



Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase dependent signaling

西田, 真之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5869

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005869>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase dependent signaling

Claudin-2 はミオシン軽鎖キナーゼ依存的シグナル伝達を介して大腸の炎症を制御する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

(指導教員: 東 健 教授)

西田 真之

【背景】

Tight junction は、細胞間接着装置で、細胞間の通路としても重要な役割を果たしている。Tight junction の主な構成分子としては、claudin、occludin、そして裏打ちタンパク質として ZO-1 の存在が知られている。

claudin は、現在のところ、24 種類の存在が知られている。近年、claudin の発現変動が、様々な疾患に関係することが報告されており、上皮機能の破綻や自然免疫、獲得免疫などにより引き起こされる多因子性疾患として知られる炎症性腸疾患においても、claudin の関与が明らかにされた。炎症性腸疾患において、claudin-2 の発現が変動することが報告されているが、腸管の炎症における claudin-2 の役割については、まだよくわかっていない。

【目的および方法】

本研究では、claudin-2 (-/-)マウスを用いて、TNF α で誘発させた大腸の炎症反応における claudin-2 の役割について検討した。また、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)を含む飲水をマウスに摂取させて誘発する炎症性腸疾患のマウスモデルを用いて、腸炎に対する claudin-2 の役割について検討した。

さらに、in vitro では、ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞に claudin-2 の siRNA を導入することで claudin-2 の発現を低下させ、その条件下で TNF α 刺激を行い、炎症反応における claudin-2 の役割について検討した。

【結果】

C57BL/6J マウスに 3 μ g の TNF α を腹腔内投与し、4時間後の大腸組織の claudin-2 発現を調べた。大腸組織の claudin-2 発現は増加していることが、western blot 法と real-time PCR 法にて確認され、claudin-2 発現は炎症によって増強されることが明らかとなった。

次に claudin-2 (-/-)マウスを用いて、大腸組織の炎症反応における claudin-2 の役割

について検討した。claudin-2 (-/-)マウスと claudin-2 (+/+)マウスに 3 μ g の TNF α を腹腔内投与し、4 時間後の血清 IL-6 値を ELISA 法、大腸組織の IL-6、IL-1 β 、そして TNF α の mRNA 発現を real-time PCR 法で調べた。さらに、大腸組織の凍結切片を作製し、マクロファージの浸潤について、抗 CD11b 抗体を用いて免疫染色を行った。claudin-2 (-/-)マウスの血清 IL-6 値および大腸組織の IL-6、IL-1 β 、TNF α の mRNA 発現はいずれも、claudin-2 (+/+)マウスと比較して、有意に増加していた。また、大腸組織におけるマクロファージの浸潤について検討した結果、claudin-2 (-/-)マウスの大腸組織におけるマクロファージの数は、claudin-2 (+/+)マウスと比較して、有意に増加していた。さらに、NF- κ B シグナル伝達経路に対する影響を western blot 法で検討した。その結果、claudin-2 (-/-)マウスの大腸組織において、I κ B のリン酸化および NF- κ B p65 のリン酸化の発現が、claudin-2 (+/+)マウスと比較して、増強された。また、大腸組織に存在する他の claudin の mRNA 発現について real-time PCR 法で検討した結果、claudin-2 (-/-)マウスと claudin-2 (+/+)マウスに違いは認められなかった。

次に、ミオシン軽鎖キナーゼ(myosin light chain kinase; MLCK)の発現について検討した。これまでの報告で、TNF α 誘導性の腸管 Tight junction 透過性の増加は、MLCK 発現の増加を介していることが示されている。TNF α 誘導性の大腸の炎症における claudin-2 の MLCK 発現への影響を、claudin-2 (-/-)マウスを用いて検討した。大腸組織の MLCK 発現は western blot 法にて確認した。その結果、claudin-2 (+/+)マウスと比較して、claudin-2 (-/-)マウスの大腸組織の MLCK 発現は増強されていることが明らかとなった。さらに、マトリックスメタロプロテアーゼ-9(matrix metalloproteinase-9; MMP-9)に対する claudin-2 の影響を検討した。MMP-9 は腸管の炎症において重要な役割を果たすことが知られている。そこで、3 μ g の TNF α を腹腔内投与した claudin-2 (-/-)マウスおよび claudin-2 (+/+)マウスの大腸組織の MMP-9 発現を western blot 法および real-time PCR 法で検討した。その結果、claudin-2 (-/-)マウスの大腸組織の MMP-9

発現は、claudin-2 (+/+)マウスと比較して、増強されることを明らかにした。

claudin-2 の大腸炎症における影響について、Caco-2 細胞を用いて検討した。Caco-2 細胞に claudin-2 の siRNA を導入することで、claudin-2 の発現を低下させ、その条件下で、100 ng/ml の TNF α で刺激を行い、IL-6 と IL-1 β の mRNA 発現を比較検討した。その結果、claudin-2 の発現低下によって、IL-6 と IL-1 β の mRNA 発現は有意に増強されることを明らかにした。また、claudin-2 の MLCK 発現に対する影響を、western blot 法および real-time PCR 法を用いて検討した結果、claudin-2 発現低下によって、MLCK 発現は mRNA およびタンパク質発現ともに増強されることを明らかにした。さらに、MLCK の炎症反応への関与と透過性への関与を検討するために、MLCK 阻害剤である ML-7 を用いて、検討した。その結果、ML-7 の投与によって、TNF α 誘導性の Caco-2 細胞の炎症反応は抑制され、TER の低下も阻害された。

DSS 誘導性腸炎モデルを用いて、claudin-2 の大腸の炎症における役割を検討した。claudin-2 (-/-)マウスおよび claudin-2 (+/+)マウスに 3.5 % の DSS を含む飲水を 5 日間自由摂取させ、5 日後に飲水中を水のみに変更し、さらに 2 日間飼育し、体重変化、大腸の長さ、大腸組織の HE 染色、大腸組織の IL-6 と IL-1 β の mRNA 発現を比較検討した。その結果、claudin-2 (+/+)マウスと比較して、claudin-2 (-/-)マウスでは体重は有意に減少し、さらに大腸の有意な委縮が認められた。また、大腸組織の HE 染色では claudin-2 (+/+)マウスと比較して、claudin-2 (-/-)マウスでは、より組織が破壊されていることを明らかにした。大腸組織の IL-6 と IL-1 β の mRNA 発現を real-time PCR 法で検討した結果、claudin-2 (-/-)マウスでは、IL-6 と IL-1 β の mRNA 発現が claudin-2 (+/+)マウスと比較して有意に増加していた。

【考察】

本研究によって、claudin-2 の欠損によって NF- κ B を介した大腸の炎症が増強されることを明らかにした。さらに、Tight junction の透過性に関与する MLCK 発現が

claudin-2 の欠損によって増強されていた。これらの結果から、大腸組織において、claudin は Tight junction のバリア機能だけでなく上皮細胞の透過性にも関与している可能性が示唆された。また、MLCK が NF- κ B を介した炎症反応を増強させることが報告されている。本研究においても、MLCK の阻害剤である ML-7 の投与によって、Caco-2 細胞の炎症反応が抑制されることを明らかにしている。つまり、claudin-2 の欠損による MLCK 発現増加が、炎症反応の増強を誘導している可能性が示された。

claudin-2 の欠損によって、MMP-9 の発現増加が明らかになった。これまでの報告で、MMP-9 は p38-MAPK をリン酸化することが知られている。また、p38-MAPK のリン酸化は NF- κ B の活性化を誘導することが報告されている。さらに、p38-MAPK のシグナル伝達経路の下流には、核内転写因子である Elk-1 が存在している。活性型の Elk-1 は核内へ移行し、MLCK のプロモーター領域に結合し、MLCK の活性化を誘導することが知られている。これらの報告から、claudin-2、MLCK そして MMP-9 間の相互関係が、NF- κ B を介した炎症反応に重要であることが示唆された。

【結論】

claudin-2 は MLCK 依存的シグナル伝達を介して、大腸の炎症を制御していることが証明された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2318号	氏 名	西田 真之
論文題目 Title of Dissertation	Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase dependent signaling Claudin-2 はミオシン軽鎖キナーゼ依存的シグナル伝達を介して大腸の炎症を制御する		
審査委員 Examiner	主 査 勾 坂 敏 朗 Chief Examiner 副 査 南 康 博 Vice-examiner 副 査 西 慎 一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】

近年、Tight junction の構成成分である claudin の発現変動が、様々な疾患に関係することが報告されており、上皮機能の破綻や自然免疫、獲得免疫などにより引き起こされる多因子性疾患として知られる炎症性腸疾患においても、claudin の関与が明らかにされた。炎症性腸疾患において、claudin-2 の発現が変動することが報告されているが、腸管の炎症における claudin-2 の役割については、まだよくわかっていない。

そこで、本研究では claudin-2 (-/-)マウスを用いて、大腸の炎症における claudin-2 の役割について検討した。

【方法】

claudin-2 (-/-)マウスと claudin-2 (+/+)マウスに 3 µg の TNFαを腹腔内投与し、4時間後の炎症反応の変化について検討した。また、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)を 3.5 %含む飲水を claudin-2 (-/-)マウスと claudin-2 (+/-)マウスに摂取させることで、腸炎を誘発し、大腸組織の claudin-2 の役割について評価した。

さらに、*in vitro* では、Caco-2 細胞に claudin-2 の siRNA を導入することで claudin-2 の発現を低下させ、TNFα誘導性の炎症反応における claudin-2 の役割について検討した。

【結果】

claudin-2 (-/-)マウスに TNFαを腹腔内投与した結果、血清 IL-6 値および大腸組織の IL-6、IL-1β、TNFαの mRNA 発現、マクロファージの浸潤はいずれも、claudin-2 (+/+)マウスと比較して有意に増加した。さらに、claudin-2 (-/-)マウスの大腸組織において、IκB のリン酸化および NF-κB p65 のリン酸化の発現が増加しており、claudin-2 の欠損で NF-κB を介した大腸の炎症が増強されることが明らかになった。これまでの報告で、TNFα誘導性の腸管 Tight junction 透過性の増加は、ミオシン軽鎖キナーゼ(myosin light chain kinase; MLCK)発現の増加を介していることが示されている。そこで、MLCK の発現について検討した結果、claudin-2 (-/-)マウスの大腸組織の TNFα誘導性の MLCK 発現が増強されていることが

明らかとなった。この結果より、claudin-2 (-/-)マウスでは TNF α 誘導性の腸管 Tight junction 透過性が増強されている可能性が示唆された。さらに、腸管炎症の増悪因子として知られているマトリックスメタロプロテアーゼ-9(matrix metalloproteinase-9; MMP-9)の発現について検討した。その結果、大腸組織の MMP-9 の mRNA およびタンパク発現はともに、claudin-2 (-/-)マウスで増強されることを明らかにした。

Caco-2 細胞に claudin-2 の siRNA を導入することで、claudin-2 の発現を低下させた結果、IL-6 と IL-1 β の mRNA 発現および MLCK のタンパク発現が増強されることを明らかにした。また、MLCK 阻害剤である ML-7 を用いて検討した結果、ML-7 の投与によって TNF α 誘導性の Caco-2 細胞の炎症反応は抑制され、細胞透過性の指標である TER の低下も阻害された。このことから、MLCK の TNF α 誘導性の細胞透過性増加への関与が示され、さらに claudin-2 欠損による MLCK の発現増加が炎症反応の増強を誘導している可能性が示唆された。

DSS 誘導性腸炎モデルを用いた結果、claudin-2 (-/-)マウスでは体重は有意に減少し、さらに大腸の有意な委縮が認められ、claudin-2 (-/-)マウスの大腸組織の HE 染色では claudin-2 (+/-)マウスと比較して、より組織が破壊されていることを明らかにした。この結果から、claudin-2 欠損によって、DSS 腸炎は増悪することが明らかとなった。

【結論】

claudin-2 は MLCK 依存的シグナル伝達を介して、大腸の炎症を制御していることが証明された。

本研究は、claudin-2 欠損マウスを用いて、大腸の炎症における claudin-2 の役割について解析したものである。その結果、claudin-2 が MLCK 依存的シグナル伝達を介して、大腸の炎症を制御していることを証明した点において、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。