

氏 名	児 堀 綾 子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 3 5 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 3 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis  (Interleukin-33 は潰瘍性大腸炎患者の炎症腸粘膜において特異的な発現亢進が認められる)
審 査 委 員	主 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 岡 部 英 俊 副 査 教 授 谷 徹

## 論文内容要旨

※整理番号	640	(ふりがな) 氏名	こぼり あやこ 児堀 綾子
学位論文題目	Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis (Interleukin-33 は潰瘍性大腸炎患者の炎症腸粘膜において特異的な発現亢進が認められる)		
<p>〈目的〉</p> <p>Interleukin-33(IL-33)は 2005 年に ST2 のリガンドとして同定された IL-1 family cytokine である。IL-33 結合分子である ST2 とシグナル伝達に関与する IL-1 receptor accessory protein(IL-1RAcP)のヘテロダイマーをレセプターとし、nuclear factor(NF)-<math>\kappa</math>B や mitogen-activated protein kinases(MAPKs)の活性化を介して様々な遺伝子発現を誘導することが報告されている。IL-33 は他の主な IL-1 family cytokine とは異なり好酸球の浸潤や IgE 抗体分泌などの Th2 型免疫応答に関与することが示され、様々な疾患の発症や病態形成に関係することが示唆されており、近年腸管における IL-33 の働きに関する報告も散見される。今回我々は、炎症性腸疾患における IL-33 の発現を検討し、IL-33 発現の誘導メカニズムについて in vitro で検討した。</p> <p>〈方法〉</p> <p>2009 年 6 月から同年 8 月に当施設で下部消化管内視鏡検査/シングルバルーン小腸内視鏡検査を施行した潰瘍性大腸炎 25 例(活動期 13 例、非活動期 12 例)、クローン病 35 例(活動期 18 例、非活動期 17 例)、感染性腸炎/虚血性腸炎 8 例および健常 10 例を対象とし、内視鏡下生検にて採取した組織の IL-33 mRNA 発現を RT-PCR 法および real-time PCR 法にて比較検討した。</p> <p>また、炎症腸粘膜における IL-33 発現の局在を検討するため、2006 年 3 月から 2008 年 5 月に当施設で手術を施行した潰瘍性大腸炎 5 例、クローン病 5 例、大腸癌症例の正常粘膜部 5 例を対象とし、手術にて摘出しホルマリン-パラフィン固定された組織を用いて IL-33 抗体および筋線維芽細胞のマーカーである <math>\alpha</math>SMA 抗体にて蛍光二重染色を行った。</p> <p>更に、分離したヒト大腸筋線維芽細胞を IL-1<math>\beta</math>、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IFN-<math>\gamma</math>、TNF-<math>\alpha</math>、TGF-<math>\beta</math>、LPS でそれぞれ刺激し、誘導される IL-33 mRNA 発現を real-time PCR 法で解析した。</p> <p>IL-33 mRNA 発現誘導における細胞内シグナル伝達経路を調べるため p42/44 MAPK 阻害剤(PD98059,U0126)、p38 MAPK 阻害剤(SB203580)、PI3K 阻害剤(LY294002)の効果を検討した。また IL-33 誘導に関連する核転写因子を検討するため、アデノウイルス(Ad-I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>N, DN-cJUN)にて NF-<math>\kappa</math>B および AP-1 をノックダウンし IL-33 mRNA 発現を解析した。ヒト大腸筋線維芽細胞における IL-1<math>\beta</math>/TNF-<math>\alpha</math>により誘導される IL-33 分泌機構の検討のため、caspase-1 siRNA および caspase-1 阻害剤(YVAD)を大腸筋線維芽細胞に導入し ELISA 法にて解析した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

#### 〈結果〉

炎症性腸疾患患者より内視鏡下生検にて採取した組織における IL-33 mRNA 発現の解析では、活動期潰瘍性大腸炎患者の粘膜において IL-33 mRNA の著明な発現増強を認めた。この発現増強は活動期潰瘍性大腸炎で特異的であり、非活動期潰瘍性大腸炎や活動期/非活動期クローン病、およびその他の腸炎患者の粘膜では認めなかった。

手術標本を用いた蛍光二重染色では、活動期潰瘍性大腸炎の大腸上皮で  $\alpha$ SMA 陽性細胞と一致して IL-33 陽性細胞が検出された。クローン病および正常粘膜標本では IL-33 の発現を認めなかった。

分離したヒト大腸筋線維芽細胞を各種サイトカインで刺激すると、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の刺激により IL-33 発現が強く誘導された。この反応は Western blot 法、ELISA 法による蛋白レベルでの検討においても同様の結果が得られた。IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  によるこの効果はそれぞれ刺激時間および刺激濃度に依存的に認められた。しかし、大腸上皮細胞モデルである大腸癌細胞株 HT-29 細胞、Caco-2 細胞を用いた検討では、いずれの細胞株においてもサイトカイン刺激による発現増強は認めなかった。

IL-33 mRNA 発現誘導における MAP キナーゼの役割の検討では、IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  刺激において p42/44 MAPK 阻害剤にて IL-33 mRNA 発現誘導が抑制された。IL-33 誘導に関連する核転写因子を検討では、NF- $\kappa$ B、AP-1 のいずれをノックダウンしても IL-33 mRNA 誘導が抑制された。caspase-1 siRNA および caspase-1 阻害剤(YVAD)導入による検討でも IL-33 発現は抑制された。

#### 〈考察〉

今回の我々の検討において、腸粘膜における IL-33 発現は活動期潰瘍性大腸炎患者で特異的な増強を認めており、非活動期潰瘍性大腸炎や活動期/非活動期クローン病および炎症性腸疾患以外の腸炎患者では増強していないことを示した。この結果より、腸粘膜での IL-33 発現レベルが潰瘍性大腸炎の新たなバイオマーカーとして活用できる可能性が示唆された。蛍光二重染色法の結果より大腸筋線維芽細胞が潰瘍性大腸炎患者の腸粘膜における IL-33 発現起源細胞となっていることが示唆された。更に大腸上皮細胞モデル(HT-29 細胞、Caco-2 細胞)を用いた検討にて IL-33 mRNA 発現がサイトカイン刺激に対する反応を示さないことより、腸粘膜における IL-33 発現細胞が大腸上皮である可能性は否定的と考えられた。

In vitro では、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の刺激にてヒト大腸筋線維芽細胞からの IL-33 発現が誘導された。このサイトカイン誘導性 IL-33 発現は、MAPKs および NF- $\kappa$ B、AP-1 の活性化を介しているものと考えられた。また、IL-33 分泌機構において caspase-1 の関与が示唆された。

潰瘍性大腸炎の病態における IL-33 の役割は未だ解明されていない点が多く、今後更なる検討を行うことが同疾患の検査および治療の発展につながるものと考えられる。

#### 〈結論〉

活動期潰瘍性大腸炎病変組織の大腸粘膜下筋線維芽細胞において特異的な IL-33 発現が認められた。活動期/非活動期クローン病や感染性腸炎においては発現を認めなかった。また、大腸筋線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  による IL-33 発現誘導を確認した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	640	氏名	児堀 綾子
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)			
<p>難治性の持続性慢性炎症を引き起こす炎症性腸疾患として位置づけられる潰瘍性大腸炎及びクローン病は厚生労働省特定難治性疾患に指定され病態の解明が進められている。しかし、その病態は依然不明な点が多い。</p> <p>2005年に ST2 のリガンドとして報告された新規 IL-1 family cytokine である IL-33 は、強力な Th2 サイトカイン誘導能を持ち Th2 型免疫応答において重要な役割を果たすと考えられ、関節リウマチや気管支喘息など様々な疾患との関連が研究されている。腸管においても杯細胞増加やムチン産生亢進作用などが報告されている。</p> <p>今回、炎症性腸疾患病変腸粘膜組織における IL-33 発現の評価、および IL-33 発現誘導メカニズムについて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 活動期潰瘍性大腸炎病変組織の筋線維芽細胞において特異的な IL-33 発現亢進を認めた。非活動期潰瘍性大腸炎、活動期/非活動期クローン病、感染性腸炎の病変組織では発現を認めなかった。</li> <li>2) 大腸筋線維芽細胞を IL-1<math>\beta</math>、TNF-<math>\alpha</math> で刺激すると IL-33 発現が誘導された。大腸上皮細胞では発現誘導を認めなかった。</li> <li>3) IL-33 発現誘導には MAP キナーゼの活性化および核内転写因子である NF-<math>\kappa</math>B、AP-1 の活性化が関与しており、また IL-33 分泌機構における caspase-1 の関与が示唆された。</li> </ol> <p>本論文は、炎症性腸疾患病変粘膜における IL-33 発現について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 585字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 1 月 24 日 )</p>			