなペプチドであり[23][24], トレフォイル因子 1-3 の 3 種類に分類される。恒常的に分泌されているが, IBD による潰瘍形成など腸管障害が生じた際に速やかに発現が亢進し, 腸管上皮の分化誘導・粘膜治癒やバリア機能増強[25]-[28]に関与していることが知られている。また, トレフォイル因子は ERK や MAPK 経路の不活化を介してアポトーシスの制御を行っていることが明らかにされている

[29][30]. 本研究成果を考え合わせると、腸管炎症下では hnRNP A1 の発現が増加し、トレフォイル因子 2 mRNA の安定化、蛋白発現の誘導を介して、過剰なアポトーシスが抑制され、腸管障害の改善に寄与するものと考えられた。また、hnRNP A1 発現抑制マウスにおいて、炎症関連サイトカインである腫瘍壊死因子- α 、インターロイキン-6、17a の上昇がみられ、Fas-リガンドの上昇がみられた。腫瘍壊死因子- α 、Fas-リガンドはアポトーシスを促進する代表的なメディエーターである[31][32]。腫瘍壊死因子- α は hnRNP A1 などの RNA 結合蛋白と AU-rich element で結合することで腫瘍壊死因子- α mRNA の脱アデニル化や不安定化を生じることが報告されており[33][34]、hnRNP A1 の発現抑制により腫瘍壊死因子- α の翻訳が促進された可能性がある。インターロイキン-6 は腸管上皮に対する抗アポトーシス作用を[35]、インターロイキン-17 は制御性 T 細胞の活性化を介した腸炎抑制作用を有している[36]。hnRNP A1 抑制モデルにおいては、アポトーシスが亢進し腸管障害が増強していたため、反応性にインターロイキン-6 やインターロイキン-17 が増加したものと推測される。

IBD 患者の腸管 T 細胞活性化による上皮アポトーシスの亢進が知られており[1][2]、この過剰なアポトーシスは潰瘍形成の一因と考えられる[11][12]。本研究で IBD における T 細胞誘導性の腸管上皮障害モデルにおける hnRNP A1 の抗アポトーシス作用とそのメカニズムを明らかにした。今後、hnRNP A1 のトレフォイル因子 2 に対する結合能や発現調節機序などの詳細な作用メカニズムを解明することによって、RNA 結合蛋白

hnRNP A1 を用いた新たな腸炎治療の開発が期待される.

結語

本研究により, IBD でみられる T 細胞活性化によるアポトーシスを再現した抗 CD3 抗体誘発小腸障害マウスモデルにおいて, hnRNP A1 発現抑制下での腸管障害の増強を明らかにした. その機序として, トレフォイル因子 2 発現低下および腫瘍壊死因子 α の発現亢進を介した小腸粘膜のアポトーシスの増悪が関与していることも明らかにした. hnRNP A1 の発現誘導により, 炎症性腸疾患をはじめとする難治性腸管炎症に対する新規治療の開発が期待される.

謝辞

稿を終えるにあたり, 本研究の機会を与えて下さり, 終始御指導を賜りました旭川医科大学医学部内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 高後 裕教授に深謝しますとともに, 実験に関する御助言を頂きました同分野 藤谷 幹浩准教授, 小西 弘晃研究助手に感謝します.

文献

- 1) Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; **180**: 152–159.
- 2) Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, Cifone MG, Solcia E, Corazza GR. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003; **46**: 1498–1507.
- 3) Caprioli F, Stolfi C, Caruso R, Fina D, Sica G, Biancone L, Pallone F, Monteleone G. Transcriptional and post-translational regulation of Flip, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in human gut inflammation. *Gut* 2008; **57**: 1674–1680.
- 4) MacDonald TT, Spencer J. Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J Exp Med* 1988; **167**: 1341–1349.
- 5) Sträter J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Möller P. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; **113**: 16.
- 6) Yang X, Stennicke HR, Wang B, Green DR, Jänicke RU, Srinivasan A, Seth P, Salvesen GS, Froelich CJ. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem*

1998; **273**: 34278–83.

7) Brown GR, Lindberg G, Meddings J, Silva M, Beutler B, Thiele D. Tumor necrosis factor inhibitor ameliorates murine intestinal graft-versus-host disease.

Gastroenterology 1999; **116**: 593–601.

8) Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Séris M, Vassalli P. Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. Eur J Immunol 1998; **28**: 730–744.

9) Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. Gut 1998; **43**: 48–55.

10) Sakai T, Kimura Y, Inagaki-Ohara K, Kusugami K, Lynch DH, Yoshikai Y. Fas-mediated cytotoxicity by intestinal intraepithelial lymphocytes during acute graft-versus-host disease in mice. Gastroenterology 1997; **113**: 168–174.

11) Croitoru K, Zhou P. T-cell-induced mucosal damage in the intestine. Curr Opin Gastroenterol 2004; **20**: 581–586.

12) Lichtenberger GS, Flavell RA, Alexopoulou L. Innate immunity and

apoptosis in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2004; **10**: S58–S62.

13) Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, Gherzi R, Rosenfeld MG. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 2009; **459**: 1010-1014.

14) Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG. Hnrnp proteins and the biogenesis of mrna. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**: 289-321.

15) Fiset S, Chabot B. hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 2268-2275.

16) Steiner G, Skriner K, Hassfeld W, Smolen JS. Clinical and immunological aspects of autoantibodies to RA33/hnRNP-A/B proteins – a link between RA, SLE and MCTD. *Mol Biol Rep* 1996; **23**: 167–171 [Review].

17) Bouzid. D, Fourati H, Amouri A, Marques I, Abida O, Haddouk S, Ben MA, Tahri N, Penha-Goncalves C, Masmoudi H. Association of the RAVER2 gene with increased susceptibility for ulcerative colitis. *Human Immunology* 2012; **73**: 732–735.

18) Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol.* 2009; **10**: 471–479.

19) Fujiya M, Konishi H, Mohamed Kamel MK, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene*. 2013 doi: 10.1038/onc.2013.429. [Epub ahead of print]

20) Miura N, Yamamoto M, Fukutake M, Ohtake N, Iizuka S, Ishige A, Sasaki H, Fukuda K, Yamamoto T, Hayakawa S. Anti-CD3 induces bi-phasic apoptosis in murine intestinal epithelial cells: possible involvement of the Fas/Fas ligand system in different T cell compartments. *Int Immunol* 2005; **17**: 513–522.

21) Merger M, Viney JL, Borojevic R, Steele-Norwood D, Zhou P, Clark DA, Riddell R, Maric R, Podack ER, Croitoru K. Defining the roles of perforin, Fas/FasL, and tumour necrosis factor α in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. *Gut* 2002; **51**: 155–163.

22) Burd CG, Dreyfuss G. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal* 1994; **13**: 1197-1204.

23) Suemori S, Lynch-Devaney, K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein

family. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A 1991; **88**: 11017–11021.

24) Podolsky DK, Lynch-Devaney, K, Stow JL, Oates P, Murgue B, DeBeaumont M, Sands BE, Mahida YR. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. J Biol Chem 1993; **268**: 6694–6702.

25) Wright NA, Poulson R, Stamp GW, Hall PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rio MC, Tomasetto C, Chambon P. Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. J Pathol 1990; **162**: 279-284.

26) Hanby AM, Poulson R, Elia G, Singh S, Longcroft JM, Wright NA. The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in 'gastric metaplasia' of the proximal duodenum: implications for the nature of 'gastric metaplasia'. J Pathol 1993; **169**: 355-360.

27) Wright NA, Poulson R, Stamp G, Van Noorden S, Sarraf C, Elia G, Ahnen D, Jeffery R, Longcroft J, Pike C. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1993;**104**: 12-20.

28) Alison MR, Chinery R, Poulson R, Ashwood P, Longcroft JM, Wright NA. Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide,

intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach. *J Pathol* 1995; **175**: 405-14.

29) Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2000; **97**: 799–804.

30) Kanai M, Mullen C, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor induces inactivation of extracellular signal-regulated protein kinase in intestinal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1998; **95**: 178–182.

31) Benderska N, Chakilam S, Hugle M, Ivanovska J, Gandesiri M, Schulze-Luhrmann J, Bajbouj K, Croner R, Schneider-Stock R. Apoptosis signalling activated by TNF in the lower gastrointestinal tract--review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; **13**: 2248-2258.

32) Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999; **33**: 29-55.

33) Buxadé M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, Bain J, Espel E, Proud CG. The Mnks Are Novel Components in the Control of TNF Biosynthesis and Phosphorylate and Regulate hnRNP A1. *Immunity* 2005; **23**: 177–189.

34) Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ.

Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell*

Biol 1999; **19**: 4311–4323.

35) Jin X, Zimmers TA, Zhang Z, Pierce RH, Koniaris LG. Interleukin-6 is an important in vivo inhibitor of intestinal epithelial cell death in mice. Gut 2010; **59**: 186-96.

36) Lee HT, Kim M, Kim JY, Brown KM, Ham A, D'Agati VD, Mori-Akiyama Y. Critical role of interleukin-17A in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2013; **304**: 12-25.

Figure Legends

図1 抗CD3抗体誘発小腸障害マウスにおけるhnRNP A1の発現変化と組織学的・炎症メディエーターの変化

(a)H-E染色(x100); 抗CD3抗体投与3時間後では、投与前と比較して絨毛の短縮・浮腫や陰窩の肥厚がみられ、24時間後にはさらに絨毛は短縮、荒廃しており、陰窩の肥厚も増悪していた。(b)TUNEL染色(x200); 抗CD3抗体投与3時間後では絨毛優位のアポトーシス、24時間後では陰窩優位のアポトーシスが誘導されていた。(c)Western Blotting(n=3); 画像解析ソフトにてバンド強度を定量化、アクチンを内部コントロール

として標準化し、投与前のhnRNP A1タンパク発現量を100%として3時間後、8時間後、24時間後の発現量を比較した（平均±標準偏差, % of control). hnRNP A1のhnRNP A1タンパク発現は24時間後において有意に増加していた($p<0.05$). * $p<0.05$

図 2 hnRNP A1発現抑制による抗CD3抗体注入24時間後の腸管障害(H-E, X100)

C57Bl6/J(6週齢)マウスに対し、hnRNP A1のsiRNA、スクランブルRNAを腹腔内注入し、RNA腹腔内注入24時間後に抗CD3抗体 12.5 μ g/マウスを腹腔内注入し、24時間後にそれぞれのマウスおよび無処置のコントロールマウスより摘出した空腸組織のH-E染色標本(x100)を比較検討した。無処置コントロール群に比較してスクランブルRNA群で絨毛短縮・腸管浮腫がみられるが、hnRNP A1発現抑制マウスではさらに絨毛の短縮と絨毛先端の浮腫の増悪がみられた。

図 3 hnRNP A1発現抑制による小腸粘膜のアポトーシスの変化(TUNEL染色, x200)

抗CD3抗体腹腔内注入24時間後に回収した空腸粘膜組織にTUNEL染色を行った。hnRNP A1発現抑制マウスでは、スクランブルRNA群に比較して絨毛・陰窩ともTUNEL陽性細胞数の有意な増加を認めた (n=5) ($p<0.05$).

表1 hnRNP A1発現抑制による腸管組織中の炎症・アポトーシス関連サイトカインの

変化

抗CD3抗体腹腔内注入24時間後に切除した空腸粘膜よりタンパク・RNAを回収し、炎症およびアポトーシス関連サイトカインの発現変化について検討した(n=5). RT-PCRを行い、炎症・アポトーシス関連サイトカイン(腫瘍壊死因子- α , インターフェロン- γ , インターロイキン-1 β , インターロイキン-4, インターロイキン-6, インターロイキン-10, インターロイキン-12, インターロイキン-17a)について、無処置コントロールのmRNA発現量を1として発現変化を検討した(平均±標準偏差). 腫瘍壊死因子- α , インターロイキン-6, 17a では、無処置コントロール群に比較して両群で有意に上昇しており(p<0.05), スクランブルRNA群と比較して、hnRNP A1発現抑制マウスにおいて有意な発現上昇が認められた(p<0.05). インターフェロン- γ , インターロイキン-10では無処置コントロール群と比較し、両群で上昇がみられるものの、両群間に有意な差はみられなかった. インターロイキン-4, 12では3群に有意差は認められなかった. インターロイキン-1 β では無処置コントロール群に比べ、両群で低下する傾向がみられた.

* : 無処置コントロール群と比較し、スクランブルRNA群での有意な上昇あり. p<0.05

** : スクランブルRNA群と比較し、hnRNP A1発現抑制群での有意な上昇あり. p<0.05

図4 hnRNP A1発現抑制による腸管組織中のアポトーシス関連分子の変化

(b)Western blotting (n=5); アポトーシス関連分子(NF- κ B, リン酸化-NF- κ B, PARP,

cleaved PARP, Fas-リガンド, Fas) の発現について検討した. 画像解析ソフトにてバンド強度を定量化, アクチンを内部コントロールとして標準化し, 無処置コントロール群のタンパク発現量を100%としてスクランブルRNA群, hnRNP発現抑制群のタンパク発現量を比較した (平均±標準偏差, % of control). hnRNP A1発現抑制群において, cleaved PARP, Fas-リガンドの著明な発現亢進を認めた($p<0.05$). * $p<0.05$

表2 cDNAアレイによるhnRNP A1標的分子の検討

hnRNP A1発現抑制マウスとスクランブルRNAマウスに対する, 抗CD3抗体投与後24時間の空腸粘膜を回収し, cDNAアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った.

hnRNP A1発現抑制マウスにおいて, スクランブルRNAマウスと比較して2倍以上の発現亢進を示したcDNAが9種類(表2a), 2倍以上の発現抑制を示したcDNAが15種類であった(表2b). この中で, 発現が最も抑制されており, 腸管上皮のアポトーシスを抑制する作用を持つトレフォイル因子2に着目した.

図 5 トレフォイル因子の発現変化

Western Blottingによるトレフォイル因子2タンパク発現変化の検討を行った. 画像解析ソフトにてバンド強度を定量化, アクチンを内部コントロールとして標準化し, 無処

置コントロール群のトレフォイル因子2タンパク発現量を100%としてスクランブル

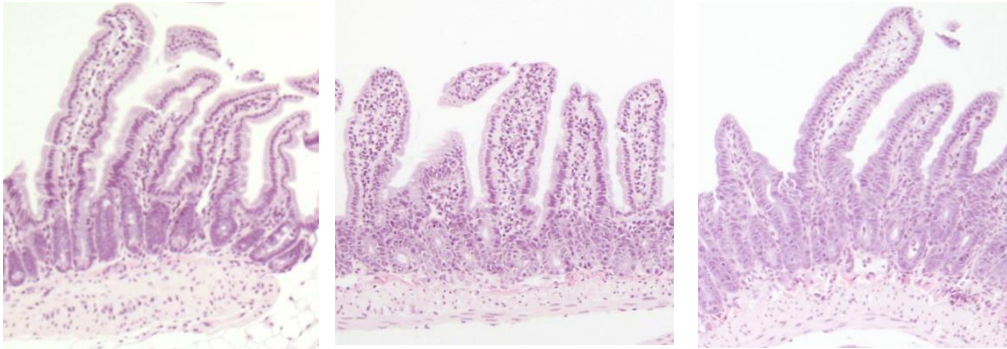
RNA群, hnRNP発現抑制群の発現量を比較した (平均±標準偏差, % of control).

hnRNP A1発現抑制マウスにおける有意な発現低下が認められ, 無処置コントロールマ

ウスの発現レベルと同等であった(n=5). *p<0.05

a 抗CD3抗体投与後の腸管障害の組織学的変化(H-E x100)

図1
安藤 勝祥

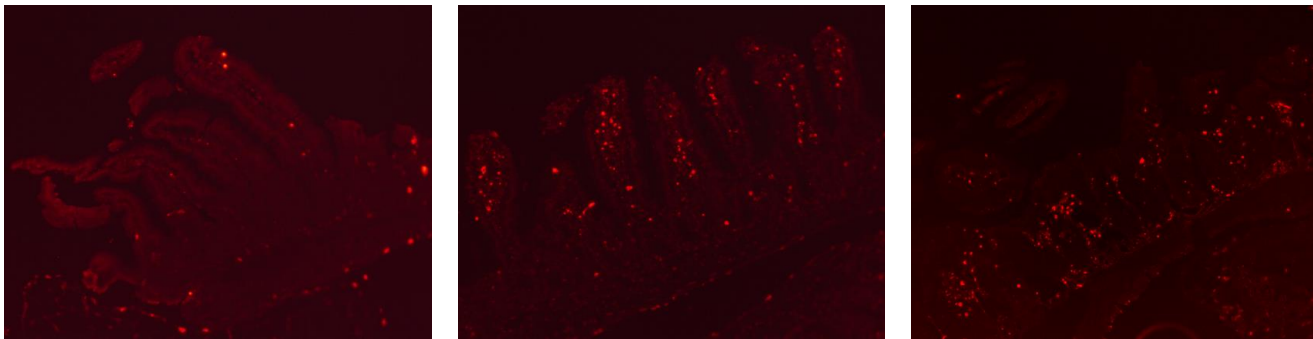


投与前

3時間後

24時間後

b 抗CD3抗体投与後のアポトーシスの変化(TUNEL染色 x 200)

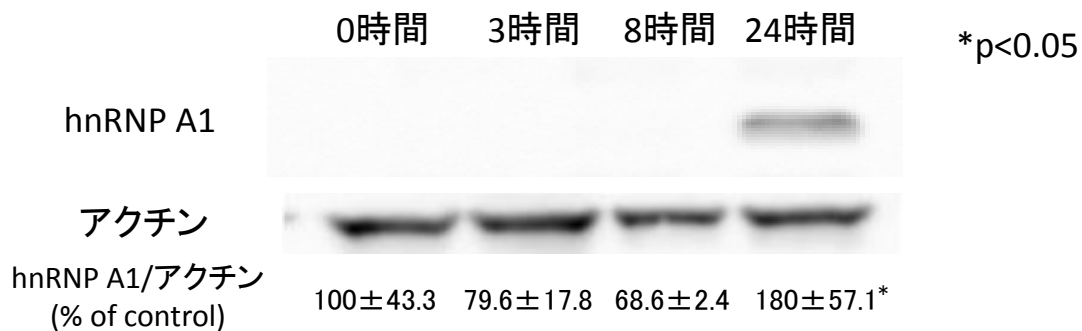


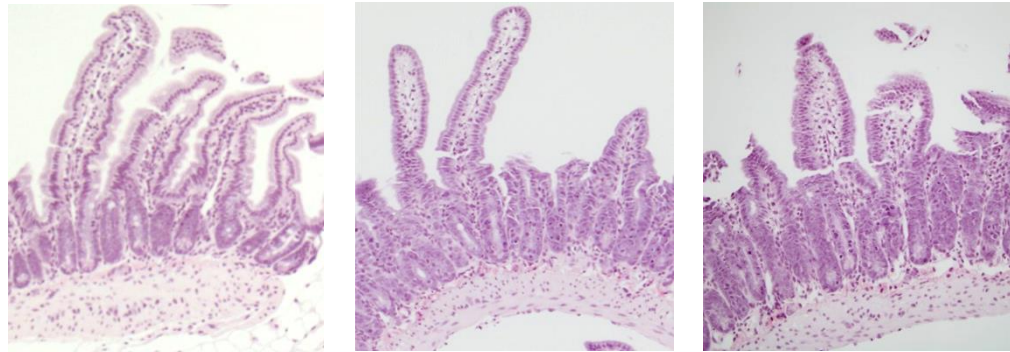
投与前

3時間後

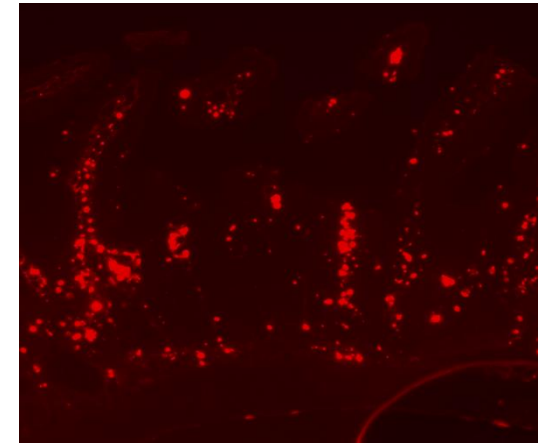
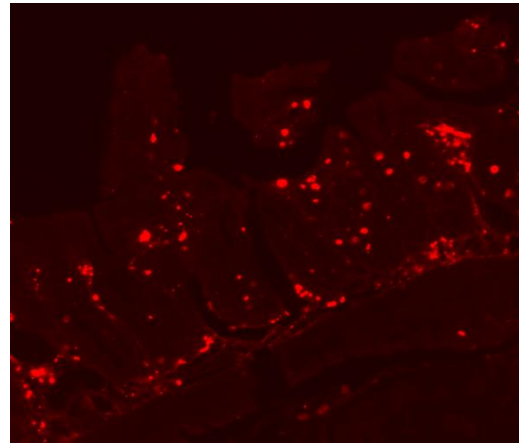
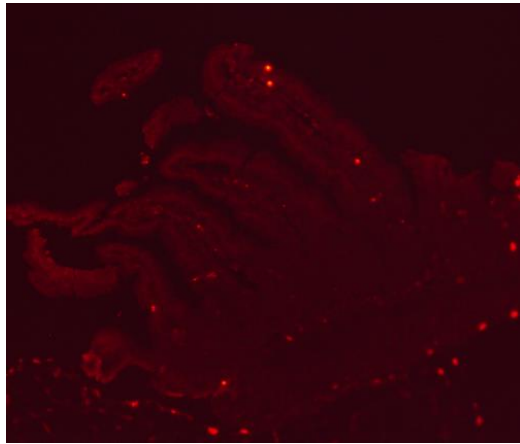
24時間後

c 抗CD3抗体投与後hnRNP A1の経時的発現変化(Western blotting)





siRNA	—	スクランブル	hnRNP A1
抗CD3抗体	—	+	+



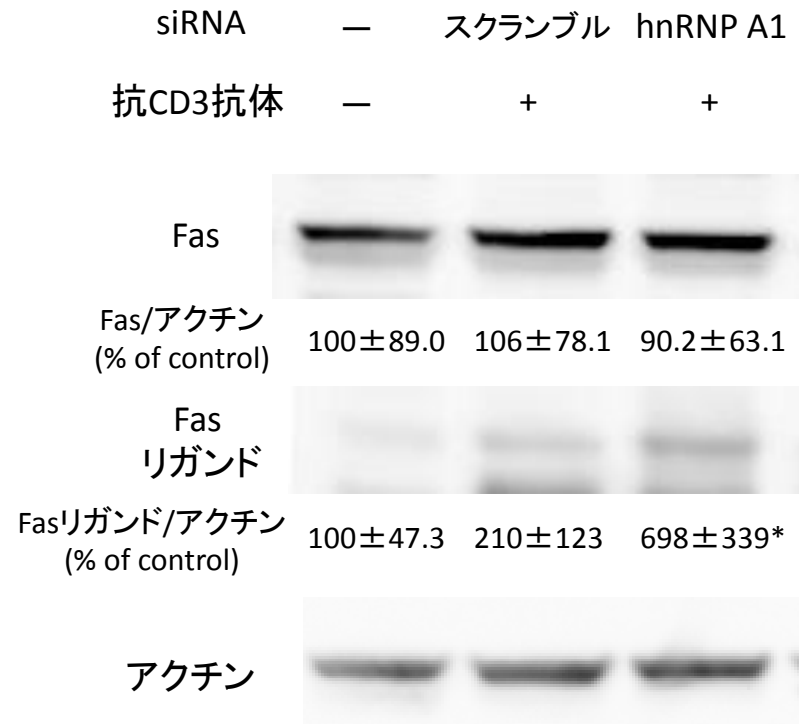
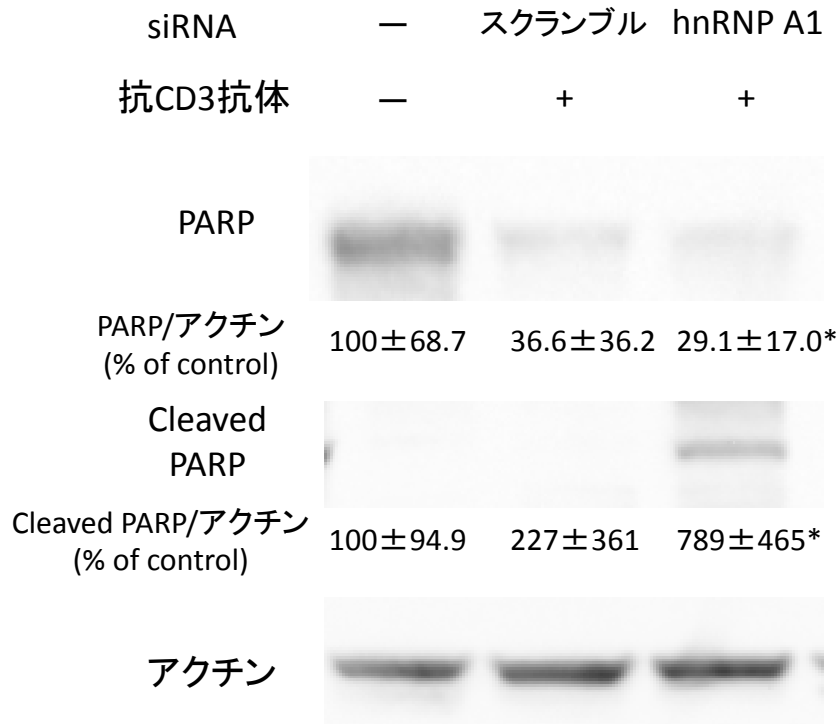
siRNA —
抗CD3抗体 —

スクランブル
 +

hnRNP A1
 +

siRNA 抗CD3抗体	— —	スクランブル +	hnRNP A1 +
腫瘍壊死因子- α	0.93 \pm 0.13	3.8 \pm 2.1*	7.1 \pm 2.0**
インターフェロン- γ	1.0 \pm 0.19	2.3 \pm 0.85*	2.2 \pm 0.34
インターロイキン-1 β	1.1 \pm 0.39	0.18 \pm 0.07	0.27 \pm 0.15
インターロイキン-4	0.84 \pm 0.36	0.84 \pm 0.44	1.2 \pm 0.80
インターロイキン-6	1.8 \pm 1.4	11.6 \pm 6.1*	24.7 \pm 14.7**
インターロイキン-10	1.0 \pm 0.50	21.1 \pm 8.9*	18.62 \pm 6.4
インターロイキン-12	1.1 \pm 0.90	1.8 \pm 1.1	1.4 \pm 1.5
インターロイキン-17a	1.2 \pm 0.46	1.1 \pm 0.94*	2.1 \pm 1.3**

*p<0.05



a cDNAアレイによる2倍以上の発現亢進mRNA

siRNA of hnRNP A1/scramble RNA
(log 2比)

CAP-GLY domain containing linker protein 2	2.54
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16	2.98
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41	2.60
defensin related cryptdin 21	2.96
defensin related cryptdin 5	2.74
defensin related cryptdin 5	2.89
defensin related sequence cryptdin peptide	2.76
metallothionein 1	2.97
metallothionein 2	2.80

b cDNAアレイによる2倍以上の発現低下mRNA

	siRNA of hnRNP A1/scramble RNA (log 2比)
carboxypeptidase A1	-2.61
carboxypeptidase B1	-2.61
chymotrypsinogen B1	-3.09
CUB and zona pellucida-like domains 1	-2.97
elastase 1, pancreatic	-2.87
elastase 3, pancreatic	-2.96
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	-2.61
kallikrein related-peptidase 15	-3.16
pancreatic lipase related protein 1	-2.81
phospholipase A2, group IB, pancreas	-2.65
protease, serine, 2	-2.59
regenerating islet-derived 2	-2.85
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 2	-2.80
syncollin	-2.77
trefoil factor 2	-3.35

