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.

慶應医学・80(3)：T213～T223，2003

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）
岸川　浩（きしかわ　ひろし）

（平成14年11月11日受付）

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

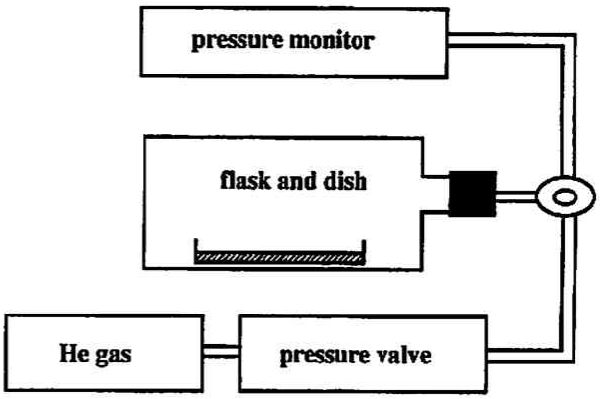
腸管は管腔内圧および腸管運動により生じる物理的圧力に常時さらされている．臨床的に腸管内圧を測定した報告では，過敏性腸症候群患者の空腸において腸管内圧は一過性ではあるが 50 mmHg を越える場合があることが知られているが，これら物理的圧力負荷に対する腸粘膜上皮細胞の応答に関する情報はあまり知られていない[1]．腸上皮細胞にかかる圧力はズリ応力，壁張力，経壁圧の３つが考えられる．生体の腸管においては管腔内圧の上昇は壁張力の上昇も伴うため純粋な経壁圧のみを検討することは困難である．そこで我々は，これまでに小腸培養細胞上皮に純粋な静水圧を負荷するというモデルを用いて，*in vitro* で圧力負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[2,3]．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[4~6]．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[7,8]．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-1β，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[17,18]．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-κB），nuclear factor-interleukin-6（NF-IL6）がこれまでに同定されている[19~21]．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-κB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-κB，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．



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，ヘリウムガスボ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．

材料と方法

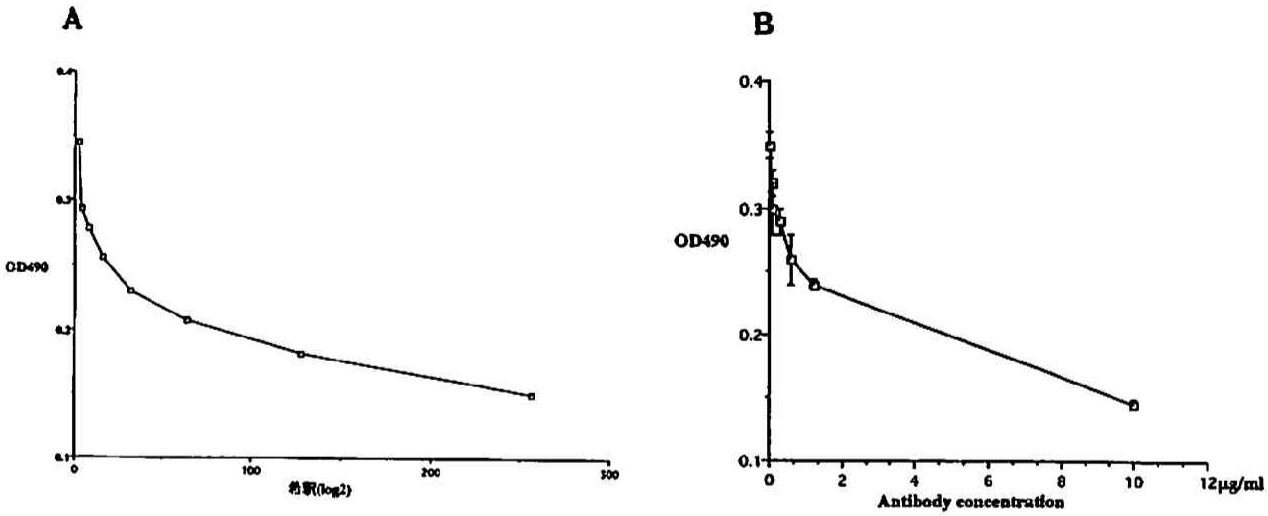
1. 細胞培養および圧力負荷装置

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% CO_2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Hishikawa[22]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ヘ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，ヘリウムガスボ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℃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[22]．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 m*l*）および下層（2.6 m*l*）のそれぞれにおいてIL-6の濃度を検討した．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% CO_2の環境下で5% FCS添加RPMIに0.2 mMのHEPESを加え，5ng/m*l*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1×10^5/m*l*の濃度で50 μ*l*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 μ*l*投与して計100 μ*l*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 7TD1 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'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTGC-3',

antisense primer 5'-TAGCCACTCCTTCTCTGTGACTCTAACT-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'-AGATCCACAACGGATACATT-3' [24]

想定される PCR 生成物は 309 bp であり，94℃ 1 分，58℃ 1 分，72℃ 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-κB(TFD)

5'GGGGACTTTCCGCTGGGGACTTCCAGGGGGACTTTCC 3'

mutated NF-κB (MUT)

5'GTCTACTTTCCGCTGTCTACTTTCCACGGTCTACTTTCC3'[25]

これらを2μM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. IκB-α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）にて融解して調整した．これをSDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gelにて電気泳動し，ニトロセルロース膜に転写，PhosphoPlus[R] 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-κB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 μg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'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGG-3'[26]およびNF-IL6オリゴヌクレオチド5'-TGGGTATTATGCAATTGGAAG-3'[27]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．

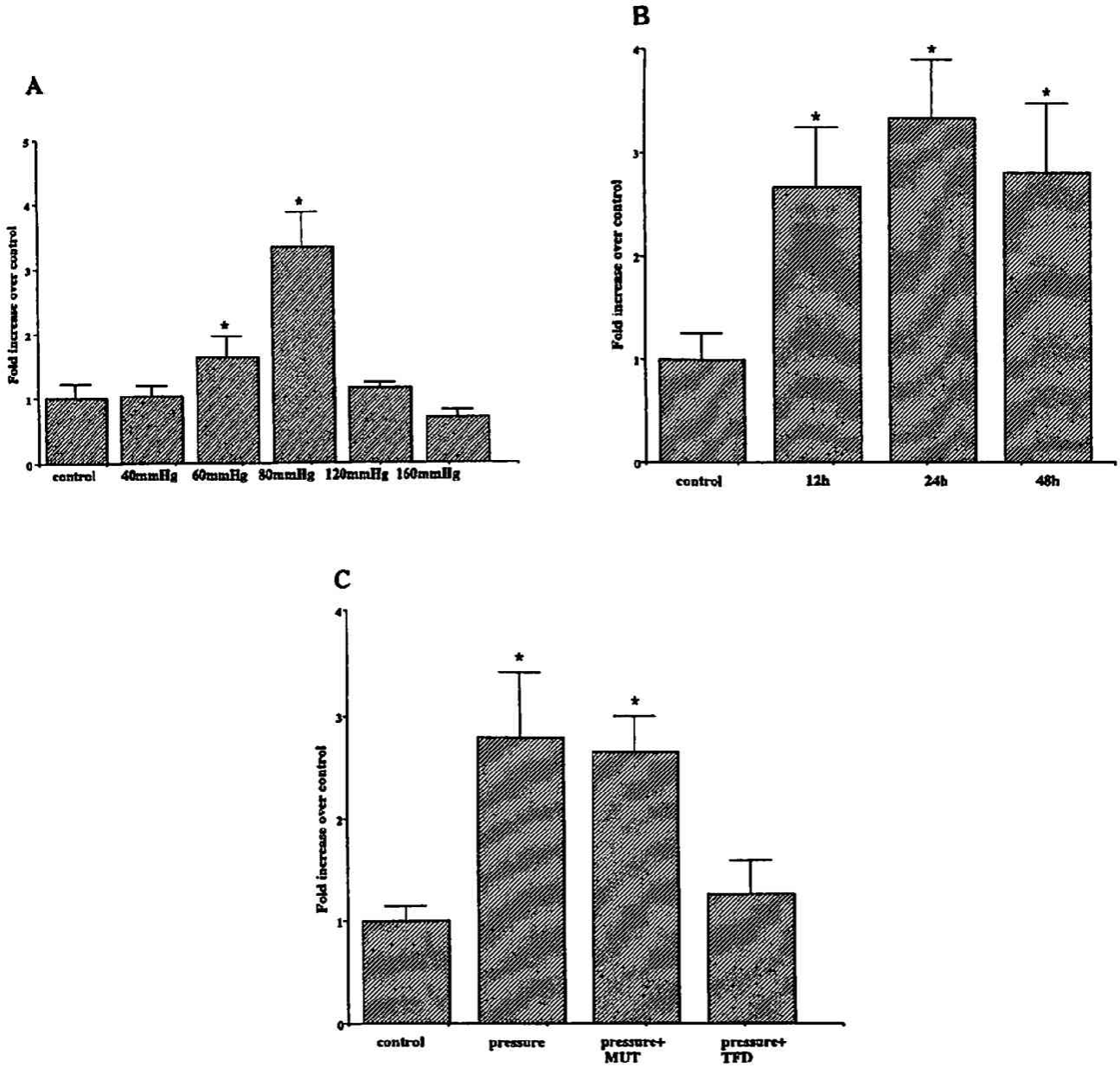
結　果

1. 圧力負荷に伴うIL-6放出の検討

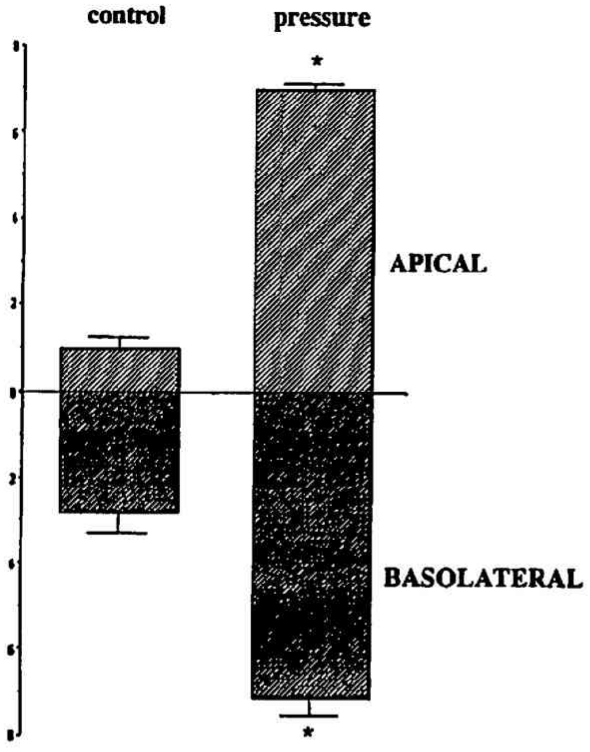
20, 40, 60, 80, 120, 160 mmHgの各種圧力負荷を24時間，IEC18細胞にかけてIL-6の培養上清中の濃度を検討した．第3A図に示したように60 mmHg以上の圧力負荷にてIL-6放出の増加が認められ80 mmHgで最高となり160 mmHgでは逆にIL-6放出の放出はコントロール群より抑制された．このことからIL-6放出のピークは80 mmHgであると考えられ，本研究においてはIL-6の産生，mRNA，転写因子の発現の変化などを80 mmHgの圧力負荷にて検討することとした．次に80 mmHgの圧力負荷を12, 24, 48時間かけてIL-6の放出を検討した（第3図B）．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，^{3}H-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^{3}H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．

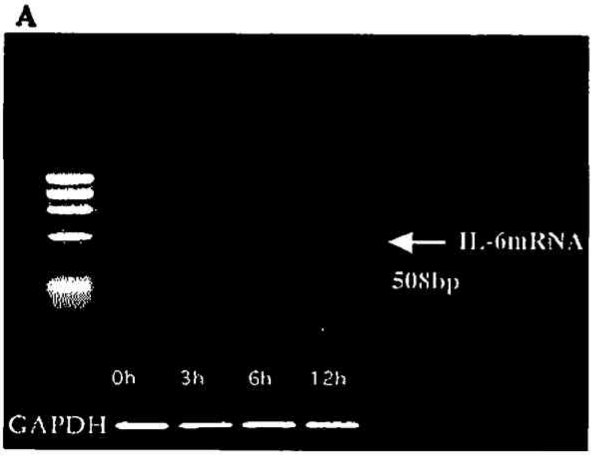
3．圧力負荷に伴うIL-6 mRNAの変化

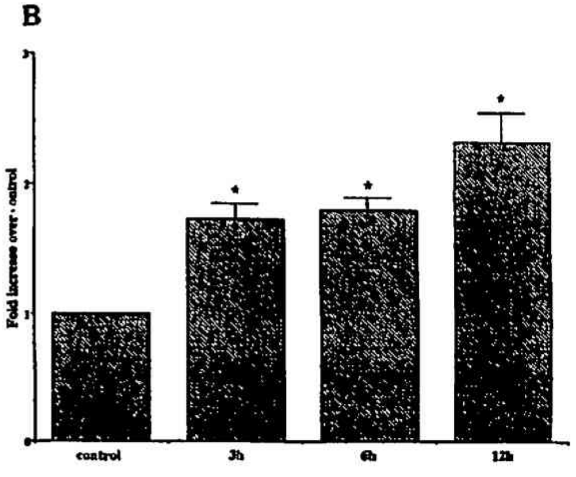
IL-6 mRNAはRT-PCR法により半定量的に解析した．内部標準としてGAPDHを用い，これと比較することでIL-6 mRNAの発現を検討した．IL-6のmRNAは508 bpの部位に示された．圧力負荷3時間後よりIL-6 mRNAはコントロール群と比較して発現が増強し，12時間後まで持続しており，IL-6が転写レベルで増加していることが示された．内部標準として用いたGADPH mRNAを下段に示す（第5図A）．

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．

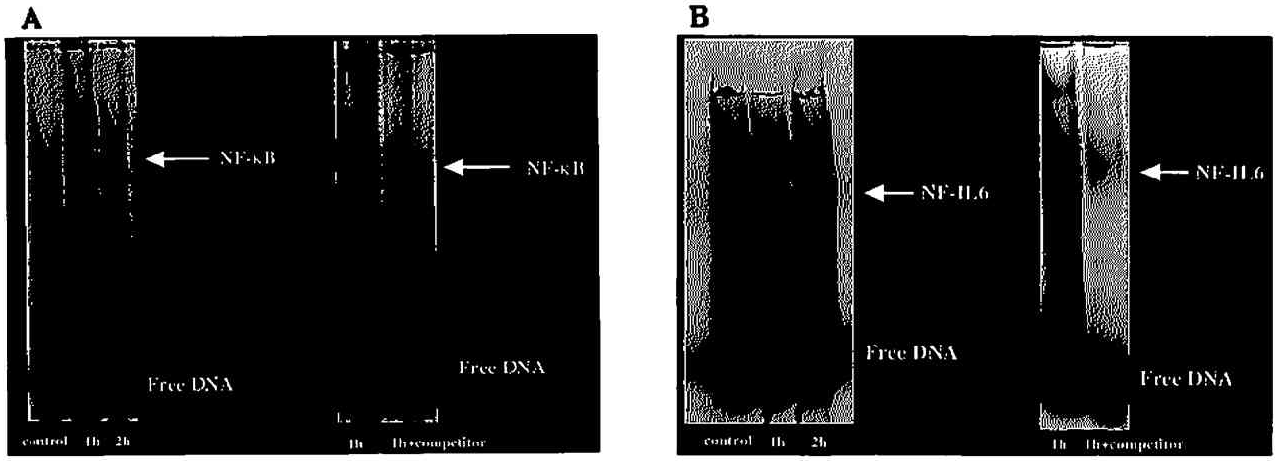
4．圧力負荷に伴う転写因子（NF-κB，NF-IL6）の検討

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-κB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

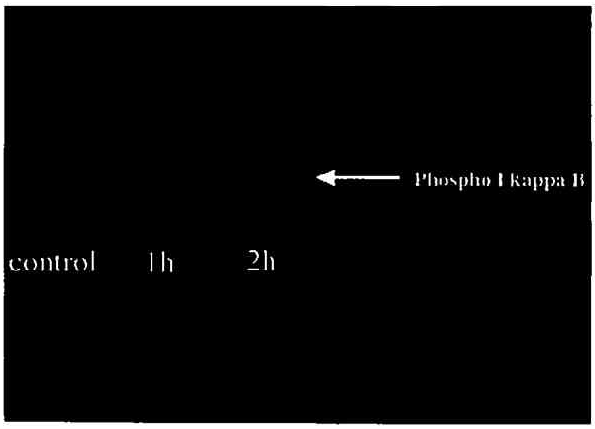




第5図　A：圧力負荷時のIEC-18細胞におけるIL-6 mRNA発現の検討．508bpのIL-6 mRNAは圧力負荷3時間後より認められ，12時間後まで持続した．内部標準として用いたGADPH mRNAを下段に示す．B：内部標準としてGADPH mRNAを用い，IL-6 mRNAとGAPDH mRNAのそれぞれをNIH imageにてpixel数を計算しグラフ化した．コントロール群を1とし，3，6，12時間後のIL-6 mRNAの相対変化を示した．各3検体より算出した平均値±標準偏差を表す．*p<0.05 vs control．（Kishikawa H et al：Clin Exp Immunol 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 IκB-α リン酸化の検討．80 mmHg での圧力負荷 1～2 時間後の phospho-IκB（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 IκB-α に対する抗体を用い western blot 法にて圧力負荷に伴う IκB-α のリン酸化を検討した．圧力負荷 1～2 時間後にかけて発現が増強しており IκB-α 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-κB 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[1]．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[16]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[16]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[17]．一方，Rollwagen[18]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TNFαやTGFβ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[14]．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）へ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[11]．また，McGee[11]らはIL-1β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-1β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[32~34]．腸上皮細胞では Mascarenhas[34]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-κB 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-κB の核内への移行については，既に抗 NF-κB 抗体を用いた免疫組織化学にて確認されている[2]．NF-κB 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[19]．NFκB 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]．Parikh[36]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-κB 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，Khaled[25]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-κB 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，Tomita[37]らは内皮細胞において TNF により産生が増加する IL-6 が NF-κB 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-κB 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[38,39]．

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-κB 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-κB の decoy により有意に抑制されたことから，NF-κB 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-κB 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-κB 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[40]．

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

1) Kellow JE, Phillips SF. Altered small bowel motility in irritable bowel syndrome is correlated with symptoms. Gastroenterology 92 : 1885-1893, 1987
2) 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
3) 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.
7) 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-cell-derived 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 interleukin-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.
21) Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of IκB-α proteolysis by site-specific, 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.

31) Anna Rubartelli, Federico Cozzolino, Marina Talio, Roberto Sitia. A novel secretory pathway for interleukin-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 IκBα 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