

補体活性化制御蛋白発現調節機構の異常による
腸管粘膜傷害の発症機序に関する研究

09670541

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 五月女 隆男
（滋賀医科大学 医学部 助手）



はしがき

研究組織

平成9年度～平成10年度

研究代表者：安藤 朗（滋賀医科大学医学部助手）

平成11年度

研究代表者：五月女隆男（滋賀医科大学医学部助手）

研究経費

平成9年度 千円

平成10年度 千円

平成11年度 千円

計 千円

研究発表

(1)学会誌等

1. A. Andoh, Y. Fujiyama, K. Hata, Y. Araki, H. Takaya, M. Shimada, T. Bamba. Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumor necrosis factor-alpha(TNF-a)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. Clin. Exp. Immunol. 1999; 118: 23-29
2. A. Andoh, T. Kimura, M. Fykuda, Y. Araki, Y. Fujiyama, T. Bamba. Rapid intestinal ischemia-reperfusion injury is suppressed in genetically mast cell-deficient Ws/Ws rats. Clin. Exp. Immunol. 1999; 116: 90-93
3. A. Andoh, T. Bamba, M. Sasaki. Physiological and anti-inflammatory roles and dietary fiber and butyrate in intestinal functions. JPEN J. Parenter. Enteral Nutr. 1999; 23; 70-73
4. K. Kitamura, A. Andou, T. Inoue, Y. Amakata, K. Hodohara, Y. Fujiyama, T. Bamba. Sodium Butyrate blocks interferon-gamma (IFN-g)-induced biosynthesis of MHC class III gene products (complement C4 and factor B) in human fetal intestinal epithelial cells. Clin. Exp. Immunol. 1999; 118: 16-22
5. Y. Araki, A. Andoh, Y. Fujiyama, T. Bamba. Development of dextran sulphate sodium (DSS)-induced experimental colitis is suppressed in genetically mast cell-deficient Ws/Ws rats. Clin. Exp. Immunol. 1999; 119; 264-269

6. A. Andoh, Y. Fujiyama, T. Kimura, T. Saotome, T. Tsujikawa, M. Sasaki, S. Koyama, T. Bamba. Increased expression of decay-accelerating factor (CD55) in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Pathophysiology* 1998; 5; 105-110
7. A. Andoh, Y. Fujiyama, H. Sakumoto, H. Uchihara, T. Kimura, S. Koyama, T. Bamba. Detection of complement C3 and factor B gene expression in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Clin. Exp. Immunol.* 1998; 111; 477-483
8. T. Kimura, A. Andoh, Y. Fujiyama, T. Saotome, T. Bamba. A blockade of complement activation prevents rapid intestinal ischemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. *Clin. Exp. Immunol.* 1998; 111; 484-490
9. A. Andoh, Y. Fujiyama, K. Sumiyoshi, H. Sakumoto, H. Okabe, T. Bamba. Tumor-necrosis factor-alpha up regulators decay-accelerating factor gene expression in human intestinal epithelial cells. *Immunology* 1997; 90; 358-363

(2) 口頭発表

1. A. Andoh, T. Saotome, K. Sumiyoshi, H. Sakumoto, T. Tsujikawa, Y. Fujiyama, T. Bamba. Enhanced expression of decay-accelerating factor at the diseased mucosa of patients with ulcerative colitis: TNF- α and IL-4 are possible inducers. 97th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, May 13, 1997
2. A. Andoh, N. Bamba, T. Saotome, T. Kimura, H. Uchihara, Y. Fujiyama, T. Bamba. IL-4 and TNF- α acts inducers of decay accelerating factor (DAF) expression at the diseased mucosa of patients with ulcerative colitis. The 3rd World Congress on Inflammation, Nov 17, 1997
3. T. Kimura, A. Andoh, T. Saotome, Y. Fujiyama, T. Bamba. Blockade of complement activation prevents rapid intestinal ischemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. The 3rd World Congress on Inflammation, Nov 18, 1997
4. T. Bamba, A. Andoh, M. Sasaki. Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber butyrate in intestinal functions. International symposium GUT Growth Factors and Nutrients in Intestinal Health and Disease, Nov 2, 1998

5. A. Andoh, Y. Fujiyama, H. Sakumoto, H. Uchihara, T. kimura, T. Bamba. In situ expression of complement C3 and factor B genes in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. 99th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, May 21, 1998
6. A. Andoh, Y. Fujiyama, H. Uchihara, H. Sakumoto, K. Hata, T. Bamba. Counter-regulatory effects of sodium butyrate on cytokine-induced complement (C3, C4 and factor B) biosynthesis in human intestinal epithelial cell lines. 99th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, May 21, 1998
7. T. Kimura, A. Andoh, T. Saotome, M. Fukuda, Y. Fujiyama, T. bamba. Importance of complement activation and mucosal mast cell defranulation in the pathogenesis of rapid intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. 99th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, May 21, 1998
8. A. Andoh, Y. Fujiyama, K. Hata, M. Shimada, H. Takaya, H. Uchihara, T. kimura, T. Bamba. In vivo and in vitro evidences of complement C3 biosynthesis in human intestinal epithelial cells. World Congress of Gastroenterology. Sep 11, 1998

(3)出版物

1. T. Bamba, A. Andoh. Regulation of mucosal inflammation and clinical outcome in inflammatory bowel disease. Bioregulation and Its Disorders in the Gastrointestinal Tract (Ed: T. Yoshikawa, T. Arakawa), Blackwell Science (Japan) 1998; 243-252

研究成果報告書

背景と目的

Decay-accelerating factor (DAF)や CD59 などの補体活性化制御蛋白は、血液に接するほとんどの細胞に発現しており、細胞表面での自己補体の活性化を阻止することにより補体による細胞傷害を防いでいる。これまでに腸上皮細胞自身が局所において補体成分を産生分泌していることを明らかにしてきた。一方では腸上皮細胞の管腔側細胞膜には DAF の強い発現が認められ、補体の活性化による粘膜傷害から防御されている。遺伝的に DAF の発現が欠損す家系では原因不明の炎症性腸疾患類似の消化管病変を合併する。

本研究では腸上皮細胞に発現する DAF に着目し、DAF 発現の制御機構を明らかにするとともに、炎症性腸疾患の粘膜傷害機序における DAF 発現の制御機構の異常の関与を明らかにすることを目的とする。

実験方法と結果

1.DAF mRNA および DAF 蛋白のサイトカインによる誘導

1) DAF mRNA の TNF-alpha による誘導

HT-29, T-84, Caco-2 の各々の cell line に 50 ng/ml の TNF-alpha を添加し 6 時間後の DAF mRNA の発現は control medium に比較して増強された。HT-29 に TNF-alpha を 0.001-100 ng/ml の濃度で添加し、6 時間後の DAF mRNA は濃度依存性に増強が見られた。

HT-29 に TNF-alpha を 10 ng/ml の濃度で添加し、1, 3, 6, 12, 24 時間後の DAF mRNA 量を比較したところ、3-6 時間後の mRNA 量がピークとなった。

2) DAF 蛋白の TNF-alpha による誘導

HT-29, T-84, Caco-2 の各々の cell line に 10 ng/ml の TNF-alpha を添加し 24 時間後の培養上清中 DAF 蛋白を Western Blot で検討したところ、いづれの cell line でも発現が増強した。

3) DAF mRNA 誘導に対する TNF-alpha と IL-4 の相乗的効果

HT-29, T-84 細胞に TNF-alpha 単独、IL-4 単独、TNF-alpha+IL-4 を添加し、6 時間後の DAF mRNA を Northern Blot で解析した。両者には相乗的効果が見られた。

4) DAF 蛋白誘導に対する TNF-alpha と IL-4 の相乗的効果

HT-29, T-84 細胞に TNF-alpha 単独、IL-4 単独、TNF-alpha+IL-4 を添加し、24 時間後の DAF 蛋白を Western Blot で解析した。両者を添加することにより、各単独添加よりも DAF 蛋白は強く誘導された。

2. 潰瘍性大腸炎患者病変粘膜における DAF 蛋白および mRNA の発現

1) 潰瘍性大腸炎患者病変粘膜での DAF 蛋白の検出

大腸内視鏡にて観察し得た潰瘍性大腸炎患者の病変部粘膜を患者の同意のもとに採取し、固定後、凍結切片を作成し、モノクローナル抗 DAF 抗体を用いて免疫組織染色にて検討した。

正常の大腸粘膜では上皮細胞の基底膜側に DAF の発現が見られたが、活動期の潰瘍性大腸炎病変粘膜では管腔側に DAF の強い発現がみられた。

2) 潰瘍性大腸炎患者病変粘膜での DAF mRNA の in situ hybridization による検出

cRNA probe を用いた in situ hybridization による検討でも DAF mRNA の発現は大腸粘膜の crypt 上 1/3 の上皮細胞に特に強い傾向が確認された。

3) 潰瘍性大腸炎患者病変粘膜での DAF mRNA の発現

生検材料より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により DAF mRNA の発現を検討したところ、病変粘膜において DAF mRNA の発現の亢進が見られた。