慶應義塾大学学術情報リポジトリ

Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	機械的圧力負荷によるラット小腸上皮細胞でのIL-6産生についての検討
Sub Title	
Author	岸川, 浩(Kishikawa, Hiroshi)
	石井, 裕正(Ishii, Hiromasa)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.3 (2003. 9) ,p.T213- T223
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030901-0213

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって 保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

機械的圧力負荷によるラット小腸上皮細胞での IL-6 産生についての検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導:石井裕正教授)

(平成14年11月11日受付)

Key Word: transmural pressure, IL-6, intestinal epithelial cell

腸管は管腔内圧および腸管運動により生じる物理的圧 力に常時さらされている。 臨床的に腸管内圧を測定した 報告では、過敏性腸症候群患者の空腸において腸管内圧 は一過性ではあるが 50 mmHg を越える場合があるこ とが知られているが、これら物理的圧力負荷に対する腸 粘膜上皮細胞の応答に関する情報はあまり知られていな いり、腸上皮細胞にかかる圧力はズリ応力、壁張力、経 壁圧の3つが考えられる。生体の腸管においては管腔 内圧の上昇は壁張力の上昇も伴うため純粋な経壁圧のみ を検討することは困難である。そこで我々は、これまで に小腸培養細胞上皮に純粋な静水圧を負荷するというモ デルを用いて, in vitro で圧力負荷が小腸上皮細胞にお いて 80 mmHg をピークとする細胞増殖能と DNA 合 成能の亢進を示し、IL-2 の投与により更に細胞増殖の 増加が認められること, この細胞増殖の細胞内シグナル 伝達機構に PKC, PLC, チロシンキナーゼが関与して いること、またさらに細胞増殖の際に MAP kinase を 介して早期発現遺伝子である c-fos,c-myc の発現や転 写因子 AP-1 の活性化を生じていることなどを報告し てきた*30. 近年、機械的刺激により様々な増殖因子や 炎症性サイトカインの産生が増加することが骨芽細胞、 血管内皮細胞,心筋細胞などで報告されている(**).特 に IL-6 に関しても動脈の血管内皮細胞においてズリ応 力が IL-6 の産生を増加させるとの報告や、骨関節炎に おける軟骨細胞がズリ応力によって IL-6 の産生を転写 レベルから有意に増加させるとの報告もあり、様々な臓 器において力学的な因子によりその放出が増加し炎症反 応を修飾している可能性が示唆されている"。 今回, 著者が検討した IL-6 は炎症性サイトカインの 1 つであ り当初 B 細胞刺激因子として同定され^{9,10)}、肝細胞にお ける急性相蛋白の誘導, T細胞の分化, 造血器幹細胞の 活性化などの様々な生物学的作用が知られている。また、 近年、腸管においても粘膜防御機構に密接に関与してい るとの報告がなされるようになり注目されている。腸管 の培養細胞を用いた実験系でサルモネラ菌、TGF·β、 IL-18, コレラ毒素により腸上皮細胞からの IL-6 放出 が増加することが報告されており、腸管局所において腸 上皮細胞が IL-6 の産生を担う重要な器官であることを 示唆している^{11~15)}. また IL-6 が腸管粘膜免疫の主要な 反応の場であるパイエル板からの IgA 産生に密接に関 与するとの報告もある13). In vivo の実験系においても, 絞扼性イレウスモデルを用いた検討で腸管局所の静脈血 内における IL-6 濃度が上昇することが報告されており、 腸管内圧上昇などの機械的刺激に応答して IL-6 などの 炎症性サイトカインの産生が腸管局所で増加することが 示唆されている¹⁶⁾. 特にこれら腸管内圧の上昇を伴う病 態では粘膜上皮に損傷が生じ細菌が腸管粘膜を介して直 接侵入する bacterial translocation を誘発することが 知られており、小腸の閉塞や虚血再還流時における腸管 局所での炎症性サイトカイン、特に IL-6 が粘膜防御機 構を通じて重要な役割を担う可能性も報告されてい るい。 しかし、イレウスなどの病態により惹起される

本論文は Kishikawa H, Miura S, Yoshida H, Hirokawa M, Nakamizo H, Higuchi H, Adachi M, Nakatsumi RC, Suzuki H, Saito H, Ishii H. Transmural pressure induces IL-6 secretion by intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002 の一部を含む.

腸管内圧の上昇が、腸上皮細胞レベルにおける炎症性サイトカイン、特に IL-6 の放出にどのような影響を及ぼすのかについてこれまで全く報告されていない。

一方、IL-6 発現に関与する転写因子として nuclear factor-kappa B (NF-кB), nuclear factor-interleukin-6 (NF-IL6) がこれまでに同定されている「9~21). 外界からの刺激によりまず I-kappaB がリン酸化され、これにより NF-кB の標的遺伝子への結合が生じ他の転写因子とともに遺伝子を活性化するといわれているが、腸上皮細胞に対する物理的圧力負荷がこれらの転写因子にいかなる変化を及ぼすかを検討した報告はみられない.

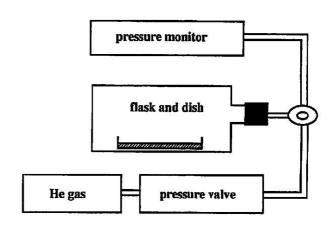
今回、著者は 1) transmural pressure が腸上皮細胞に対し IL-6 の産生にいかなる影響を与えるか、及び 2) 圧力負荷に伴い転写因子である NF-kB、NF-IL6 がいかなる動態を示し IL-6 産生に影響を与えるかを in vitro の実験系において検討したので報告する。

材料と方法

1. 細胞培養および圧力負荷装置

ラット回腸上皮細胞の IEC-18 細胞を American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から 購入した。5% CO2の環境下で5% fetal calf serum (FCS) 添加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地にて培養した。この細胞はラット胎児の 回腸から樹立された細胞で、核型は正常で極性を保って おり non transform の小腸モデルとして広く使われて いる細胞である。subconfluent の状態で Hishikawa²²⁾ らの報告にいくつかの改良を加えて作成した圧力負荷装 置を用いて圧力を負荷した。密閉した特殊フラスコにへ リウムガスを注入し、培養細胞に各種圧力をかけた。圧 力を負荷する装置はフラスコをゴム栓で密封しそこから 23 ゲージ針を通し圧力モニター, ヘリウムガスポンベ およびパルブを並列に接続した。さらにフラスコ内部温 度を常時37℃に保つようにし細胞培養を行った。外因 性に不活化ガスであるヘリウムガスを加えてフラスコ内 圧力を適宜調節した。Boyle-Charles' law によりフラ スコ内の酸素,二酸化炭素分圧,pHは一定のままで, ヘリウムガス分圧の増加分だけ全体の圧力を増加させる ことが可能である20、第1図にこの実験系の模式図を示 す.

IL-6 放出の極性は 0.4 µm の孔を有する半透膜上 (Transwell chambers Costar, Cambridge, Mass, USA) で細胞を培養して圧力を負荷し、上層(1.5 ml)および 下層(2.6 ml)のそれぞれにおいて IL-6 の濃度を検討

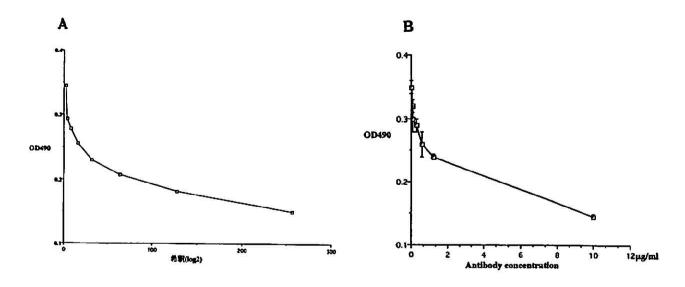


第1図 圧力負荷装置の模式図、フラスコをゴム栓で密封 しそこから23ゲージ針を通し圧力モニター、ヘリウムガ スポンベおよびバルブを並列に接続した。さらにフラス コ内部温度を常時37度に保つようにし、その中で細胞培 養を行った、外因性にヘリウムガスを加えてフラスコ内 圧力を適宜調節した。

した。この条件下においては細胞の上層と下層の双方に 同様の圧力負荷がかかると考えられた。

2. IL-6 濃度の測定

培養上清中の IL-6 濃度は IL-6 依存性に増殖するマ ウスハイブリドーマ細胞である 7TD1 cell (Riken Cell Bank, 筑波、茨城)を用いて測定した。 ELISA 法によ る検討ではコントロール群の培養上清中におけるIL-6 濃度が測定感度以下となることがあり、これまでにより 鋭敏な測定法として確立されている cell proliferation assay にて検討した、7TD1 cell は5% CO2 の環境下 で 5% FCS 添加 RPMI に 0.2 mM の HEPES を加え、 5ng/mlの murine recombinant IL-6 とともに培養し た. 対数増殖期に採取した 7TD1 cell を IL-6 を添加し ない洗浄用培養液にて3回洗浄し、これを96穴のマイ クロタイタープレートに 1×10⁵/ml の濃度で 50 μl ず つ捲き, さらに希釈系列を作成した IEC-18 の培養上清 を 50 µl 投与して計 100 µl として 3 日間培養した。ま た, IL-6 標準物質の希釈系列を作成し同様に 7TD1 cell とともに 3 日間培養した、3 日後に非放射性細胞増 殖測定キット (Promega, Madison WI, USA) を用い て細胞数の測定を行い 490 nm における optical density 値(OD 値)をマイクロプレートリーダーにて測定 した。IL-6 標準物質の希釈系列と比較し最大増殖速度 の 1/2 となる点での両者の希釈倍比により IL-6 の力価 を測定した。IL-6の放出量はコントロール群の力価を



第2図 A: 標準物質の代表的な希釈系列。B: 抗マウス IL-6 抗体による抑制実験。抗マウス IL-6 抗体は 7TDI の増殖を用量依存性に抑制し、この実験系でラットの IL-6 を特異的に測定していることが示された。

1 として各検体における力価の倍率を求め、その相対変化をグラフ化した。すべての cell proliferation assayは同一希釈検体につき 3 ウェルずつ準備し triplicate にて施行した。代表的な標準物質の希釈系列を示す(第2図 A)。著者の検討では抗マウス IL-6 抗体(R&D System, Minneapolis, MN, USA)はラット IL-6 による 7TD1 の増殖を特異的に抑制し、この実験系でラットの IL-6 を特異的に測定していることを示していると考えた(第2図 B)。

3. RT-PCR 法による IL-6の mRNA の発現

Total RNA は RNA zol (Cinna, Biotex, Houston, TX, USA) を用いて IEC-18 細胞より抽出した。抽出した RNA 量を波長 260nm で測定し、波長 260nm および 280 nm 計測時の比率は常に 1.9 以上であることを確認した。First-strand synthesis kit (Stratagene, LA Jolla, CA, USA) にて RNA より cDNA を作成し、IL-6の mRNA を Takara taq kit (recombinant Taq DNA polymerase: Takara Biochemicals, 東京)を用いて RT-PCR 法にて検討した。IL-6のプライマーはサワデーテクノロジー(Tokyo)にて作成した。配列は下記のとおりである。

sense primer 5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCAC TGC-3'.

antisense primer 5'-TAGCCACTCCTTCTGTG ACTCTAACT-3' ²³⁾

想定される PCR 生成物は 508 bp であり、Programmed Thermocontrol systems (Applied Biosystems

Japan Co. 東京)にて94℃3分 (initial melt), 94℃1分 (melt), 58℃1分 (anneal), 72℃90秒 (extension)で35サイクルの増幅を行い、最後に72℃7分 (final extension)とした。内部標準としてGlyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用い、IL-6のPCR 産物と比較し半定量的な検討を行った。GAPDHのプライマーは同様にサワデーテクノロジー(東京)にて作成し、配列は下記のとおりである。

sense primer 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' antisense primer 5'-AGATCCACAACGGATACAT T-3' 24)

想定される PCR 生成物は 309 bp であり、94 $^{\circ}$ C 1 分、58 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 3 分 35 サイクルの増幅を行った。反応産物は 1.5%アガロースゲルにて電気泳動しエチジウムブロマイドにて染色し紫外線蛍光にて可視化し写真撮影した。また、これを NIH image にて pixel 数を計算しグラフ化した。

4. 阻害実験

次の塩基配列をサワデーテクノロジーにて作成し、3'末端の3塩基を phosphorothioate 化した。さらにその相補する配列を作成し、95℃で5分間反応させその後、徐々に室温に戻してアニーリングさせた。配列は下記のとおりである。下線部は κB および mutated κB の結合部位である。

NF-kB(TFD)

5'GGGGACTTTCCGCTGGGGACTTCCAGGGG GACTTTCC 3' mutated NF-kB (MUT)

5'GTCTACTTTCCGCTGTCTACTTTCCACGGT CTACTTTCC3' 25)

これらを 2 µM の濃度で 24 時間 IEC18 細胞と共に培養し、その後圧力を 24 時間負荷して培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

5. lkB-aの Western blot 法

培養細胞を SDS sample buffer (62.5 mM Tris HCl pH6.8, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% w/v bromphenol blue) にて触解して調整した。これを SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel にで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写、PhosphoPlus[®] IκB-α Antibody kit (Biolabs) を用いて Western blot 法でリン酸化された IκB-α の発現を検討した。ブロッキングした後、1次抗体として抗phospho-IκB 抗体(希釈倍率 1000 倍)と 4℃で一晩反応させ、2次抗体として HRP (horse radish peroxidase) 標識抗ウサギ抗体(希釈倍率 2000 倍)および HRP 標識抗ビオチン抗体(希釈倍率 1000 倍)で室温で1時間反応させた。ECL にて発色させ chemiluminescence 蛍光の活動性を X 線で検出して検討した。

6. NF-xB および NF-IL6 の活性化

NF-κB および NF-IL6 の結合活性は FITC でラベル したオリゴヌクレオチドプローブを使用した電気泳動度 シフト法 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で行った、培養細胞をセルスクレーパーにてはがし、 PBS にて洗浄した後、氷冷したバッファー A (10 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl 10 mM, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/ml の各 antipain, chymostatin, leupeptin, peptin A) に 懸濁し 8000g で 2 分間遠心して上清を取り除き、これ を2回くり返した. 沈澱をバッファーC (20 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/ml の antipain, chymostatin, leupeptin, peptin A) に懸 濁し,20 分間震盪させた後 14000g で 5 分間遠心し, 核分画成分を抽出した。20 ug の核蛋白抽出物質と 1 ng の FITC 標識 NF-kB オリゴヌクレオチド 5'-AGTT GAGGGGACTTTCCCAGG-3'26)および NF-IL6 オリゴ ヌクレオチド 5'-TGGGTATTATGCAATTGGAAG-3'2"と 45 分間,室温で反応させた.次に 50%蔗糖をサ ンプルに加え、非変性 5%ポリアクリルアミドゲルにて 160Vで1時間、電気泳動させイメージアナライザー (FluorImager 575; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) にて解析した、競合実験は、非標識のオリ ゴヌクレオチドを FITC 標識オリゴヌクレオチドの 50 倍量用いて核蛋白と反応させ同様にイメージアナライザー (FluorImager 575) にて解析した。

7. 統計学的処理

すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。統計処理は ANOVA にて解析後、Fisher の post hoc 検定を行い、p<0.05 をもって統計的有意差とした。

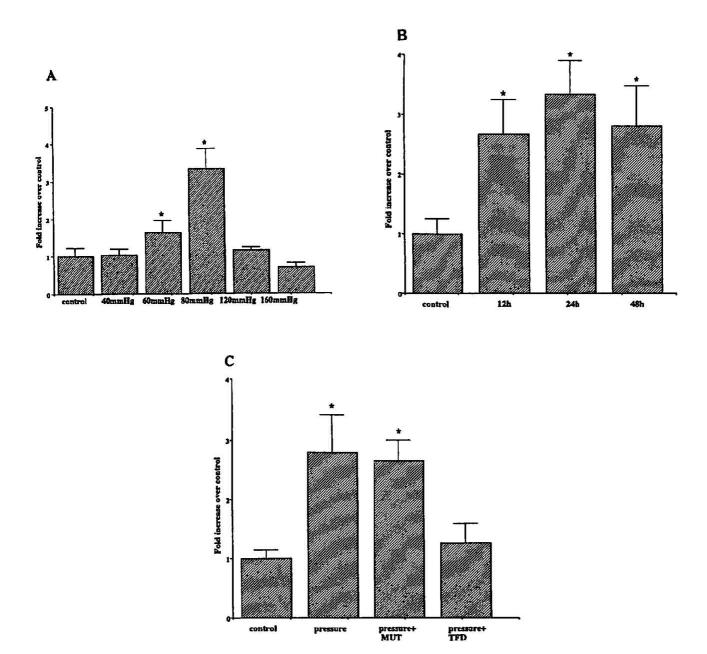
結 果

1. 圧力負荷に伴う IL-6 放出の検討

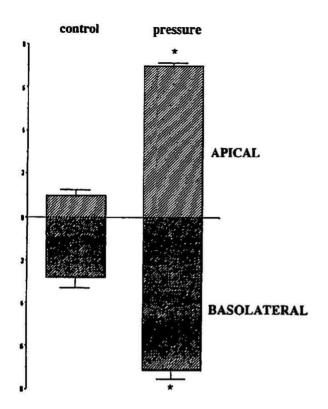
20, 40, 60, 80, 120, 160 mmHg の各種圧力負荷 を 24 時間、IEC18 細胞にかけて IL-6 の培養上清中の 濃度を検討した。第 3A 図に示したように 60 mmHg 以上の圧力負荷にて IL-6 放出の増加が認められ 80 mmHg で最高となり 160 mmHg では逆に IL-6 放出の 放出はコントロール群より抑制された。 このことから IL-6 放出のピークは 80 mmHg であると考えられ、本 研究においては IL-6 の産生、mRNA、転写因子の発現 の変化などを 80 mmHg の圧力負荷にて検討すること とした. 次に 80 mmHg の圧力負荷を 12, 24, 48 時 間かけて IL-6 の放出を検討した (第3図 B), その結 果, 圧力負荷 24 時間後の IL-6 の放出が最高であった。 また、この IL-6 の放出が NF-κB を介した経路が関与 しているかどうかを検討するため 2μM の NF-κBの decoy(TFD)を圧力負荷24時間前に投与したところ、 IL-6の産生は有意に抑制された。また、この IL-6 の抑 制効果は mutated decoy (MUT) の投与では認められ なかった (第3図C). このことから、NF-κBを介した 経路により圧力負荷に伴う IL-6 の放出が行われている ことが示された.

2. 圧力負荷に伴う IL-6 放出の極性に関する検討

方法に示したように 0.4 μm の孔を有する半透膜上で細胞を培養し、80 mmHg の圧力を 24 時間負荷し、上層、下層のそれぞれで IL-6 濃度を検討した。IL-6 の放出は無刺激時には基底膜側に優位であったが、圧力負荷後は上皮側、基底膜側の双方において有意に増加し、上皮側と基底膜側にほぼ同程度に放出された(第4図)。また、半透膜の上層から下層への IL-6 の移行の有無を検討するため、細胞を半透膜上で培養後、³H-mannitol



第3図 A:各種の圧力負荷時における IEC-18 細胞からの IL-6 放出の検討。20, 40, 60, 80, 120, 160 mmHg の 各種圧力負荷を 24 時間,IEC18 細胞にかけて IL-6 の培養上清中の濃度を検討した。60 mmHg 以上の圧力負荷にて IL-6 放出の増加が認められ 80 mmHg で最高となり 160 mmHg では逆に IL-6 放出の放出はコントロール群より抑制された。コントロール群の IL-6 放出量を 1 とした IL-6 放出量の相対変化を示した。各 6 検体より算出した平均値±標準偏差を表す。*p<0.05 vs control、(Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002 の第 1 図より許可を得て転載)。B:80 mmHg の圧力負荷時における IL-6 産生の時間経過。12, 24, 48 時間の圧力負荷を行い IL-6 の放出を検討したところ。圧力負荷 24 時間後の IL-6 の放出が最高であった。コントロール群の IL-6 放出量を 1 とした IL-6 放出量の相対変化を示した。各 6 検体より算出した平均値±標準偏差を表す。*p<0.05 vs control、(Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002 の第 1 図より許可を得て転載)。C:NF-κB decoyの投与による IL-6 放出への影響。2μM の NF-κB の decoy(TFD)を圧力負荷 24 時間前に投与したところ。IL-6 の産生は有意に抑制された。また。この IL-6 の抑制効果は mutated decoy(MUT)の投与では認められなかった。コントロール群の IL-6 放出量を 1 とした IL-6 放出量の相対変化を示した。各 6 検体より算出した平均値±標準偏差を表す。*p<0.05 vs control、(Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002 の第 2 図より許可を得て転載)



第4図 圧力負荷に伴う IL-6 の放出の極性に関する検討. 0.4 μm の孔を有する半透膜上で細胞を培養して 80 mmHg の圧力を 24 時間負荷し、その上層および下層のそれぞれにおいて IL-6 の濃度を検討した。コントロール群の上皮側への IL-6 放出量を 1 とした IL-6 放出量の相対変化を示した。各 6 検体より算出した平均値±標準偏差を表す。*p<0.05 vs control、(Kishikawa H et al:Clin Exp Immunol 129:86-91, 2002 の第3図より許可を得て転載)

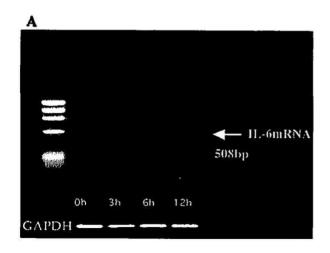
を上層に添加し圧力を負荷し、24 時間後に下層での ³H 活性をシンチレーションカウンターで検討したところ上層から下層への移行は 5%以下であり、無視し得ることを予備実験にて確認している。

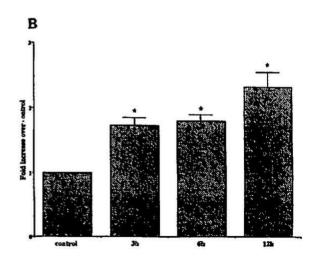
3. 圧力負荷に伴う IL-6 mRNA の変化

IL-6 mRNA は RT-PCR 法により半定量的に解析した. 内部標準として GAPDH を用い, これと比較することで IL-6 mRNA の発現を検討した. IL-6 の mRNA は 508 bp の部位に示された. 圧力負荷 3 時間後より IL-6 mRNA はコントロール群と比較して発現が増強し, 12 時間後まで持続しており, IL-6 が転写レベルで増加していることが示された. 内部標準として用いた GADPH mRNA を下段に示す (第5 図 A).

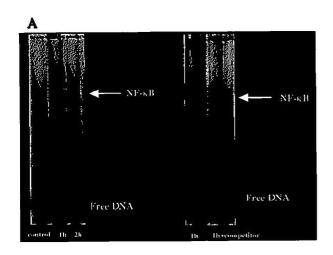
IL-6 mRNA と GAPDH mRNA のそれぞれを NIH Image 1.62 f にて pixel を計算して GAPDH との比率 を算出しグラフ化した(第 5 図 B)。コントロール群を 1 とし、3、6、12 時間後の IL-6mRNA の相対変化を示した。

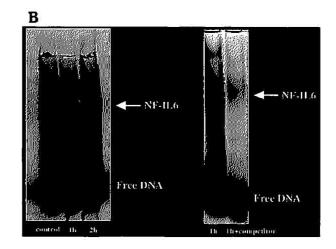
4. 圧力負荷に伴う転写因子 (NF-кB, NF-IL6) の検討 IEC-18 細胞における圧力負荷による AP-1 結合活性 の変化を検討するため AP-1 結合配列を含むオリゴヌクレオチドを使った電気泳動度シフト法(EMSA)を行った。圧力負荷後の NF-кB 発現の変化は第6図 A に示すように 1 時間後では強く増強し、2 時間後ではその発現



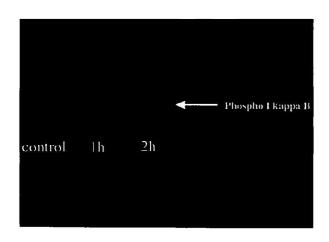


第5図 A:圧力負荷時の IEC-18 細胞における IL-6 mRNA 発現の検討、508bp の IL-6 mRNA は圧力負荷 3 時間後より認められ、12 時間後まで持続した、内部標準として用いた GADPH mRNA を下段に示す。B:内部標準として GADPH mRNA を用い、IL-6 mRNA と GAPDH mRNA のそれぞれを NIH image にて pixel 数を計算しグラフ 化した、コントロール群を 1 とし、3、6、12 時間後の IL-6 mRNA の相対変化を示した。各 3 検体より算出した平均値 = 標準偏差を表す。*p<0.05 vs control。(Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129:86-91, 2002 の第 4 図より許可を得て転載)





第6図 圧力負荷によるの NF-κB および NF-IL6 の活性化、A:圧力負荷 1~2 時間後の NF-κB の活性化を elecrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて FITC 標識 NF-κB オリゴヌクレオチドを用いて検討した。圧力 負荷後の NF-κB 発現の変化は 1 時間後では強く増強し、2 時間後ではその発現はやや減弱した。反応の特異性を確認するため 50 倍量の FITC 非標識のオリゴヌクレオチドとともに FITC 標識 NF-κB オリゴヌクレオチドを反応させたところ。その発現が著明に減弱しており、これらが特異的であることが示唆された。B:圧力負荷 1~2 時間後の NF-IL6 の活性化を elecrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて FITC 標識 NF-IL6 オリゴヌクレオチドを用いて検討した。NF-κB と同様に圧力負荷後の NF-κB 発現の変化は 1 時間後では強く増強し、2 時間後ではその発現はやや減弱した。NF-κB と同様、反応の特異性を確認するため 50 倍量の FITC 非標識のオリゴヌクレオチドとともに FITC 標識 NF-IL6 オリゴヌクレオチドとともに FITC 標識 NF-IL6 オリゴヌクレオチドを反応させたところ。その発現が著明に減弱しており、これらが特異的であることが示唆された。(Kishikawa H et al:Clin Exp Immunol 129:86-91、2002 の第5 図より許可を得て転載)



第7図 圧力負荷に伴う IxB-αリン酸化の検討。80 mmHgでの圧力負荷 1~2 時間後の phospho-IxB(Ser32)抗体による Western blot の結果を示す。圧力負荷 1~2 時間後にかけて発現が増強しており I-kappaB のリン酸化が亢進していることが示唆された。(Kishikawa H et al:Clin Exp Immunol 129:86-91, 2002 の第6図より許可を得て転載)

はやや減弱した。また、NF-IL6 においても同様に1時間後をピークとする発現の増強が認められた(第6図B)、いずれにおいても50倍量のFITC 非標識の cold oligonucleotide による競合阻害実験でその発現が減弱しており、これらが特異的な反応であることを確認した。

5. IκB·α のリン酸化の検討

リン酸化された $I_{KB-\alpha}$ に対する抗体を用い western blot 法にて圧力負荷に伴う $I_{KB-\alpha}$ のリン酸化を検討した。圧力負荷 $1\sim2$ 時間後にかけて発現が増強しており $I_{KB-\alpha}$ のリン酸化が亢進していることが示唆された(第7図)。

考 察

今回の著者の検討から 80 mmHg の圧力負荷により 小腸上皮細胞から IL-6 が放出され、これが mRNA の レベルでも増加し、しかも NF-xB や NF-IL6 などの転 写因子を介した経路で活性化されていることが示された。 腸管内圧は健常人では 50 mmHg に、過敏性腸症候群 では一過性ではあるが 80 mmHg に達することが知ら れている"。 また、Kellow らは内圧が 50 mmHg 以上 に達し、主に回腸において速い速度で肛門側へ移動する タイプの波形 prolonged propagated contractions (PPCs) が過敏性腸症候群や一部の健常人における腹痛 などの腹部症状と関連していることを報告しており、こ れら予想以上の高い腸管内圧が短時間ではあるが生理的 な環境でも生じていることが考えられている、炎症性サ イトカインである IL-6 はこれまでにサルモネラ菌, コ レラ毒素などの感染、TGF-αや IL-1βなどの炎症性サ イトカインの投与により腸上皮細胞から産生が増加する ことが報告されている9~12.13)。しかし、今回の検討から IL-6 はこれらの感染などによる刺激のみならず、イレ ウスなど持続的な腸管内圧の上昇により腸上皮細胞から の放出が亢進し、腸管の粘膜防御機構に密接にかかわっ ている可能性が示唆され、これらの病態において IL-6 の関与を検討することは意義があると考えられた. Fevang®らは豚の小腸にループを作成し静脈圧が 50 mmHg になるまで腸管を圧迫して作成した絞扼性イレ ウスモデルを用い、イレウスを作成後 90 分後から腸管 局所の静脈中における IL-6 産生の増加が認められ、こ の IL-6 の増加が栄養する動脈のクランプ単独により生 じないことからこの増加が虚血によるものではなく、イ レウスそのものによるものであると考察している。今回 の著者の検討から in vitro において腸管内圧の上昇が少 なくとも粘膜局所での IL-6 の放出増加をきたすことが 示され、Fevang 6 らのイレウスモデルでの IL-6 増加 のメカニズムの1つとして腸管内圧の上昇が関与して いた可能性を十分示唆し得るものと考えた、また、小腸 の閉塞機転が常在細菌叢である大腸菌の異常増殖をきた すことや、これが同時に生じる粘膜損傷のために bacterial translocation を惹起し、全身性のエンドトキシ ン血症を呈することが以前より知られているい。一方、 Rollwagen¹⁸⁾らはマウスに経口的に投与した IL-6 が腸 粘膜における細動脈の圧力こう配の破綻を改善し、虚血 再還流により作成した粘膜透過性の亢進を抑制する作用 があることを報告し、イレウスなどでも生じ得る bacterial translocation に対し、IL-6 が抑制的に働く可能 性を示唆している。 また、IL-6 が IL-1β や TNF-α の 産生を抑制し、IL-1βの受容体を down-regulation し て過剰な炎症反応の亢進を抑制するとの報告があり、 IL-6 がイレウスなどの圧力の負荷によって生じた腸粘 膜の損傷に対する炎症反応を適切に調節する可能性があ ると考えられた。他にも、臨床的に絞扼性イレウスや大 腸癌などの閉塞機転による大腸イレウスのみならず過敏

性腸症候群や炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎における 巨大結腸症など、様々な病態にも IL-6 が関与している 可能性が考えられ、今後の検討課題と考えられた。

T1165、7TD1、B13.29、B9 などのマウスハイブリドーマ細胞が IL-6の測定に用いられている $^{28-30}$ 、著者は、これらの中で比較的良く使われている 7TD1 を用いて培養上清中の IL-6のバイオアッセイを行った。このバイオアッセイ系では IL-11 によっても細胞増殖が亢進することが知られているが、その力価は IL-6の約 1000分の 1 と言われているため IL-6 産生への影響は少ないと考えられた。また TNF α や TGF β など一部の因子が IL-6 依存性細胞株の増殖を抑制することが知られているが 29 、これらの因子については圧力負荷に伴い有意な増加を示さないことを既に確認しており、今回の検討では無視し得ると考えた。

圧力負荷に伴う IL-6mRNA は 6 時間後から発現が増 強することが今回の検討で明らかになった、これに対し、 例えばサルモネラ菌により腸上皮細胞から IL-6 は極め て早期の時相から産生され、mRNA レベルで 60 分後 より増加し、また IL-6 の放出は 2 時間後より認められ るとされており、著者の圧力負荷後の IL-6 の増加はこ のサルモネラの刺激と異なり、より遅い時相の変化であ ることが理解できる"。我々のこの比較的遅い時相にお ける IL-6 の変化は小腸上皮細胞 (IEC-6) ヘコレラト キシンを投与した際の IL-6 の増加と似ており、この場 合 mRNA の増加は 4 時間後より、IL-6 の放出は 12 時 間後より認められ24時間後にプラトーに達しており我々 と同様の結果であった"'、また、McGee"らはIL-1B とコレラトキシンが IL-6 放出に対し相乗効果を持つこ とを報告しているため、我々も IL-1B を投与下で圧力 負荷を行い IL-6 の放出を検討してみたが、予想と異な り相加、または相乗効果は認められなかった。この結果 は Fevang らのイレウスモデルで IL-1 の上昇が認めら れないにもかかわらず、IL-6の上昇が認められたとい う結果と合致するものであり圧力負荷という物理的スト レス下においては腸管において IL-6 が主たる粘膜防御 機構に関与する可能性を示唆している.

IL-6 の放出は、小胞体、ゴルジ装置などにおける蛋白の輸送を阻害する brefelsin A、monensin の投与により抑制されることが報告されている。このことからIL-6 は他の多くのサイトカイン、ホルモンと同様に小胞体からゴルジ装置を経て細胞膜内面に移動し開口放出(エクソサイトーシス)によって細胞外に放出されると考えられている³¹⁾、サイトカイン放出の極性に関しては、IL-6 においてはこれまでにマウスの子宮の上皮細胞や

角膜上皮細胞、腸上皮細胞などにおいて検討されてきた¹²⁻³⁴⁾. 腸上皮細胞では Mascarenhas³⁴⁾らが上皮側からの IL-1β の刺激では基底膜側への優位な IL-6 の放出を認めたが、基底膜側からの TNF-α の刺激では基底膜側、管腔側の双方に IL-6 の放出を認めたと報告している. また、網膜色素上皮細胞において基底膜側からの IL-1β 刺激では基底膜側に優位に炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) を放出したが、上皮側からの IL-1β 刺激ではサイトカインの放出は上皮側、基底膜側のいずれにも有意差を認めなかったとの報告がある。このように刺激や細胞の種類により IL-6 放出の極性は様々であるが、腸管においては上皮側からの IL-6 の放出が、隣接する腸上皮細胞に炎症のシグナルを伝え粘膜防御機構を修飾するという生物学的な意義があると考えられた。

今回、著者は圧力負荷により小腸上皮細胞において NF-ĸBと NF-IL6 の活性化が生じることを明らかにし た。なお圧力負荷に伴う NF-xB の核内への移行につい ては、既に抗 NF-ĸB 抗体を用いた免疫組織化学にて確 認されている2. NF-xB はこれまでに IL-2, IL-6, TNF-α などの様々なサイトカインや接着因子の発現に 関与していることが報告されている「9"。 NFkBの DNA への結合は LPS や TNF により誘導され、また NF-IL6 はそれ自身の mRNA が LPS や TNF により誘導される ことが知られている35). Parikh36)らは IL-1β 刺激によ り Caco-2 細胞からの IL-6 の放出増加すること、また これが NF-xB の阻害薬により抑制されることを報告し ており、IL-6 の産生が NF-κB を介した経路で活性化さ れることを明らかにした.IL-6 および NF-κB に関する これまでの報告を見てみると、Khaled25)らはリンパ球 において LPS により放出が増加する IL-6 が Rel A antisense では抑制されないにもかかわらず NF-kB の decoy により有意に抑制されたことから NF-κB による IL-6 遺伝子の活性化が Rel A だけではなく c-Rel にも 関与している可能性を示唆し、また、Tomita376は内 皮細胞において TNF により産生が増加する IL-6 が NF-kBの decoy により抑制されることを報告している. 今回、著者は物理的な圧力負荷が NF-xB と NF-IL6 を 活性化するのみならず、これによる IL-6 発現の増加が NF-κBの decoy により有意に抑制されることを示し、 これが NF-κBを介した転写経路で制御されていること を明らかにした。また、I-kappaB-α のリン酸化を western blot 法にて検討し、 圧力負荷に伴い I-kappaB-α のリン酸化が亢進することを明らかにした. このリン酸化は I-kappaB 蛋白の分解のシグナルとなっ ておりこれが NF-κB を活性化し、他の転写因子ととも

に標的の遺伝子を活性化することが報告されている38.391

以上の検討から生理的にも生じうる 80 mmHg の経 壁圧が小腸上皮細胞において NF-кB や NF-IL6 を活性 化し IL-6 の放出を増加させること、また、この IL-6 の産生が NF-кB の decoy により有意に抑制されたこと から、NF-кB を介した経路で活性化されることが明ら かとなった。

総 括

圧力負荷が小腸上皮細胞からの IL-6 の産生の変化にいかなる影響を及ぼすかを検討し以下のような結果を得た

- 1. 腸上皮細胞に 40 mmHg から 160 mmHg の圧力 負荷を加えたところ生理的な腸管内圧である 80 mmHg の圧力負荷において小腸上皮細胞からの IL-6 の産生は ピークとなった。また、この 80 mmHg の圧力負荷を 12~48 時間にわたり負荷したところ 24 時間後がピー クとなった。
- 2. IL-6 放出はコントロール群では基底膜側に優位に 放出され、圧力負荷に伴い上皮側、基底膜側の双方にお いて増加した。
- 3. 80 mmHg の圧力負荷において IL-6 mRNA も 3~12 時間後に発現が増強した。
- 4. 圧力負荷により転写因子である NF-κB および NF-IL6 が活性化され、またこの NF-κB の decoy で IL-6 の産生が有意に抑制された。

以上より 80 mmHg の物理的圧力負荷により小腸上 皮細胞から IL-6 が放出が増加し、さらに mRNA のレベルでも増加していることが示された。また、NF-кB や NF-IL6 などの転写因子も同時に活性化され、LPS や TNF-α による IL-6 の放出の増加と同様これが、NF-кB を介した経路により活性化されていることが明らかになった⁶⁰.

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應 義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深謝致します。 また、直接御指導、御校閲いただいた防衛医科大学校第2 内科三浦総一郎教授に感謝致します。さらに本研究に多大 なご協力をいただきました慶應義塾大学医学部消化器内科 学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成 10 年, 11 年度文部省科学研究費の 補助により行われた。

本論文の内容の一部は 97th Annual Meeting of American Gastroenterological Association (1998 年, New

Orleans, USA), 第85回日本消化器病学会総会(1999年, 長崎)において発表した。

文 献

- Kellow JE, Phillips SF. Altered small bowel motility in irritable bowel syndrome is correlated with symptoms. Gastroenterology 92: 1885-1893, 1987
- Hirokawa M, Miura S, Kishikawa H, Yoshida H, Nakamizo H. Higuchi H, Nakatsumi RC, Suzuki H, Saito H, Ishii H. Loading of mechanical pressure activates mitogen-activated protein kinase and early immediate gene in intestinal epithelial cells. Dig Dis Sci 46: 1993-2000, 2001
- Hirokawa M, Miura S, Shigematsu T, Yoshida H, Hokari R, Higuchi H, Kurose I, Kimura H, Saito H, Nakaki T, Ishii H. Pressure stimulates proliferation and DNA synthesis in rat intestinal epithelial cells. Life Sci 61: 667-672, 1997.
- 4) Cillo JE Jr, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: Implications for distraction osteogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 90: 147-154, 2000.
- 5) Okada M, Matsumori A, Ono K, Furukawa Y, Shioi T, Iwasaki A, Matsushima K, Sasamura S. Cyclic stretch upregulates production of interleukin 8 and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:894-901, 1998.
- 6) Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S. Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. Circ Res 84: 1127-1136, 1999.
- Sterpetti AV, Cucina A, Morena AR, Di Donna S, D'Angelo LS, Cavallaro A, Stipa S. Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. Surgery 123: 212-217, 1993.
- 8) Mohtai M, Gupta MK, Donlon B, Ellison B, Cooke J, Gibbons G, Schurman DJ, Smith RL. Expression of interleukin-6 in osteoarthritic chondrocytes and effects of fluid-induced shear on this expression in normal human chondrocytes in vitro. J Ortho Res 14: 67-73, 1996.
- 9) Kishimoto T. The biology of interleukin 6. Blood 74: 1-10. 1989.
- 10) Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, Simpson RJ. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of a T-cellderived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. Proc Natl Acad Sci USA 83: 9679-9683, 1986.

- 11) McGee DW, Elson CO, McGee JR. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. Infect Immun 61: 4637-4644, 1993.
- 12) McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGee JR. Transforming growth factor-β and IL-1β act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. J Immunol 151: 970-978, 1993.
- 13) Goodrich ME, McGee DW. Effect of intestinal epithelial cell cytokines on mucosal B-cell IgA secretion: enhancing effect of epithelial-derived IL-6 but not TGF-β on IgA+ B cells. Immunol Lett 1999; 67: 11-4.
- 14) Weinstein DL, O'Neill BL, Metcalf ES. Salmonella typhi stimulation of human intestinal epithelial cells induces secretion of epithelial cell-derived interleuki n-6. Infect Immun 65: 395-404, 1997.
- 15) Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA. The gut: a cyotokine-generating organ in systemic inflammation? Shock 4: 193-199, 1995.
- 16) Fevang J, Ovrebo K, Svanes K, Rokke O. Endotoxin and cytokine release in strangulation obstruction and in partial occlusion of the mesenteric artery in pigs. Eur Surg Res 31: 26-38, 1999.
- 17) Roscher R. Oettinger W. Beger HG. Bacterial microflora, endogenous endotoxin, and prostaglandins in small bowel obstruction. Am J Surg 155: 348-355, 1988.
- 18) Rollwagen FM, Li YY, Pacheco ND, Dick EJ, Kang YH. Microvascular effects of oral interleukin-6 on ischemia/reperfusion in the murine small intestine. Am J Pathol 156: 1177-1182, 2000.
- 19) Matsusaka T. Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL-6 and NF-κB synergistically activate tanscription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10193-10197, 1993.
- 20) Palombella V, Rando O, Godberg A, Taniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-κB1 precursor protein and the activation of NF-κB. Cell 78: 773-785, 1994.
- Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of IκB-α proteolysis by sitespecific, signal-induced phosphorylation. Science 267: 1485-1488, 1995.
- 22) Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Hayashi M, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Pressure promotes DNA syntheisi in rat cultured vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 93: 1975-1980, 1994.
- 23) Osawa H, Yambe H, Inuma H, Miyata M, Sasaki T, Kaizuka M, Tamura N, Tsunoda S, Fujita Y, Kanazawa T. TGF-β upregulates interleukin 6 production by rat glomerular epithelial cells in vitro.

- Nephrol Dial Transplant: 10: 1592-1597, 1995.
- 24) Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Yang T, Marumo F. Expression of endothelin-3 mRNA along rat nephron segments using polymerase chain reaction. Kidney Int 44: 1273-1280, 1993.
- 25) Khaled AR, Edward J. Butfiloski, Eric S. Sobel, and Joel Schiffenbauer. Use of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides to inhibit NF-κB expression and lymphocyte function. Clin Immunol Immunopathol 86, 170-179, 1998
- 26) Peng HB, Libby P, and Liao JK. Induction and stabilization of I-κBα by nitric oxide mediates inhibitor of NF-κB. J Biol Chem 270, 14214-14219, 1995
- 27) Christopher HS, Hui-Jian Zhang, Michael B. Armstrong, Ray V. Rajotte, Jacques Maclouf, and R. Paul Robertson. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. Proc Natl Acad Sci USA 95: 1788-1793,1998
- 28) McGee DW, Bamberg T, Vitkus SJ, McGee JR. A synergistic relationship between TNF-α, IL-1β, and TGF-β1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial cell line. Immunology 86: 6-11, 1993.
- 29) Schwabe M, George W. Cox, Maria Carla Bosco, Rainer Prohaska, and Hsiang-Fu Kung. Multiple cytokines inhibit interleukin-6-dependent murine hybridoma/plasmacytoma proliferation. Cell Immunol 168: 117-121, 1996.
- 30) McGee DW, Vitkus SJD. IL-4 enhances IEC-6 intestinal epithelial cell proliferation yet has no effect on IL-6 secretion. Clin Exp Immunol 105: 274-277, 1996.
- Anna Rubartelli, Federico Cozzolino, Marina Talio, Roberto Sitia. A novel secretory pathway for interle ukin-1β, a protein lacking a signal sequence. EMBO J 9: 1503-1510, 1990.
- 32) Jacobs AL, Sehgal PB, Julian J, Carson DD. Secretion and hormonal regulation of interleukin-6 production

- by mouse uterine stromal and polarized epithelial cells cultured in vitro. Endocrinol 131: 1037-1046, 1992.
- 33) Holtkamp GM, Rossem MV, Vos AFD, Peek BWR, Kijlstra A. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. Clin Exp Immunol 112: 34-43, 1998.
- 34) Mascarenhas JO, Goodrich ME, Eichelberger H, McGee DW. Polarized secretion of IL-6 by IEC-6 intestinal epithelial cells: differential effects of IL-1β and TNF-α. Immunol Invest 25: 333-340, 1996.
- 35) Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL-6) is a member of a C/EBR family. EMBO J 9: 1897-1906, 1990.
- 36) Parikh AA, Salzman AL, Kane CD, Fischer JE, Hasselgren PO. IL-6 production in human intestinal epithelial cells following stimulation with IL-1 beta is associated with activation of the transcription factor NF-kappa B. J Surg Res 69: 139-144, 1997.
- 37) Tomita N, Morishita R, Tomita S, Yamamoto K, Aoki M, Matsushita H, Hayashi S, Higaki J, and Ogihara T. Transcription factor decoy for nuclear factor κB inhibits tumor necrosis factor-α-induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. J Hypertensions 16: 993-1000, 1998.
- 38) Jobin C, Haskill S, Mayer L, Panja A, and Sartor B. Evidence for altered regulation of lκBα degeneration in human colonic epithelial cells. J. Immunol. 158: 226-234, 1997.
- 39) Thanos D, Maniatis T. NF-κB: A lesson in family values. Cell 80: 529-532, 1995
- 40) Kishikawa H, Miura S, Yoshida H, Hirokawa M, Nakamizo H, Higuchi H, Adachi M, Nakatsumi RC, Suzuki H, Saito H, Ishii H. Transmural pressure induces IL-6 secretion by intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002