

原著

治療抵抗性潰瘍性大腸炎における Transforming growth factor- β 受容体の発現抑制

島谷孝司¹⁾ 石黒陽^{1,2)} 川口章吾¹⁾ 佐藤裕紀¹⁾
平賀寛人¹⁾ 山口佐都子¹⁾ 櫻庭裕丈¹⁾ 藤田均¹⁾
山形和史¹⁾ 福田眞作¹⁾

抄録 炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis:UC), クロウン病 (Crohn's disease:CD) を含む原因不明の難治性炎症性腸疾患である。その病態には、Smad を介した Transforming growth factor- β (TGF- β) シグナル伝達の異常が関与していることが報告されている。そこで、ステロイド治療抵抗性 UC, ステロイド治療反応性 UC の TGF- β 受容体 I, II 型の蛋白量及び mRNA 発現量について、腸管手術標本を用い Western blotting と Real-time PCR で検討した。ステロイド治療反応性 UC と比較しステロイド治療抵抗性 UC で、TGF- β 受容体 I, II 型の蛋白量, mRNA 発現量ともに有意な低下を認めた。このことから、遺伝子レベルでの TGF- β 受容体の発現の低下がステロイド治療抵抗性 UC の病態に関与している可能性が示唆された。
弘前医学 59:90-97, 2008

キーワード：潰瘍性大腸炎；TGF- β 受容体；治療抵抗性。

ORIGINAL ARTICLE

TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGF)- β RECEPTORS ARE SUPPRESSED IN THE REFRACTORY CASES WITH ULCERATIVE COLITIS.

Koji Shimaya¹⁾, Yoh Ishiguro^{1,2)}, Shogo Kawaguchi¹⁾, Yuki Sato¹⁾,
Hiroto Hiraga¹⁾, Satoko Yamaguchi¹⁾, Hirotake Sakuraba¹⁾, Hitoshi Fujita¹⁾,
Kazufumi Yamagata¹⁾, and Shinsaku Fukuda¹⁾

Abstract AIM: Transforming growth factor (TGF)- β related signaling may play an important role in the pathogenesis of refractory ulcerative colitis (UC). We examined the expression levels of TGF- β receptor (R) I and TGF- β R II, that is in the downstream pathway of TGF- β signaling. METHODS: Colonic tissue samples were obtained from refractory cases and responsive cases with UC, and controls. RNA and protein were extracted from mucosal samples, and real time-PCR and western blot analysis were performed. RESULTS: Both of TGF- β R I and TGF- β R II transcripts were significantly suppressed in refractory cases with UC (0.106 ± 0.0335 , 0.185 ± 0.0465) compared with responsive cases (1.12 ± 0.352 , $p < 0.01$, 1.82 ± 0.877 , $p < 0.05$). Western blot analysis showed that TGF- β R I and R II were significantly suppressed in refractory cases with UC (0.587 ± 0.105 , 1.02 ± 0.318) compared with responsive cases (1.89 ± 0.670 , $p < 0.05$, 5.02 ± 1.66 , $p < 0.05$). CONCLUSION: From these findings, we conclude that one of the mechanisms of refractoriness of UC is due to the downregulation of TGF- β receptor at the transcriptional levels and the protein levels that leads to the loss of TGF- β related signaling.

Hirosaki Med. J. 59:90-97, 2008

Key words: Ulcerative colitis; TGF- β receptor; Refractoriness.

¹⁾ Department of Gastroenterology and Hematology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

²⁾ Department of Endoscopy, Hirosaki University Hospital

Correspondence: K. Shimaya

Received for publication, December 10, 2007

Accepted for publication, December 26, 2007

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科消化器血液内科学講座

²⁾ 弘前大学医学部附属病院光学医療診療部

別刷請求先：島谷孝司

平成19年12月10日受付

平成19年12月26日受理

はじめに

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis:UC) とクローン病 (Crohn's Disease:CD) を含む難治性炎症性腸疾患であり、その病因は不明である。その病態には免疫異常の関与が推測されており、これまで炎症性サイトカインの増加^{1,2)}、経口免疫寛容の破綻³⁾などが報告され、また、治療薬剤としてはアミノサリチル酸製剤、ステロイドホルモン剤、免疫抑制剤⁴⁾、抗TNF- α 抗体⁵⁾などの生物製剤の有効性が明らかとなっている。特にUCでは基本となる治療薬剤はステロイドホルモンであるが、その有効率は60%程度であり、難治例が多く存在することも事実である⁶⁾。近年、その病態のひとつにTransforming growth factor- β (TGF- β) シグナル伝達の異常が関与していることが報告されている⁷⁻⁹⁾。

TGF- β は消化管粘膜上皮において、細胞の増殖、炎症および組織の修復などの作用を有しており、活動期UCの腸管局所では、TGF- β の発現亢進が示されている¹⁰⁾。また、TGF- β ノックアウトマウスでは消化管粘膜を含めた全身性炎症によって早期に死亡するといわれ¹¹⁾、一方で、UCの慢性炎症持続の病態にSmadを介したTGF- β のシグナル伝達の異常が関与していることが報告されている⁷⁻⁹⁾。

今回、UC腸管局所におけるTGF- β 受容体の発現とTGF- β シグナル伝達異常について解析し、ステロイド治療抵抗性UCとの関わりについて検討した。

対象及び方法

対象

健常Controlとして大腸癌手術例(4例)の正

常粘膜と、ステロイド治療抵抗性UC(6例)および治療反応性UC(4例)の腸管手術組織より、蛋白およびRNAを抽出し、TGF- β 受容体I型(TGF- β RI)、TGF- β 受容体II型(TGF- β RII)の蛋白量についてWestern blotを、mRNA発現量はreal-time PCRを用い検討した(表1)。

また、本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、informed consentおよび文書による同意を得て行った。

方 法

Western Blotting

腸管手術組織より採取された凍結組織をホモジナイズし、Nuclear Extract Kit (ACTIVE MOTIF, Carlsbad, CA)を用い蛋白を抽出した。Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA)を用い蛋白濃度を測定した。15% polyacrylamide-SDSゲルを用い電気泳動後、Immobilon P15 membrane (Millipore Corp., Bedford, MA)へblottingを行った。

1次抗体として、TGF- β RI抗体(1:1000, Santa Cruz.)、TGF- β RII抗体(1:1000, Santa Cruz.)、 β -Actin抗体(1:5000, Cell Signaling)を使用し、2次抗体としてRabbit IgG HRP抗体(GE Healthcare, UK)、Goat IgG HRP抗体(PIERCE, IL)を使用した。

Real-time PCR

腸管手術組織より採取された凍結組織をホモジナイズし、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)変法によりtRNAを抽出。その後、RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction; Stratagene)を用いてtRNAからcDNAを合成した。

各々のサンプルから合成したcDNAに対して

表1

	性別		年齢 (年)			病悩期間 (年)			ステロイド総投与量 (g)		
	男性	女性	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean
ステロイド治療抵抗性 UC	4	2	55	15	34.5	14	2.3	6.3	60	1	18.3
ステロイド治療反応性 UC	1	3	44	24	34.3	10.3	0.1	3.9	20	0.2	8.8
コントロール	2	2	73	59	67	—	—	—	—	—	—

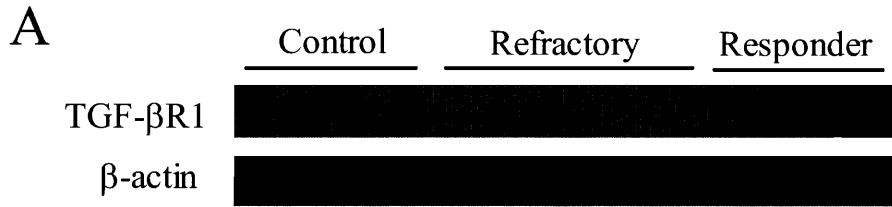


図 1 A. 腸管局所における蛋白レベルでの TGF- β R I および β -Actin の発現。
Control およびステロイド治療反応性 UC と比較し, 治療抵抗性 UC では TGF- β R I 発現は低下を示す。

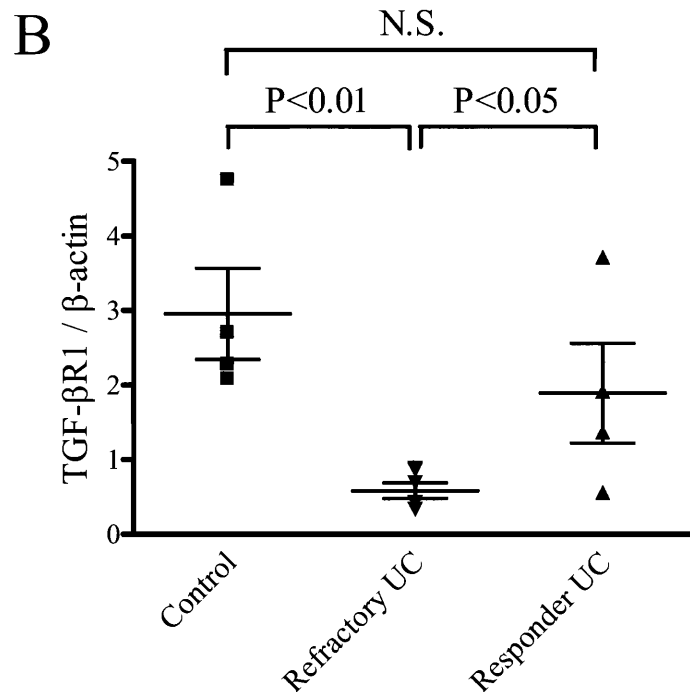


図 1 B. TGF- β R I の蛋白レベルでの発現。
ステロイド治療抵抗性 UC (0.587 ± 0.105) は, 治療反応性 UC (1.89 ± 0.670), Control (2.96 ± 0.614) と比較し有意に低値 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) を示す。

それぞれのプライマーを用いて, iCycler iQTM version3.1/BIORAD で Real-time PCR を行った。TGF- β R I, R II のプライマー (SingleGene PCR Kit/Super signal array) を用いた Real-time PCR では, annealing temperature を 55°C に設定し, 内因性コントロールとして human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

各群の統計学的解析は Unpaired t test で評価した。

結 果

TGF- β R I 蛋白質の発現レベルに関し, コントロール (2.96 ± 0.614) とステロイド治療反応性 UC (1.89 ± 0.670) の間には有意差は認められなかったが, ステロイド治療抵抗性 UC (0.587 ± 0.105) ではコントロールに比べ有意に ($P < 0.01$) 低下していた (図 1B)。さらに, 治療抵抗性 UC では治療反応性 UC と比較し有意に ($P < 0.05$) 低値であった (図 1B)。

mRNA レベルに関し, コントロール ($0.200 \pm$

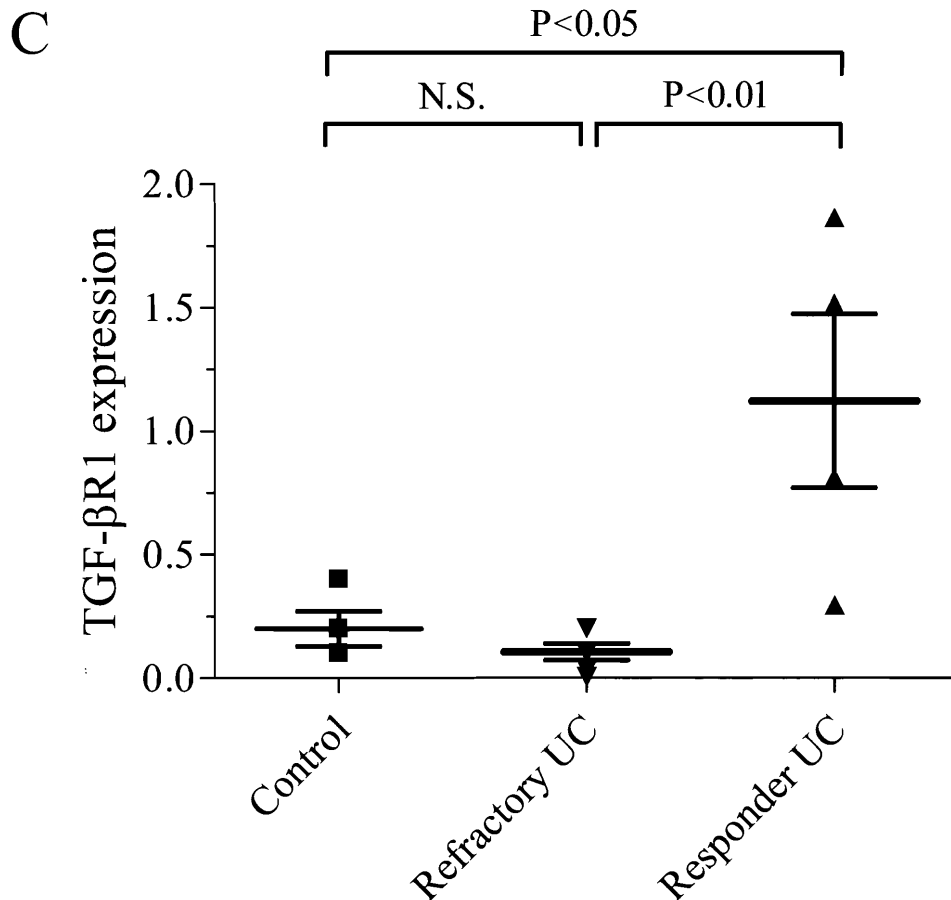


図1C. TGF- β RIのmRNAレベルでの発現。
ステロイド治療抵抗性UC (0.106 ± 0.0335)は、治療反応性UC (1.12 ± 0.352)と比較し有意に ($P < 0.01$) 低値を示す。

0.0707)と治療抵抗性UC (0.106 ± 0.0335)の間には有意差は認められなかったが、治療反応性UC (1.12 ± 0.352)ではコントロールに比べ有意に ($P < 0.05$) 高値であった(図1C)。さらに治療抵抗性UCでは治療反応性UCと比較し有意に ($P < 0.01$) 低値であった(図1C)。

TGF- β RIII蛋白質の発現レベルに関し、コントロール (6.92 ± 3.04)と治療反応性UC (5.02 ± 1.66)の間には有意差は認められなかったが、ステロイド治療抵抗性UC (1.02 ± 0.318)ではコントロールに比べ有意に ($P < 0.05$) 低下していた(図2B)。さらに、治療抵抗性UCでは治療反応性UCと比較し有意に ($P < 0.05$) 低値であった(図2B)。

mRNAレベルに関し、コントロール (0.325 ± 0.170)と治療抵抗性UC (0.185 ± 0.0465)、コン

トロールと治療反応性UC (1.82 ± 0.877)の間には有意差は認められなかった(図2C)。さらに治療抵抗性UCでは治療反応性UCと比較し有意に ($P < 0.05$) 低値であった(図2C)。

考 察

TGF- β は、Tリンパ球、上皮細胞、マクロファージ、間質細胞などの様々な細胞から分泌される細胞の形質転換を促進する因子の1つで、消化管粘膜上皮細胞の増殖や分裂、再生、粘膜免疫におけるバリア機能の制御、細胞外マトリックスの沈着促進に作用するサイトカインであり、細胞増殖抑制、炎症抑制、組織修復という役割を担う点で重要である¹²⁻¹⁴⁾。特に消化管において経口免疫寛容を司る重要な因子であること、さらに炎症性腸疾患では経口免疫寛容の破綻が病態に関与³⁾して

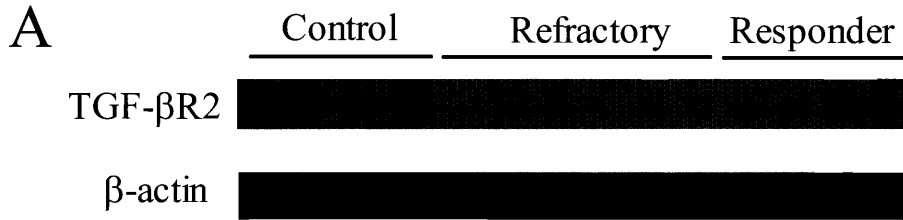


図2A. 腸管局所における蛋白レベルでの TGF-β R II および β-Actin の発現。Control およびステロイド治療反応性 UC と比較し、治療抵抗性 UC では TGF-β R II 発現は低下を示す。

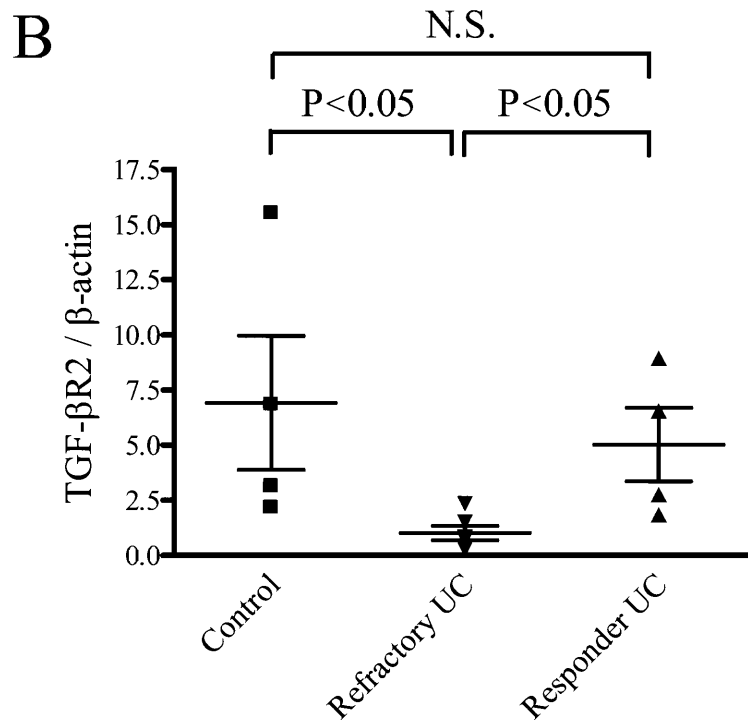


図2B. TGF-β R II の蛋白レベルでの発現。ステロイド治療抵抗性 UC (1.02±0.318) は、治療反応性 UC (5.02±1.66), Control (6.92±3.04) と比較し有意に低値 (P<0.05, P<0.05) を示す。

いることも報告されている。実際、炎症性腸疾患患者腸管における TGF-β の発現は増加していることが報告されている¹⁰⁾。一方、ドミナントネガティブ型 TGF-β 受容体 II 型を発現するトランスジェニックマウスでは、上皮細胞の再生が抑制されること¹⁵⁾、IBD 患者の腸管粘膜固有層単核球では Smad7 の発現増強により、TGF-β のシグナル伝達抑制が生じ、炎症性サイトカインの産生増強に結びつく可能性も示唆されている^{7,8)} ことから、受容体以下のレベルでのシグナル伝達の異常が病

態に関与していることが推測されている。

また、TGF-β 受容体は、I 型受容体と II 型受容体それぞれが 2 分子ずつ集合した 4 量体が活性型であり、恒常的に活性化されている II 型受容体に結合すると、I 型受容体がリクルートされ、4 量体を形成する。受容体蛋白は、I 型、II 型分子ともにセリン・スレオニンキナーゼ活性を持ち、II 型受容体が I 型受容体の GS(グリシン・セリン)ドメインのセリンをリン酸化すると、I 型受容体のリン酸化活性が亢進する。

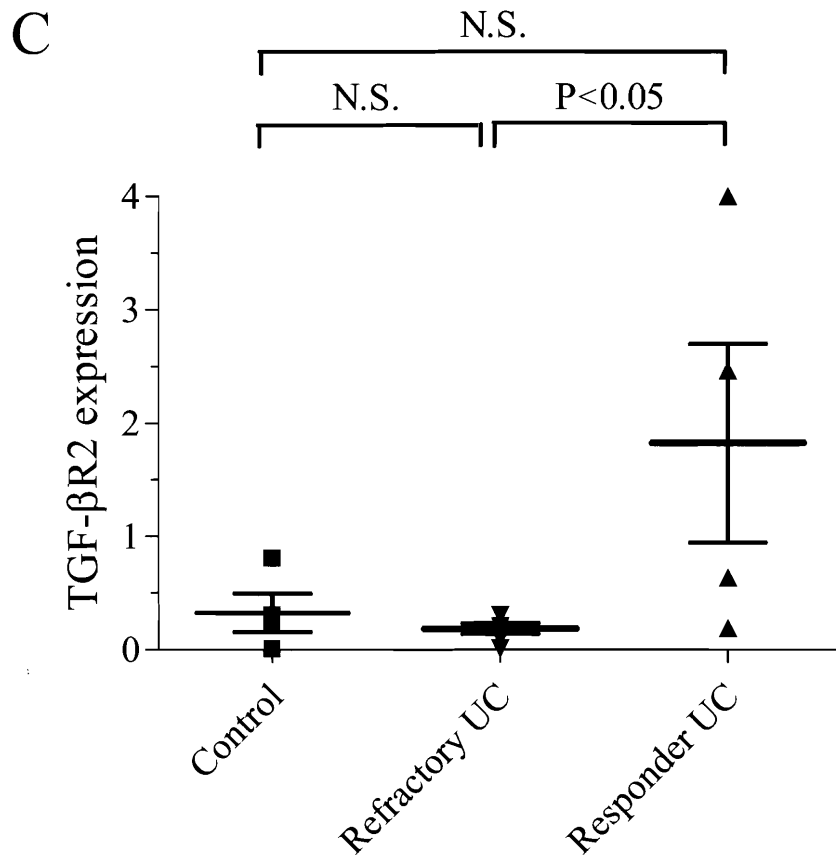


図2C. TGF- β R IIの mRNA レベルでの発現。
ステロイド治療抵抗性 UC (0.185 ± 0.0465) は、治療反応性 UC (1.82 ± 0.877) と比較し有意に ($P < 0.05$) 低値を示す。

TGF- β による細胞内シグナルを伝える主な分子は、Smadと呼ばれるもので、転写因子の1つである。Smadは哺乳類で8種類確認されており、その中で特異型 Smadとして TGF- β やアクチビンのシグナルを伝達する Smad2,3, BMP (bone morphogenetic protein) のシグナルを伝達する Smad1,5,8 などが知られている。共有型 Smad と呼ばれる Smad4 は、全ての Smad とヘテロ複合体を形成する。抑制型 Smad と呼ばれる Smad6,7 は、シグナルを負に調節する役割を持っている。特異型 Smad2,3 は細胞質で SARA (Smad anchor for receptor activation) と結合しているが、活性化された I 型受容体が Smad のセリンをリン酸化して活性化すると、受容体からも SARA から外れて、共有型 Smad4 とヘテロ複合体を形成し、細胞質から核に移行して、直接標的遺伝子の転写活性を制御し、様々な生理活性を示す¹⁶⁾。

今回の検討では、TGF- β R I, R II 蛋白質の発現レベルに関し、コントロールとステロイド治療反応性 UC の間には有意差は認めなかった。また、mRNA 発現は、コントロールと治療抵抗性 UC の間には有意差は認められず、一方、コントロールに比し治療反応性 UC では有意に亢進していた。コントロール群での TGF- β R の蛋白質レベル、mRNA レベルでの発現を腸管正常組織での恒常的な状態と考えるならば、治療反応性 UC 群では TGF- β R の mRNA の発現の亢進により蛋白質レベルでの発現が回復しており、一方、治療抵抗性 UC では mRNA 発現レベルの低下が蛋白質レベルでの発現低下に関連していることが推測される。治療抵抗性 UC における TGF- β R 発現低下の機序に関しては、今後さらなる検討が必要と考えられた。

これまで、Smad3 ノックアウトマウスでの

腸管粘膜への炎症細胞浸潤の報告¹⁷⁾や、抑制型 Smad である Smad7 の発現亢進により Smad シグナル伝達が障害され、炎症の持続する病態を形成しているとの報告^{7,8)}があるが、今回の検討から、その上流にある受容体レベルでの発現低下が、炎症の持続する病態を形成する可能性が示唆された。

以上より、腸管粘膜局所では TGF- β 発現量が増加しているにも関わらず、TGF- β 関連シグナルの伝達障害が生じているため、慢性炎症が持続している可能性が示唆された。

結 語

蛋白レベルのみならず遺伝子レベルでの TGF- β 受容体の発現の低下が、TGF- β -Smad 系のシグナル伝達を障害し、ステロイド抵抗性 UC の病態に関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
- 2) Pullman WE, Elsbury S, Kobayashi M, Hapel AJ, Doe WF. Enhanced mucosal cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;102:529-37.
- 3) Kraus TA, Toy L, Chan L, Childs J, Mayer L. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004;126:1771-8.
- 4) Meuwissen SG, Ewe K, Gassull MA, Geboes K, Jewell D, Pallone F, Rachmilewitz D, et al. IOIBD questionnaire on the clinical use of azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporin A and methotrexate in the treatment of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000;12:13-8.
- 5) Blonski W, Lichtenstein GR. Safety of biologic therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:769-96.
- 6) Flood L, Lofberg R, Stierna P, Wikstrom AC. Glucocorticoid receptor mRNA in patients with ulcerative colitis: a study of responders and nonresponders to glucocorticosteroid therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2001;7:202-9.
- 7) Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2001;108:601-9.
- 8) Boirivant M, Pallone F, Di Giacinto C, Fina D, Monteleone I, Marinaro M, Caruso R, et al. Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF- β 1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology* 2006;131:1786-98.
- 9) Fiocchi C. TGF- β /Smad signaling defects in inflammatory bowel disease: mechanisms and possible novel therapies for chronic inflammation. *J.Clin.Invest*. 2001;108:523-6.
- 10) Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors α and β in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;110:975-84.
- 11) Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-9.
- 12) Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-61.
- 13) Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β - secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182:207-14.
- 14) Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jan;2(1):46-53.
- 15) Bottinger EP, Jakubczak JL, Roberts IS, Mummy M, Hemmati P, Bagnall K, Merlino G, et al. Expression of a dominant-negative mutant TGF- β type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF- β in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *EMBO J*. 1997;16:2621-33.
- 16) Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- β receptor. *Cell* 1998;95:779-91.
- 17) Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L,

Hayman R, Gu H, Roberts AB, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . EMBO J. 1999;18:1280-91.