

複合培養系を用いた腸管上皮細胞とマクロファージ様細胞の相互作用の解析

石本 容子

東京大学大学院農学生命科学研究科 博士課程

緒 言

腸管は栄養素の吸収器官としての働き以外に異物に対する防御機構を備えている。その1つが腸管免疫系であり、腸管上皮細胞とその直下の粘膜固有層等に存在する免疫細胞から構成されている。腸管上皮細胞と免疫細胞は液性因子などを介して互いに制御しあっており、その破綻が腸管の炎症の一因であることが知られている。例えば、近年患者数が増大しているクローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease；IBD）は小腸や大腸に潰瘍ができる治療困難な腸疾患であり、腸管免疫系を制御するサイトカインの産生異常に起因する。特にクローン病では、異常亢進したマクロファージが産生する炎症性サイトカイン TNF- α により腸管上皮細胞が傷害を受けることが明らかにされており、臨床では抗 TNF- α 抗体が症状緩和に効果をあげている。しかしながらその副作用には十分な注意が必要であり、より安全な治療法が期待されている。

本研究では、腸炎症発症の分子メカニズムに関するさらなる情報取得をめざして、腸管上皮 Caco-2 細胞と腸管の炎症時に活性化されていることが知られているマク

ロファージ様 THP-1 細胞からなる複合培養系を構築した（図 1）。今までに、①複合培養することで Caco-2 細胞が傷害を受けること、②その傷害に THP-1 細胞の産生する TNF- α などの液性因子が関与していること、③このとき Caco-2 細胞ではアポトーシスとネクローシスが混在していることが分かってきている¹⁾。これらの現象は炎症時の小腸の状態と類似しており、この複合培養系を、サイトカインの異常産生により引き起こされる腸炎症の *in vitro* モデル系として使い、2種の細胞間相互作用時に起きる現象の詳細な解析をおこなった。

実験方法

腸管上皮細胞、マクロファージ様細胞のモデルとして、それぞれヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞及びヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞を用いた。インサート（管腔側）の透過性膜上に Caco-2 細胞を単層培養して小腸上皮様に分化させ、その基底膜側に PMA 処理によりマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞を配置することで複合培養開始とした（図 1）。

複合培養することで Caco-2 細胞が受ける影響につい

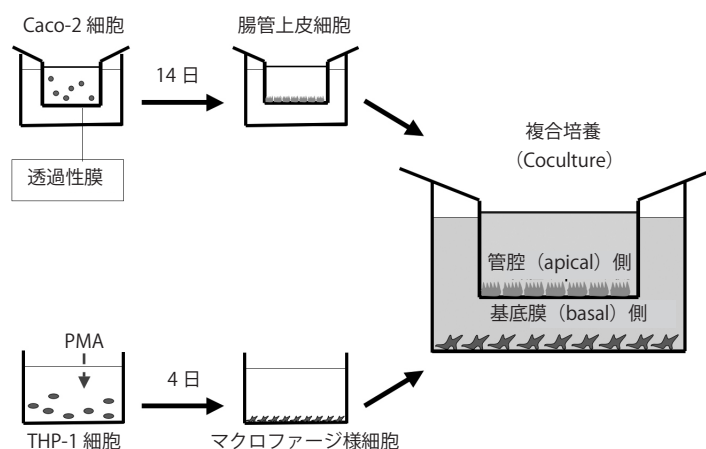


図 1 複合培養 (coculture) の方法

インサートの透過性膜上で小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞を、PMA 処理によりマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞上に配置することで複合培養開始とした。

では、細胞傷害の指標である LDH 放出量の測定やカスパーゼ 3 活性、real-time RT-PCR により調べると共に、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現パターンの変化を調べた。また、レンチウイルスを用いて注目した遺伝子の発現ベクターを Caco-2 細胞に感染させ、過剰発現細胞及びノックダウン細胞を作製した。

結 果

複合培養時の Caco-2 細胞における遺伝子発現プロファイルの網羅的解析

複合培養時の Caco-2 細胞層における遺伝子発現パターン変化を網羅的に解析すべく、THP-1 細胞と 0、1、3、6、24、48 時間複合培養した Caco-2 細胞について DNA マイクロアレイをおこなった。複合培養初期、特に 1 時間以降発現量が変動する遺伝子を抽出するために、maSigPro という時系列解析用にデザインされた R のパッケージを用いた。発現量の経時変化が 2 次曲線で近似できるプローブセットを抽出したところ、複合培養初期に発現量が上昇する遺伝子群の中では Immediate early response gene (IEX-1) が、低下する遺伝子群の中では annexin a2 pseudogene 2 が最も発現量変動の

大きい遺伝子として選抜された。次に IEX-1 ならびに annexin a2 pseudogene 2 をテンプレートにしてパターンマッチングをおこない、相関係数の高い順に並び替えた。並び替えたプローブセットについてそれぞれ上位 5% までを選抜しクラスタリングをおこなった結果、複合培養初期に発現量が上昇する遺伝子群には、免疫やアポトーシス、プロテインキナーゼカスケードに関わる遺伝子が、発現量が低下する遺伝子群には、酸化的リン酸化や転写、翻訳、細胞周期に関わる遺伝子が多く含まれていることが分かった (図 2)。ここから、複合培養した Caco-2 細胞が炎症状態にあるということ、また初期防御反応と細胞死へと向かう動きが同時に起こり、結果的に死んでいくという示唆が得られた。

※ この節の内容は、Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 437-439, 2010. に公表

IEX-1 による複合培養時の Caco-2 細胞の傷害抑制機構の解析

発現量が上昇した遺伝子の中から最も発現量変動が大きい IEX-1 に注目し、複合培養時の Caco-2 細胞でみられる現象にどのように関与しているか調べた。IEX-1 は細胞周期の促進、増殖、アポトーシスの調節などに関与

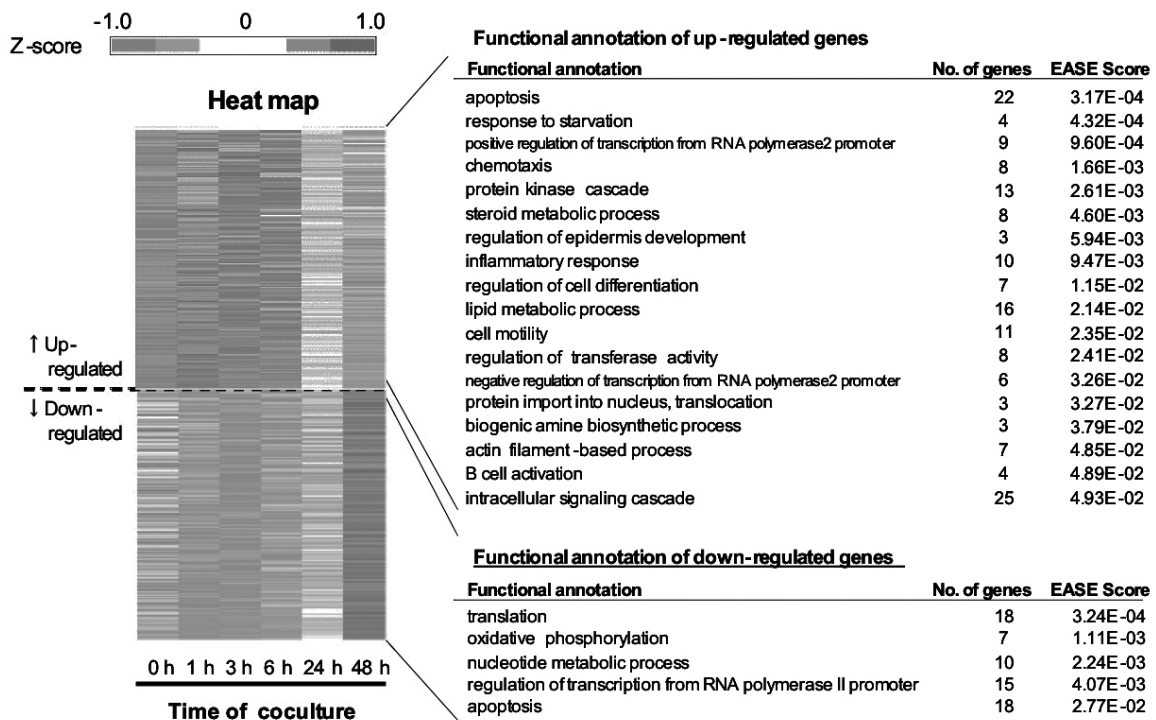


図 2 THP-1 細胞と複合培養した Caco-2 細胞における発現変動遺伝子のヒートマップ

IEX-1 (上図) および annexin a2 pseudogene 2 (下図) と発現変動パターンが似た遺伝子についてヒートマップを作製した。遺伝子発現レベルは相対値 (Z-score) になおし、発現量の上昇はマゼンダで、減少は緑で表した。挿入した表は発現量が上昇する遺伝子 (230 個) と発現量が減少する遺伝子 (247 個) についてのアノテーションを記したものである。EASE Score は Fisher's Exact p-value を改良したもの⁸⁾。

している初期応答遺伝子で、炎症性サイトカインにより転写が誘導されることが知られている²⁾。そこで複合培養開始時に抗 TNF- α モノクローナル抗体を添加したところ、複合培養時に増加する IEX-1 mRNA 発現量が抑制され、THP-1 細胞の産生する TNF- α が Caco-2 細胞における IEX-1 mRNA の発現を誘導していることが示された。

次に、複合培養時に生じる Caco-2 細胞の傷害に対する IEX-1 の関与を明確にするために、IEX-1 の発現プラスミド及び shRNA 発現プラスミドを作製した。作製したプラスミドはレンチウイルスを用いて Caco-2 細胞に感染させ、IEX-1 を過剰に発現させた細胞 (IEX-1 過剰発現細胞) 及びノックダウンした細胞 (IEX-1 ノックダウン細胞) を作製した。この細胞を用いて THP-1 細胞と複合培養したところ、過剰発現細胞において LDH 放出量の減少が、逆にノックダウン細胞においては LDH 放出量の上昇がみられ、IEX-1 が複合培養時に Caco-2 細胞で引き起こされる傷害の抑制に関与していることが分かった (図 3)。さらに、IEX-1 ノックダウン細胞において、複合培養時にみられるカスパーゼ 3 活性及び TNFR1 の mRNA 発現の更なる上昇が観察され、Caco-2 細胞において IEX-1 がアポトーシスを抑制する方向に働くこと、TNFR1 の発現抑制を介して細胞の TNF- α に対する感受性を保つことでアポトーシスから細胞を防御している可能性が示された。

考 察

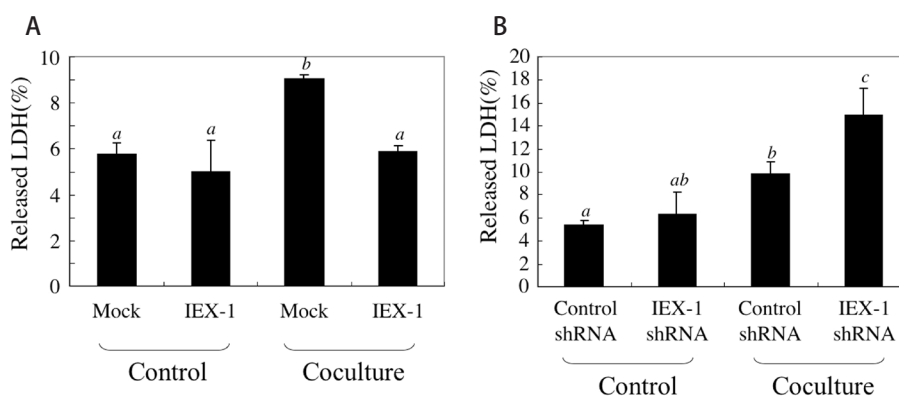
本研究では THP-1 細胞と複合培養した Caco-2 細胞の

時間依存的な遺伝子発現変化を明らかにすべく、DNA マイクロアレイ解析をおこなった。今までに複合培養した細胞の時系列解析をマイクロアレイでおこなった研究は報告されていない。加えて、解析にあたり maSigPro を用いて時間変化というファクターを含んだ発現変動遺伝子の抽出をおこなっており、この 2 点が本研究の特色である。

さらに、マイクロアレイデータの解析の結果見出された IEX-1 に注目して研究を進めたところ、複合培養初期 Caco-2 細胞では IEX-1 の発現量が急増し、これがカスパーゼ 3 活性の抑制や THP-1 細胞からの刺激の入口である TNFR1 の発現の低下に寄与することで、誘導される傷害を抑制する方向に働きかけている可能性が示唆された。

一般的に、サルモネラなどの侵襲性細菌に感染したとき、マクロファージが 1-2 時間以内にアポトーシスを起こすのに対し^{3,4)}、上皮細胞ではアポトーシスの開始までに 12-18 時間を要する⁵⁾。ここから、病原菌や炎症性サイトカインに刺激された上皮細胞が IEX-1 の発現上昇を通じてアポトーシスの誘導を遅らせ、可能な限り物理的バリアーとしての役割を保つことで大量の細菌が生体内に入り込んで感染が急速に拡大するのを避けている可能性が考えられる。

また、IEX-1 に関しては、IBD 患者の腸管粘膜のマイクロアレイ解析においても発現量が高いことが示されている⁶⁾。加えて、IEX-1 のマウスホモログである gly96 のノックアウトマウスに DSS を投与したところ、野生



Each value is the mean \pm SD, n=3, P < 0.05 (同じアルファベット記号を有するものは有意差なし)

図 3 IEX-1 が THP-1 細胞と複合培養した Caco-2 細胞の LDH 放出に及ぼす影響

Caco-2 細胞に IEX-1 の発現プラスミドあるいは shRNA 発現プラスミドをレンチウイルスで感染させ、IEX-1 過剰発現細胞および IEX-1 ノックダウン細胞を作製した。この細胞を THP-1 細胞と複合培養し、48 時間後に LDH 放出量を測定した (A : IEX-1 過剰発現細胞 B : IEX-1 ノックダウン細胞)。Mock には、IEX-1 発現プラスミドの代わりに CS II -MCS-EF-IRES2-Venus を、IEX-1 shRNA 発現プラスミドの代わりに、コントロール用配列を含むネガティブコントロールプラスミドを感染させた Caco-2 細胞を用いた。

型マウスに投与したときよりも重度の炎症が誘導されることが報告されており⁷⁾、腸炎症における IEX-1 の重要性が示されると共に、本系を詳細に解析することで実際の腸管で起こっている現象に関して新たな理解が得られることも示された。

以上より、IEX-1 の発現を誘導する化合物をスクリーニングすることで、腸炎症の薬や機能性食品のシーズとして利用できる可能性がある。今後は、IEX-1 による傷害抑制機構について研究を進めるとともに、腸管上皮細胞における IEX-1 の発現量変化が THP-1 細胞に与える影響についても調べていく必要があるだろう。

要 約

本研究では、今までに我々が構築した腸管上皮 Caco-2 細胞とマクロファージ様 THP-1 細胞の複合培養系をサイトカインの異常産生により引き起こされる腸炎症の *in vitro* モデル系として用い、2 種の細胞間相互作用時に起きる現象の詳細な解析をおこなった。

THP-1 細胞と複合培養した Caco-2 細胞について DNA マイクロアレイをおこなったところ、複合培養初期に発現量が上昇する遺伝子群には免疫やアポトーシス、プロテinkinase カスケードに関わる遺伝子が、発現量が低下する遺伝子群には酸化的リン酸化や転写、翻訳、細胞周期に関わる遺伝子が多く含まれていることが分かった。

次に、マイクロアレイデータを解析した結果最も発現量変動の大きい IEX-1 に注目したところ、IEX-1 の発現に TNF- α が関与していることが示された。また、IEX-1 の過剰発現細胞及びノックダウン細胞を用いた実験から、Caco-2 細胞において IEX-1 が傷害を抑制する方向に働くこと、TNFR1 の発現抑制を介して細胞の TNF- α に対する感受性を制御することでアポトーシスから細胞を防御している可能性が示された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、財団法人三島海雲記念財団より学術奨励金のご支援を賜りました。心より感謝いたしますと共に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Satsu H, et al. : Exp. Cell Res., 312, 3909-3919, 2006.
- 2) Wu MX. : Apoptosis, 8, 11-18, 2003.
- 3) Zychlinsky A, et al. : Nature, 358, 167-169, 1992.
- 4) Monack DM, et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93, 9833-9838, 1996.
- 5) Kim JM, et al. : J. Clin. Invest., 102, 1815-1823, 1998.
- 6) Costello CM, et al. : PLoS Med., 2, e199, 2005.
- 7) Sina C, et al. : Inflamm. Bowel Dis., 16, 320-331, 2010.
- 8) Hosack DA, et al. : Genome Biol., 4, R70, 2003