

Title	ラット小腸粘膜上皮細胞におけるGRO/CINC-1とInterleukin-6の産生：脂肪酸による修飾
Sub Title	
Author	吉田, 英雄(Yoshida, Hideo) 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.4 (2003. 12) ,p.T287- T296
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=AN00069296-20031201-0287

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

ラット小腸粘膜上皮細胞における GRO/CINC-1
と Interleukin-6 の産生：脂肪酸による修飾

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

よし だ じゅん せい
吉 田 英 雄

(平成 15 年 3 月 24 日受付)

Key Word : intestinal epithelial cell, fatty acid, GRO/CINC-1, interleukin-6, MAPK

小腸粘膜上皮細胞 (intestinal epithelial cells : IEC) は食物の吸収のみならず、小腸内腔の微生物や食物由来の抗原に対し、最前線での生体防御機構として機能している。さらに、小腸粘膜上皮細胞はサイトカインを産生し、また抗原提示細胞のように抗原を修飾し、分泌型多量体 IgA の輸送に関与し、積極的に腸管免疫ネットワークに関与している。これら上皮細胞由来の cell line もまた interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6) などの幾つかの炎症性サイトカインを分泌していることが知られている¹⁻⁴⁾。Growth-regulated oncogene α (GRO α) や IL-8 は C-X-C ケモカインに分類され、炎症反応の場において好中球の活性化と遊走に重要な役割を果たしている⁵⁾。グラム陰性菌、グラム陽性菌やクリプトスポリジウムが小腸粘膜上皮細胞に侵入した場合、C-X-C ケモカインが活性化することが今までに報告されている⁶⁻⁸⁾。小腸粘膜上皮細胞は IL-6 を産生することが McGee らにより報告され^{2,9)}、コレラ毒素が IL-6 産生を著しく増加させることが知られている^{3,10)}。IL-6 は炎症反応において重要なだけでなく B 細胞の IgA 分泌を促進させる点においても重要な役割を果たしている¹¹⁾。炎症性サイトカインである interleukin-1 β (IL-1 β), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) は小腸粘膜上皮細胞に作用すると IL-6 の分泌を増強し、両者の同時投与は IL-6 分泌をより一層増強させることが報告されている¹²⁾。これらの報告からいえることは、小腸粘膜上皮細胞は IL-8 や IL-6 の起源

として重要であり、分泌されるサイトカインは腸管の炎症や免疫と密接に関わっているということである。

一方、食物から摂取される脂肪は免疫機能を修飾することが知られている¹²⁻¹⁴⁾。

また飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸がリンパ球機能に変化を与えることが *in vitro*, *in vivo* での研究で報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。腸管リンパ管に存在するリンパ球の機能は脂肪の吸収に大きく影響され¹⁸⁾、オリーブ油の摂取は、T リンパ球のバイエル板にある毛細血管後静脈での移動を亢進させることが報告されている¹⁹⁾。以上から脂肪の吸収は免疫担当細胞の活性化を介して、腸管免疫に影響を与えることは想像されるが、小腸粘膜上皮細胞は脂肪への暴露により、どのように免疫機能に影響を与えるかはあまり知られていない。

IEC-6 は、ラット小腸粘膜上皮細胞から確立された細胞で *in vitro* での研究で頻回に使用される、非腫瘍性細胞で、形質転換することなく、寿命を持った細胞である。また、核、ゴルジ体、小胞体の形態が小腸粘膜上皮細胞、特に正常小腸陰窩細胞に似ている。つまり *in vivo* でのラット小腸粘膜細胞に共通する部分が多いとされている。分化した小腸上皮細胞は、寿命が短すぎるなどの点から形質転換なしでは培養が困難である。このため小腸に関しては、正常小腸陰窩細胞で *in vitro* の研究を行っているのが現状である。今回著者はこの細胞を使用した。まず長鎖脂肪酸投与が小腸粘膜上皮細胞から産生、放出される growth-regulated oncogene/cytokine-

本論文は Yoshida H, Miura S, Kishikawa H, Hirokawa M, Nakamizo H, Nakatsumi R, Suzuki H, Saito H, Ishii H : Fatty Acids Enhance GRO/CINC-1 and Interleukin-6 Production in Rat Intestinal Epithelial Cells. J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の一部を含む。

induced neutrophil chemoattractant-1 (GRO/CINC-1) (rat IL-8) と IL-6 にどのような影響を与えるかについて検討を行った。次に、IL-1 β , TGF- β 1 刺激下における脂肪酸投与が GRO/CINC-1, IL-6 に与える影響を検討した。上皮細胞と小腸粘膜免疫担当細胞との相互反応を脂肪酸がいかに修飾するかを解明する上で、これらの知見は有益な情報を与えると思われた。

材料と方法

1. 細胞と培養

IEC-6 細胞は The American Type Culture Collection (Rockville, MD) より購入した。IEC-6 細胞はラット小腸粘膜上皮細胞から確立された細胞で *in vitro* での研究で頻回に使用される。この細胞の特徴として正常小腸陰窩細胞の特性と共通する部分が多いことがあげられる²⁰⁾。

IEC-6 細胞を温度 37°C, 空気 95%, 二酸化炭素 5% の環境で培養した。培養液は 5% fetal bovine serum (FBS), 10 mg/L insulin, 50kU/L penicillin, 50 mg/L (DMEM) を使用した。Dish に培養されたこれらの細胞は trypsin を添加し、ゴム製スクレーパーではがし、900 g で 5 分間 4°C で遠心し細胞を回収した。これらの細胞を直径 2 cm の Dish に均一 (1×10^4 /dish) に撒き培養した。Subconfluence の状態に達した時点で実験に供し、脂肪酸ミセルを培養液に添加した。細胞数の正確な値は Cell Titer 96 AQ nonradioactive cell proliferation assay kit (Promega Madison, WI) を使用して、490 nm における吸光度を測定することにより算定した。さらに、propidium iodide (PI, Molecular Probes, Eugene OR) 染色を行い、PI 陽性細胞は細胞膜の傷害された細胞と判定した。

2. 脂肪酸の添加

添加する長鎖脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸、アラキドン酸 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) を使用した。長鎖脂肪酸をモノグリセリドおよびタウロコール酸に混合し、5% FBS を含んだ DMEM 培養液に溶解させ、各々の濃度は長鎖脂肪酸 19.2 mmol/L, モノオレイン 9.6 mmol/L, タウロコール酸ナトリウム塩 20 mmol/L とした。これら脂肪酸ミセルの作製は Johnston と Borgström の方法²¹⁾に従った。最終的には脂肪酸ミセルの培養液中濃度が 0.01~0.2 mmol/L になるようにした。また、オクタノイン酸ミセルはオクタノイン酸 (19.2 mmol/L) (Sigma) とタウロコール酸

塩 (20 mmol/L) から作製し、リン酸緩衝液で PH7.4 に調整した。

3. GRO/CINC-1 と IL-6 放出の決定

IEC-6 細胞の培養上清に脂肪酸ミセルを添加後、48 時間後に培養液を回収した。この培養液をポリプロピレンチューブに入れ、-70°C 下に保存した。培養液中の GRO/CINC-1 と IL-6 の濃度は sandwich enzyme immunoassay Kit (Immuno Biological Laboratories, Gunma, Japan) を用いて ELISA 法で測定した。抗 GRO/CINC-1 抗体または抗 IL-6 抗体でコーティングした 96 穴のマイクロプレートの各ウェルに、50 μ L の検体と 50 μ L のアッセイバッファー (0.05% の Tween 20, 10 g/L の bovine serum albumin を含む 0.01 mol/L PBS, PH 7.2) を入れ、37°C 1 時間で保温した。その後、PBS で洗浄し、Fab'-horse radish peroxidase (HRP) 結合抗 GRO/CINC-1 または抗 IL-6 ウサギ IgG を添加した。37°C, 30 分の保温後再度 PBS で洗浄し、色素剤として O-フェニレンジアミンを加え、15 分間暗室に放置した。反応停止剤 (H₂SO₄) を加え、ELISA reader (NJ-2000, Inter Med., Tokyo, Japan) を用いて 490 nm の波長下で吸光度を測定した。まず吸光度-濃度標準曲線の作成を行い、測定値をこの曲線上にプロットし、培養液中濃度を決定した。

4. IL-1 β , TGF- β と各種阻害薬の投与

IEC-6 細胞の培養液中にヒト recombinant IL-1 β (Sigma) またはブタ TGF- β 1 (Sigma) を最終濃度 0.05~2.0 μ g/L で投与した。その 48 時間後に GRO/CINC-1 と IL-6 の濃度を測定した。さらに、IL-1 β と TGF- β 1 の同時投与、また各種脂肪酸と組み合わせた投与をおこなった。

次に細胞内シグナル阻害薬を脂肪酸と同時に加え、脂肪酸により刺激された GRO/CINC-1 の濃度が各種阻害薬によりどのように変化をきたすかを測定した。

今回阻害薬として phospholipase C (PLC) 阻害薬である 2-nitro-4-carboxyphenyl-N,N'-diphenylcarbamate (NCDC; Sigma), protein kinase C (PKC) 阻害薬である 1-(5-isoquinolinylnylsulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7; Sigma) と staurosporine (Sigma), calmodulin 阻害薬である N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide hydrochloride (W-7; Sigma) を使用した。MAPK 阻害薬として 2-[2-amino-3-methoxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one (PD98059; Sigma), bis-[amino-[(2-aminophenyl) thio]

methylene butanedinitrite][U0126 ; BIOMOL Research Laboratory, Plymouth, PA) を使用した。

5. RNA 抽出と GRO/CINC-1 と IL-6 の PCR 増幅

RNAzol (Biotex, Houston, TX) を用いて IEC-6 細胞を溶解し、クロロホルムと混合後、イソプロパノールを加え遠心し、RNA を沈降させ、上清を取り除き、エタノールで洗浄した。抽出した RNA を 15 μ l の蒸留水に溶かし、260 nm の波長を当て、吸光度より RNA 濃度を計算した。さらに RNA の純度はアガロースゲル電気泳動を行い、28 S と 18 S のバンドの出現をみることで確認した。抽出した RNA は Stratagene (La Jolla, CA) の RT-PCR kit を用いて逆転写をおこなった。次に Takara Taq kit (Takara Biochemicals, Tokyo, Japan) と以下のプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を行った。

ラット GRO/CINC-1 のプライマーとして 5'-CTGTGCTGGCCACCAGCCGC-3'(sense) と 5'-ACAGTCCTTGGAATTCTCTG-3'(antisense) を用いた。この場合、増幅産物は 907 bp である。PCR の条件は 1) 94 $^{\circ}$ C で 3 分 incubation (initial denaturation) し、2) denaturation 94 $^{\circ}$ C 1 分, annealing 60 $^{\circ}$ C 1 分, extension 72 $^{\circ}$ C 3 分を 1 サイクルとし、合計 30 サイクル繰り返した。3) 最後に incubation を 72 $^{\circ}$ C 7 分 (final extension) 施行した。IL-6 のプライマーとして 5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTGC-3'(sense) と 5'-TAGCCACTCCTTCTCTGTGACTCTAACT-3' (antisense) を用いた。増幅産物は 508 bp である。1) 94 $^{\circ}$ C で 3 分 incubation (initial denaturation) し、2) denaturation 94 $^{\circ}$ C 1 分, annealing 58 $^{\circ}$ C 1 分, extension 72 $^{\circ}$ C 90 秒を 1 サイクルとし、合計 30 サイクル繰り返した。3) 最後に incubation を 72 $^{\circ}$ C 7 分 (final extension) 施行した。増幅産物は ethidium bromide で染色し、アガロースゲル電気泳動を施行、紫外線トランスイルミネーター上で可視化した。GRO/CINC-1、IL-6 mRNA の総量はバンドの発色強度を測定することで評価した。具体的にはスキャナーでパソコンに写真を取り込み、バージョン 1.61 NIH-Image の Grayscale で発色強度を測定し、計測数値から標準偏差を求めた。総 RNA 量が一定していることを証明するため、GAPDH mRNA の PCR 増幅も同時に行った。

6. MAPK 活性の計測

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は P44/42 MAPK assay kit (New England Biolabs,

beverly, MA) を用いて測定した。培養した IEC-6 細胞群を 3 プレートに分け、1 つには脂肪酸投与前、もう 1 つには投与 1 時間後、最後の 1 つには投与 3 時間後に細胞溶解液を添加した。スクレーパーで剥がし、ソニケーターで破砕し、各々総蛋白量 150 μ g を回収した。P44/42 MAPK モノクローナル抗体と反応させ、次にプロテイン A セファロースビーズと反応後、遠心した。沈降産物にキナーゼバッファー、ATP と MAPK の基質である Elk-1 fusion protein を添加し、30 $^{\circ}$ C で反応させた。これにより、活性化 MAPK はリン酸化 Elk-1 (phospho-specific Elk-1) として認められることになる。次に 3X SDS サンプルバッファーを加え反応を停止させ、タンパク質を変性させた。遠心し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ゲルに上清を注入して電気泳動を行った。ウェスタンブロッティングは次の如くおこなった。

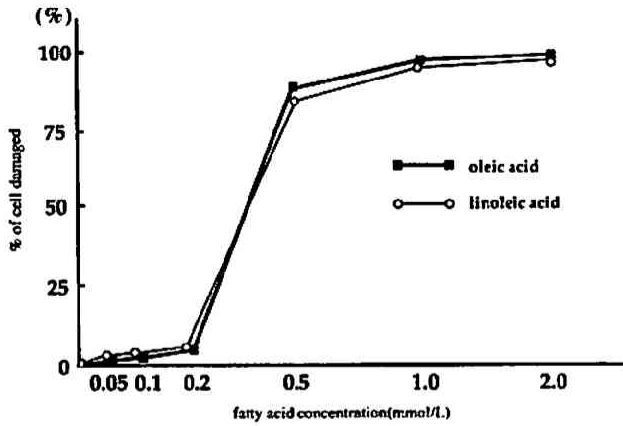
タンパク質はニトロセルロース膜に転写した。まずブロッキングバッファーと反応後、一次抗体として phospho-specific Elk-1 抗体を一晩、4 $^{\circ}$ C で反応させた。翌日 HRP-結合抗ウサギ二次抗体とマーカーを化学発光させるための HRP-結合ビオチン抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。膜を 3 回洗浄 (Tris-buffer, Tween²⁰) し、1X LumiGLO と反応させた。膜は X 線フィルムで撮影し、脂肪酸投与前後のバンドの強さの変化を NIH-Image を用いて測定した。

7. 統計学的解析

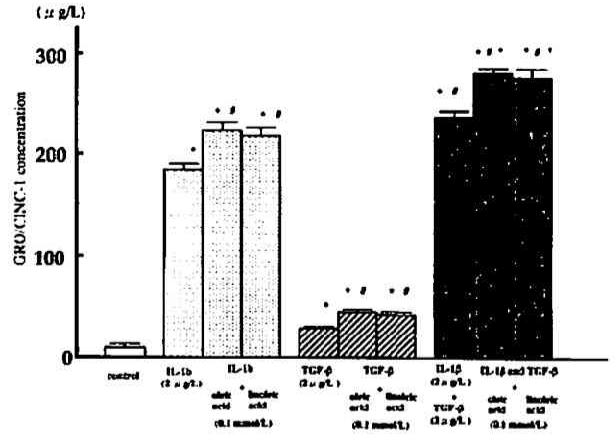
すべての結果は means \pm SEM として表し、グループ間の有意差は one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた。有意差を認めた場合、post hoc test として Fisher's test を行った。すべての検定は $P < 0.05$ をもって有意と判断した。

結 果

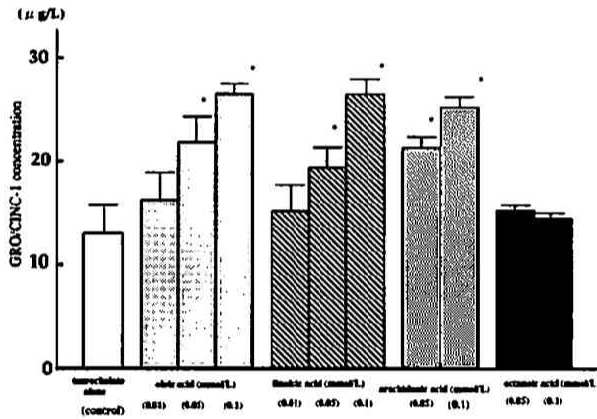
各種濃度の脂肪酸を培養上清に添加し、48 時間後に IEC-6 細胞の細胞傷害の程度を PI 陽性細胞の占める割合として測定した (第 1 図)。リノール酸とオレイン酸いずれも投与により PI 陽性細胞数が散見されるようになり、0.2 mmol/L の濃度を越えると急に増加しはじめ、0.5 mmol/L を越えると 100% に近づいた。つまり脂肪酸は低い濃度でも若干の細胞障害を示すが、0.2 mmol/L 以上の濃度になると急激にその程度が顕著となり、多くが細胞死に至るため、0.2 mmol/L 以下の濃度で投与する必要があると考えられた。また 0.1



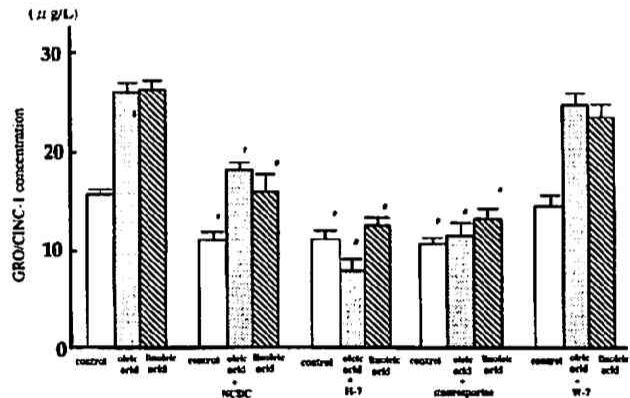
第1図 IEC-6細胞の viability に対する脂肪酸の効果。値は種々の脂肪酸濃度下における培養48時間後の傷害細胞 (propidium iodide 陽性細胞) の出現率をパーセンテージで示す (n=4)。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 1 を許可を得て転載)



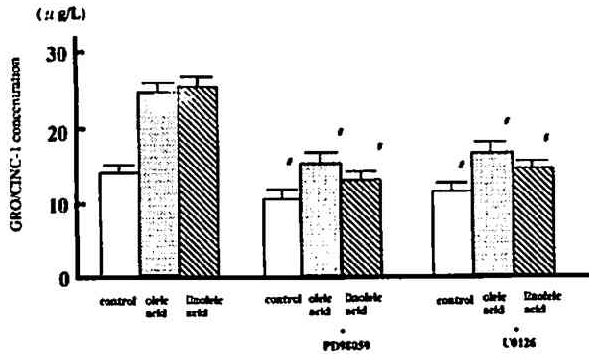
第3図 長鎖脂肪酸, TGF-β, IL-1β 投与による IEC-6 細胞からの GRO/CINC-1 放出の変化。TGF-β, IL-1β, 長鎖脂肪酸 (オレイン酸, リノール酸) を投与し, 48 時間培養後, ELISA 法で培養上清中の GRO/CINC-1 濃度を測定した。タウロコール酸単独投与をコントロールとした。値は means ± SEM 示す。n=6, *P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群, *P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与, *P<0.05 vs. TGF-β + IL-1β。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 3 を許可を得て転載)



第2図 脂肪酸が与える IEC-6 細胞からの GRO/CINC-1 放出の変化。各濃度の脂肪酸投与48時間後, ELISA 法によって培養上清中の GRO/CINC-1 濃度を測定した。長鎖脂肪酸としてオレイン酸, リノール酸, アラキドン酸を用い, 中鎖脂肪酸としてオクタノイン酸を用いた。タウロコール酸 (0.1 mmol/L) 単独投与をコントロールとして用いた。値は means ± SEM 示す。n=6, *P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 2 を許可を得て転載)



第4図 細胞内シグナル伝達阻害薬による IEC-6 細胞からの GRO/CINC-1 放出の変化。各種阻害薬として NCDC (200 μmol/L), H-7 (30 μmol/L), staurosporine (3 nmol/L) および W-7 (30 μmol/L) を投与した。長鎖脂肪酸投与下と非投与下の状態において観察した。ELISA 法で培養上清中の GRO/CINC-1 濃度を測定した。値は means ± SEM 示す。n=6, *P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群もしくは脂肪酸単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 4 を許可を得て転載)

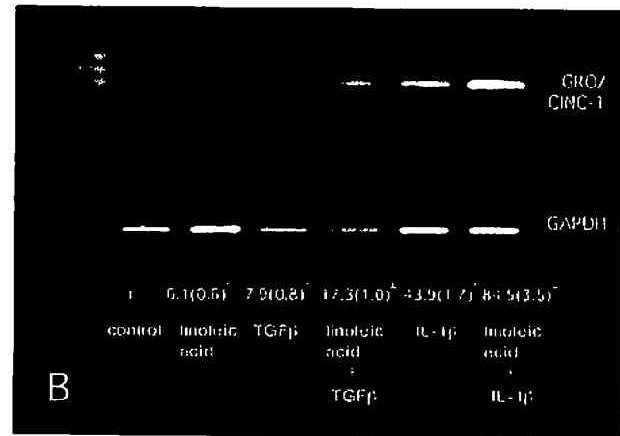
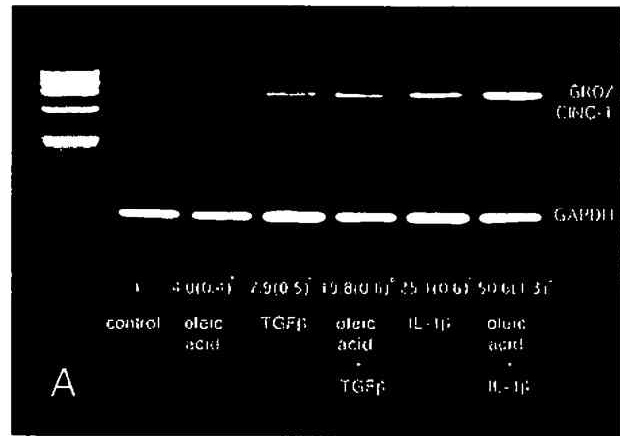


第5図 MAPK 阻害薬が与える IEC-6 細胞からの GRO/CINC-1 の放出の変化。長鎖脂肪酸投与下と非投与下において、MAPK 阻害薬である PD98059 (50 µmol/L), U0126 (20 µmol/L) を添加した。ELISA 法で培養上清中 GRO/CINC-1 の濃度を測定した。値は means±SEM. で示す。n=6。*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群もしくは脂肪酸単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 5 を許可を得て転載)

mmol/L の脂肪酸投与群ではタウロコール酸単独投与群 (コントロール群) と比較し、細胞数の増加に与える変化は認められなかった (オレイン酸投与群はコントロール群に対し 91.9±5.9%, リノール酸投与群はコントロール群に対し 96.3±4.0%であった)。

IEC-6 細胞の培養液中に存在する GRO/CINC-1 濃度は各種脂肪酸の投与により増加傾向を示した (第2図)。オレイン酸の培養液中濃度が 0.05 mmol/L 以上の場合、タウロコール酸単独投与群 (コントロール群) に比較して、明らかな増加を認め、濃度依存性にその増加はより顕著となった。また、タウロコール酸単独投与群と無添加群とでは有意差は認められなかった。リノール酸、アラキドン酸の投与群においても濃度依存的に増加を示した。しかし、オクタノイン酸投与群に関してはタウロコール酸単独投与群と比較して、有意差は得られなかった。

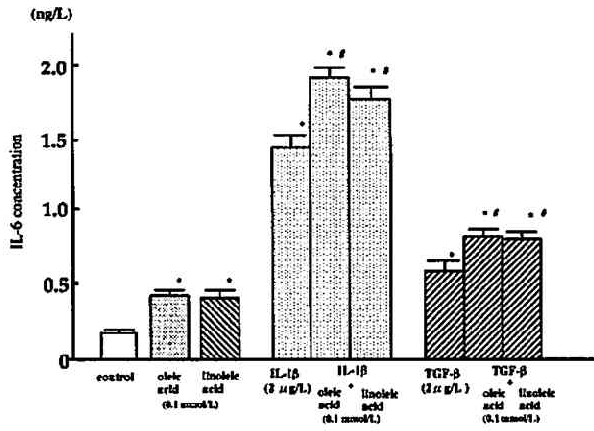
IL-1βはそれ自身単独投与で GRO/CINC-1 の濃度を増加させることが知られている。今回の実験でも 2 µg/L の IL-1β投与で GRO/CINC-1 の濃度は 181±6 µg/L を示した。TGF-βも同じく単独投与で GRO/CINC-1 の濃度を増加させることが知られており、2 µg/L の投与で GRO/CINC-1 の濃度は 30±1 µg/L を示した。オレイン酸もしくはリノール酸投与は IL-1β, TGF-β 単独投与による GRO/CINC-1 濃度の増加作用に一層の修飾を与えることが明らかとなった (第3図)。IL-1β (2 µg/L) と TGF-β (2 µg/L) の同時投与群は GRO/CINC-1 の濃度を 243±6 µg/L と著明に増加させたが、



第6図 IEC-6 細胞に脂肪酸、TGF-β、IL-1β投与6時間後の GRO/CINC-1 mRNA 発現の比較。IL-1β (2 µmol/L), TGF-β (2 µmol/L) および図 A ではオレイン酸 (0.1 mmol/L), 図 B ではリノール酸 (0.1 mmol/L) を投与した。GRO/CINC-1 mRNA 発現の強さを RT-PCR 法にて検討した。GRO/CINC-1 mRNA は 907 bp で認められる。NIH-Image を用いて染色強度を測定した。値は means±SEM. で示す。n=4。*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群。*P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 6 を許可を得て転載)

さらにオレイン酸を添加すると、280±6 µg/L となり、リノール酸を添加した場合、275±8 µg/L に達した。

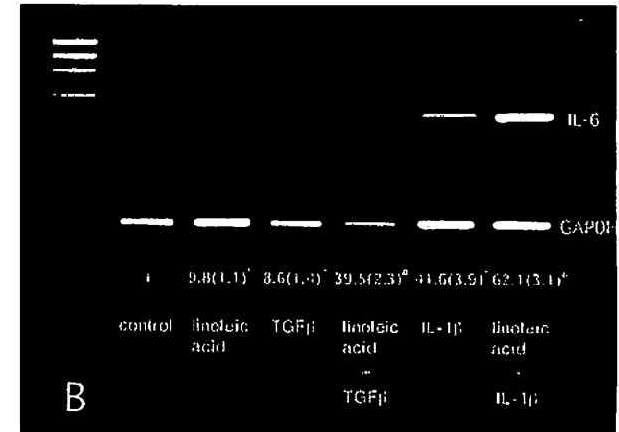
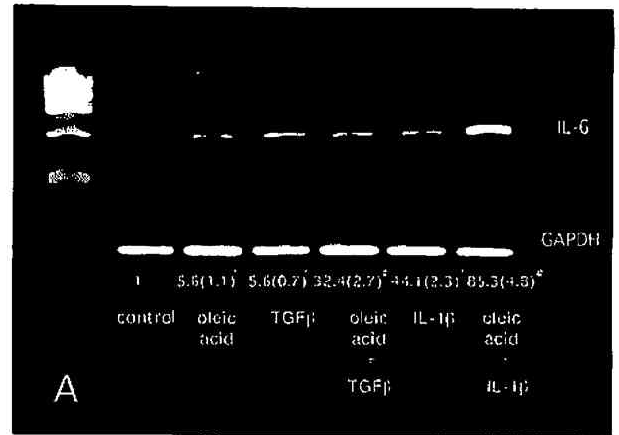
IEC-6 細胞から放出される GRO/CINC-1 に対し、細胞内シグナル阻害薬の効果を検討した (第4図)。タウロコール酸単独投与群 (コントロール群) では PLC 阻害薬である NCDC (200 µmol/L) と PKC 阻害薬である H-7 (30 µmol/L), staurosporine (3 nmol/L) の投与により GRO/CINC-1 濃度の低下を認めた。一方、calmodulin 阻害薬である W-7 (30 µmol/L) の投与では GRO/CINC-1 濃度に変化を与えなかった。また、オ



第7図 長鎖脂肪酸, TGF-β, IL-1βの組み合わせ投与による IEC-6 細胞からの IL-6 放出の変化. TGF-β, IL-1β, 長鎖脂肪酸 (オレイン酸, リノール酸) を投与し, 48 時間培養後, ELISA 法で培養上清中の IL-6 濃度を測定した. タウロコール酸単独投与をコントロールとした. 値は means±SEM. で示す. n=6. *P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与とコントロール群. **P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与群. (Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 7 を許可を得て転載)

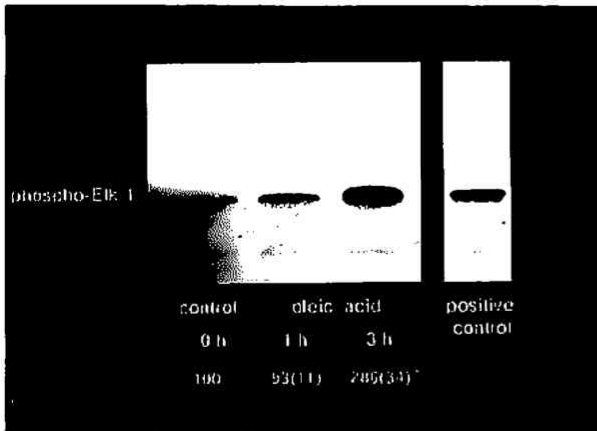
レイン酸またはリノール酸刺激により増加した GRO/CINC-1 濃度は NCDC, H-7, staurosporine の投与により, 更に大きな抑制効果を受け, 阻害薬投与前のコントロール群とほぼ同レベルまで下がった. W-7 の投与による有意な抑制はなかった. 次に MAPK 阻害薬として PD98059 (50 μmol/L), U0126 (20 μmol/L) を使用し, 検討をおこなった (第5図). これら MAPK 阻害薬の投与はタウロコール酸単独投与群 (コントロール群) において, IEC-6 細胞から放出される GRO/CINC-1 濃度を有意に抑制させた. オレイン酸もしくはリノール酸投与群においては, 上昇した GRO/CINC-1 濃度はこれら MAPK 阻害薬の投与により, より大きな抑制効果を認めた.

オレイン酸, リノール酸刺激 6 時間後の GRO/CINC-1 mRNA 量の変化を RT-PCR 法を使って検討した (第6図). さらに IL-1β, TGF-β 単独刺激, またこれらサイトカインと脂肪酸の同時投与 6 時間後の変化も検討した. コントロール群では GRO/CINC-1 mRNA はほとんど認めることができなかった. 第6図 A のオレイン酸または TGF-β 単独投与では弱いながらもバンドを認め, IL-1β 単独投与では強く認められた. この結果は ELISA で得られた結果と一致していた. オレイン酸と TGF-β あるいは IL-1β との同時投与は



第8図 IEC-6 細胞に脂肪酸, TGF-β, IL-1β 投与 6 時間後の IL-6 mRNA 発現の比較. IL-1β (2 μmol/L), TGF-β (2 μmol/L) および図 A ではオレイン酸 (0.1 mmol/L), 図 B ではリノール酸 (0.1 mmol/L) を投与した. IL-6 mRNA 発現の強さを RT-PCR 法にて検討した. IL-6 mRNA は 508 bp で認められる. NIH-Image を用いて発色強度を測定した. 値は means±SEM. で示す. n=4. *P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与とコントロール群. **P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与群. (Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 8 を許可を得て転載)

TGF-β, IL-1β 単独投与に比較し, バンドの増強を認めた. 第6図 B で示したリノール酸投与においてもオレイン酸と同様の結果が得られた. IEC-6 細胞の培養上清に長鎖脂肪酸 (オレイン酸, リノール酸) さらには TGF-β, IL-1β を組み合わせて投与し, 投与 48 時間後における培養液中 IL-6 濃度を測定した (第7図). オレイン酸またはリノール酸を 0.1 mmol/L の濃度で投与した時, タウロコール酸単独投与群 (コントロール群) に比較し, IL-6 濃度は有意な上昇を示した. しかし, オクタノイン酸の投与群では有意差は認められなかった.



第9図 脂肪酸が与えるIEC-6細胞のMAPK活性の変化。オレイン酸投与前、1時間後および3時間後にMAPKリン酸化反応をウェスタンブロット法で測定した。発色強度をNIH-Imageを用いて測定した。コントロールを100とした。値はmeans±SEM.で示す。n=4。*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001のFig. 9を許可を得て転載)

IL-1 β 単独投与群(2 μ g/L)はIL-6濃度が1.44 \pm 0.09 ng/Lと著明な上昇を認めた。TGF- β 単独投与群でも0.60 \pm 0.08 ng/Lに達した。オレイン酸またはリノール酸とIL-1 β との組み合わせ投与群ではそれぞれIL-6濃度は1.93 \pm 0.07 ng/L, 1.77 \pm 0.09 ng/Lであった。TGF- β と長鎖脂肪酸の組み合わせ投与群でもTGF- β 単独投与群より更なる増強を認めた。脂肪酸, TGF- β , IL-1 β 投与6時間後のIL-6 mRNA量の変化を調べた(第8図)。第8図Aではオレイン酸, TGF- β 投与でバンドの増強を認めた。IL-1 β 単独投与においても有意なバンドの増強を示した。そして、脂肪酸+IL-1 β の投与は、単独投与よりも増強を示した。第8図Bのリノール酸投与においても、脂肪酸+IL-1 β の投与は、単独投与よりも増強を示した。つまり、ほぼオレイン酸と同様の結果が得られた。IEC-6細胞のMAPKの活性化により、Elk-1 fusion proteinのリン酸化反応が起こる。この変化をオレイン酸投与前後で検討した。ウェスタンブロットを用い、MAPKの活性化の程度をElk-1のリン酸化反応の程度として検討した。投与前および投与1時間後では有意差は認められなかったが、3時間後では有意な増強を認めた(第9図)。

考 察

小腸粘膜上皮細胞は絶えず栄養分を含む様々な物質に暴露されている。また、上皮細胞は炎症や病原菌などに反応してサイトカインを放出することはよく知られている^{1,22)}。しかし、正常環境において小腸粘膜上皮は種々の物質にどのような反応を示すかはあまり知られていない。不飽和脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸はいずれもリポ蛋白のサブクラスで重要な位置を占め、食物中にも豊富に含まれている。それゆえ、著者はこれらの脂肪酸を選択し、上皮細胞への反応を検討することとした。そして小腸粘膜上皮細胞は長鎖脂肪酸の刺激により、GRO/CINC-1, IL-6のような炎症性サイトカインの分泌を増加させることを明らかにした。種々の脂肪酸がリンパ球、マクロファージ等の免疫反応を修飾することが報告されている^{18,23,24)}。著者らの教室でもオレイン酸の吸収が小腸リンパ管内のリンパ球を刺激することを報告している¹⁹⁾。長鎖不飽和脂肪酸は上皮細胞からのサイトカイン分泌を刺激することで、小腸粘膜の炎症反応を調節していることが本研究により強く示唆された。また、中鎖脂肪酸は直接門脈に運ばれ、上皮細胞では代謝を受けないと考えられている²⁵⁾。興味深いことに、今回の研究においてもIEC-6細胞では中鎖脂肪酸がサイトカインの分泌に変化を与えなかった。

ラットGRO/CINC-1は72個のアミノ酸から成り、IL-8スーパーファミリーの一つとされている²⁶⁾。GRO/CINC-1の作用の一つとして、好中球の運動分泌能の活性化があり、当研究室において*in vivo*の実験系で証明している²⁷⁾。IL-8は顆粒球、内皮細胞、線維芽細胞、T細胞、角質細胞、マクロファージから分泌される²⁸⁾。そして小腸粘膜上皮細胞からも分泌されている^{1,6)}。また、短鎖脂肪酸である酪酸も小腸上皮細胞を刺激して、IL-8産生能を修飾している可能性がある²⁹⁾。さらに、酪酸はIL-1 β またはLPS(lipopolysaccharide)との同時投与により強いIL-8分泌を誘導することが報告されている²⁹⁾。今回の研究からIEC-6細胞は長鎖脂肪酸で刺激されると、IL-6分泌を増強することが証明された。IL-6は急性炎症反応、マクロファージの分化、T細胞増殖の誘導を含む幅広い作用を有している³⁰⁾。またIL-6は単独¹¹⁾もしくはIL-5との組み合わせで、パイエル板のB細胞にIgA産生を惹起することが知られている。長鎖脂肪酸は上皮細胞からのGRO/CINC-1やIL-6のような炎症性サイトカインの分泌を促進する。即ち、今回の検討より長鎖脂肪酸はこれら2つのサイトカイン

分泌を介して、感染防御を含む小腸免疫機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

IEC-6細胞はIL-1 β もしくはTGF- β 刺激を受けるとIL-6分泌を増強し、両者の同時刺激では、一層強く分泌を増強するとMcGeeらは報告している³¹⁾。今回の研究から、脂肪酸+IL-1 β または脂肪酸+TGF- β の投与により、GRO/CINC-1やIL-6はより強く分泌されることが証明された。コントロール対脂肪酸単独投与による上昇程度に比べ、サイトカイン単独対脂肪酸+サイトカイン投与による上昇程度はより大きかった。IL-1 β 、TGF- β 刺激に対し、相乗作用もしくは強い修飾作用を脂肪酸は与えるものと考えられた。C-X-Cケモカインの分泌に至る細胞内伝達機構は脂肪酸刺激による場合とサイトカイン刺激による場合とは異なる可能性が考えられた。高濃度のIL-1は活動期の炎症性腸疾患、病原性大腸菌感染時、実験的に誘発された大腸炎で認められる³¹⁾。IL-1やIL-6と同様TGF- β も炎症反応に関与している^{32,33)}。著者の今回の研究から、サイトカイン刺激下の小腸上皮細胞は、さらに長鎖脂肪酸刺激を受けるとC-X-Cケモカイン、IL-6の分泌を有意に促進することが示唆された。つまり、粘膜の炎症反応においても、脂肪酸への暴露は重要な役割を果たしていると考えられた。著者らの研究室では、オレイン酸を多く含有した食事をラットに摂取させ、腸間膜リンパ節などの小腸免疫機構にどのような効果を与えるかについて報告しているが³⁴⁾、食物中の脂肪酸は腸管リンパ組織の免疫学的機能を修飾し、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患の病態を左右する重要な因子であると考えられる。

脂肪酸刺激からサイトカイン産生に至る細胞内シグナル伝達経路を検討する目的で種々のシグナル阻害薬をIEC-6細胞に投与した。脂肪酸刺激のない状態ではGRO/CINC-1の産生はphospholipase C (PLC) 阻害薬であるNCDC³⁵⁾およびprotein kinase C (PKC) 阻害薬であるH-7やstaurosporine³⁶⁾により一部抑制された。つまり、GRO/CINC-1の産生にPLC、PKCの活性化が一部関与していることを示している。一方脂肪酸刺激で誘導されたGRO/CINC-1は、NCDCおよびH-7、staurosporineにより大きく抑制された。これは脂肪酸刺激を介してGRO/CINC-1が産生される細胞内伝達経路にはPLCとPKCが非常に重要な役割を果たしていることを示している。生理学的にPKCはジアシルグリセロールにより活性化される。ジアシルグリセロールはPLCによるホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸の加水分解の結果発生し、副産物として、1,4,5-イノシトール3リン酸(IP3)が生じる。IP3はカルシ

ウムの移動に関与している。しかし、興味深いことに脂肪酸刺激で誘導されたGRO/CINC-1はカルモジュリン阻害薬であるW-7投与では有意な抑制はみられなかった。この点については今後も検討の必要性があると思われる。

MAPKファミリーであるERK1とERK2は細胞外シグナル調節キナーゼであり、蛋白のリン酸化を通して細胞の機能を修飾している。そして様々な方法で遺伝子発現を調節している。例えば、ERK1/2はp90rskとp62YCFをリン酸化する。p90rskは蛋白合成を刺激するS6キナーゼであり、p62YCFはc-fos転写を増強する転写因子である³⁷⁾。消化管ではMAPKシグナル伝達経路の活性化は傷害を受けた粘膜の治癒に重要な役割を果たしていると思われる。Salmonella typhimurium感染によるMAPKの活性化は、AP-1とnuclear factor- κ B転写の活性化を誘導し、続いてIL-8を含む炎症性サイトカインの合成を促すことがHobbieらにより証明された³⁸⁾。また、tumor necrosis factor- α 刺激は、p38MAPKの抑制を介してIL-6産生を抑制するとの報告もある³⁹⁾。IEC-6細胞における脂肪酸刺激下のGRO/CINC-1産生は、MAPK阻害薬(PD98059, U0126)^{40,41)}により強く抑制されることが今回の研究で認められた⁴²⁾。即ち長鎖脂肪酸に暴露された小腸上皮細胞において、ERK1/2刺激とサイトカイン産生との間に密接な関連している可能性が示唆されたが、その詳細な経路の解明には今後の研究が必要である。

総 括

外界と生体との境界であり、第一線の生体防御機構の場である小腸粘膜上皮細胞が、長鎖脂肪酸吸収の際に腸管免疫ネットワークに与える変化を、*in vitro*の系で検討した。その結果、上皮細胞は長鎖脂肪酸の刺激で、炎症性サイトカイン(GRO/CINC-1、IL-6)の分泌を増加させることが明らかとなった。しかし、中鎖脂肪酸の刺激では増加を示さなかった。TGF- β またはIL-1 β 投与でもこれらサイトカイン分泌は増加するが、長鎖脂肪酸の同時投与は相加的効果を与え、さらなる増強を示した。上皮細胞からの炎症性サイトカイン分泌には長鎖脂肪酸刺激下では、細胞内シグナルとしてPLCとPKCが重要な因子であることが認められた。さらに、上皮細胞内MAPKの活性化が証明され、MAPK阻害薬の同時投与はGRO/CINC-1の有意な低下を示した。即ち脂肪酸刺激とサイトカイン合成にはMAPKが深く関わっている可能性が示唆された。以上のことから、脂肪酸と

腸管の炎症とは密接に関係しており、炎症性腸疾患をはじめとする腸炎の治療において、食事療法の重要性を認識することはもちろんのことであるが、今後も腸管炎症の発症機序と増悪因子の解明に努め、サイトカインまたはその活性経路を制御する薬剤の開発を進めていく必要性があると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲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石井裕正教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり直接御指導いただきました防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に深謝申し上げます。また、貴重な御助言、御協力をいただきました研究室の諸先生方に深謝いたします。

本研究の一部は第84回日本消化器病学会総会（1998年横浜）、第40回日本消化器病学会大会（1998年東京）、第29・30回日本消化吸収学会（1998年東京、1999年岐阜）、American Gastroenterological Association（1998年ニューヨーク、1999年オランダ）にて発表した。

文 献

- Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF : Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105 : 1689-1697, 1993
- McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR : Transforming growth factor- β enhances interleukin-6 secretion by intestinal epithelial cells. *Immunology* 77 : 7-12, 1992
- McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR : Transforming growth factor β and IL-1 β act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Immunol* 151 : 970-978, 1993
- Jung HC, Eckmann L, Yang S, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF : A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95 : 55-65, 1995
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B : Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol* 55 : 97-179, 1994
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J : Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 61 : 4569-4574, 1993b
- McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL : Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers : transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 123 : 895-907, 1993
- Laurent F, Eckmann L, Savidge TC, Morgan G, Theodos C, Naciri M, Kagnoff MF : Cryptosporidium parvum infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokine. *Infect Immun* 65 : 5067-5073, 1997
- Bromander AK, Kjerrulf M, Holmgren J, Lycke N : Cholera toxin enhances alloantigen presentation by cultured intestinal epithelial cells. *Scand J Immunol* 37 : 452-458, 1993
- McGee DW, Elson CO, McGhee 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, 1993b
- Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, Kiyono H, Everson MP, Koopman WJ, Hirano T, Kishimoto T, McGhee JR : Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* 169 : 213-2148, 1989
- Kelley DS, Nelson GJ, Serrato CM, Schmidt PC, Branch LB : Effect of type of dietary fat on indices of immune status of rabbit. *J Nutr.* 118 : 1376-1384, 1988
- Gurr MI : The role of lipids in the regulation of the immune system. *Prog Lipid Res* 22 : 257-287, 1983
- Erickson KL : Dietary fat modulation of immune response. *Int J Immunopharmacol* 8 : 529-543, 1986
- Cuthbert JA, Lipsky PE : Promotion of human T lymphocyte activation and proliferation by fatty acids in low density and higher density lipoproteins. *J Biol Chem* 261 : 3620-3627, 1986
- Cuthbert JA, Lipsky PE : Lipoproteins may provide fatty acids necessary for human lymphocyte proliferation by both low density lipoprotein receptor-dependent and-independent mechanisms. *J Biol Chem* 264 : 13468-13474, 1989
- Tebbey PW, Buttke TM : Molecular basis for the immunosuppressive action of stearic acid on T cells. *Immunology* 70 : 379-386, 1990
- Miura S, Imaeda H, Shiozaki H, Ohkubo N, Tashiro H, Serizawa H, Tsuchiya M, Tso P : Increased proliferative response of lymphocytes from intestinal lymph during long chain fatty acid absorption. *Immunology* 78 : 142-146, 1993
- Tsuzuki Y, Miura S, Kurose I, Suematsu M, Higuchi H, Shigematsu T, Kimura H, Serizawa H, Hokari R, Akiba Y, Yagita H, Okumura K, Tso P, Granger DN, Ishii H : Enhanced lymphocyte interaction in postcapillary venules of Peyer's patches during fat absorption in rats. *Gastroenterology* 112 : 813-825, 1997
- Quaroni A, Wands J, Trestad TL, Isselbacher KJ : Epithelial cell cultures from rat small intestine. *J Cell Biol* 80 : 245-265, 1979

- 21) Johnston JM, Borgstrom B : The intestinal absorption and metabolism of micellar solutions of lipids. *Biochim Biophys Acta* 84 : 412-423, 1964
- 22) Gibson P, Rosella O : Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells *in vitro* : response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* 37 : 536-543, 1995
- 23) Bates EJ, Ferrante A, Harvey DP, Poulos A : Polysaturated fatty acids increase neutrophil adherence and integrin receptor expression. *J Leukoc Biol* 53 : 420-426, 1993
- 24) Yongqin L, Ferrante A, Poulos A, Harvey DP : Neutrophil oxygen radical generation. Synergistic responses to tumor necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids. *J Clin Invest* 97 : 1605-1609, 1996
- 25) Greenberger VJ, Rodgers JB, Isselbacher KH : Absorption of medium and long chain triglycerides : factors influencing their hydrolysis and transport. *J Clin Invest* 45 : 217-227, 1966
- 26) Watanabe K, Kinoshita S, Nakagawa H : Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell). *Biochem Biophys Res Commun* 161 : 1093-1099, 1989
- 27) Suzuki H, Suematsu M, Miura S, Liu YY, Watanabe K, Miyasaka M, Tsurufuji S, Tsuchiya M : Rat CINC/gro : a novel mediator for locomotive and secretagogue activation of neutrophils *in vivo*. *J Leukoc Biol* 55 : 652-657, 1994
- 28) Oppenheim JJ, Zachariar COC, Mukaida N, Matsushima K : Properties of the novel inflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9 : 617-648, 1991
- 29) Fusunyan RD, Quinn JJ, Ohno Y, MacDermott RP, Sanderson IR : Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1 β and lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 43 : 84-90, 1998
- 30) Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T : Biology of multifunctional cytokines : IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 4 : 2860-2867, 1990
- 31) Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewit D : Role of interleukin-1 in inflammatory bowel disease-enhanced production during active disease. *Gut* 31 : 686-689, 1990
- 32) Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey JR, Moses HL : Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type b. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86 : 1578-1582, 1989
- 33) Koyama S, Podolsky DK : Differential expression of transforming growth factor α and β in rat intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 83 : 1768-1773, 1989
- 34) Serizawa H, Miura S, Imaeda H, Tanaka S, Kimura H, Tsuzuki Y, Han JY, Toda K, Hamada Y, Tsuchiya M, Ishii H : Reversal of altered intestinal mucosal immunity in rats fed elemental diet by supplementation of oleic acid. *J Gastroenterol Hepatol* 11 : 811-818, 1996
- 35) Nakaki T, Roth BL, Chuang DM, Costa E : Phasic and tonic components in 5HT₂ receptor-mediated rat aorta contraction : Participation of Ca²⁺ channels and phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* 234 : 442-446, 1985
- 36) Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y : Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 266 : 1265-1268, 1991
- 37) Takahashi M, Berk BC : Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase. *J Clin Invest* 98 : 2623-2631, 1996
- 38) Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE : Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 159 : 5550-5559, 1997
- 39) Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Haegeman G, Cohen P, Fiers W : The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 15 : 1914-1923, 1996
- 40) Dionne S, D'Agata ID, Ruemmele FM, Levy E, St-Louis J, Srivastava AK, Levesque D, Seidman EG : Tyrosine kinase and MAPK inhibition of TNF- α and EGF-stimulated IEC-6 cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 242 : 146-150, 1998
- 41) Choi C, Xu X, Oh JK, Lee S J, Gillespie Y, Park H, Jo H, Benveniste EN : Fas-induced expression of chemokines in human glioma cell : involvement of extracellular signal-activated protein kinase. *Cancer Res* 61 : 3084-3091, 2001
- 42) Yoshida H, Miura S, Kishikawa H, Hirokawa M, Nakamizo H, Nakatsumi R, Suzuki H, Saito H, Ishii H : Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr* 131 : 2943-2950, 2001