

炎症性腸疾患における fractalkine と matrix metalloproteinases の発現 ー局所炎症制御機序と鑑別診断への有用性

藤田 穰

fractalkine (FKN) は1997年に同定された chemokine であるが、白血球走化作用のみならず細胞接着作用をも合わせ持っている。また、細胞基質分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) も chemokines と同様、種々の炎症性疾患に関わっている。そこで、潰瘍性大腸炎 (UC) およびクローン病 (CD) の粘膜局所における chemokines および MMPs の蛋白および mRNA の発現を活動部位別に検討した。UC 20例 (男性13例, 女性7例, 平均41.4歳, 全大腸炎型11例, 左側大腸炎型6例, 直腸炎型3例), CD 10例 (男性9名, 女性1名, 平均27.9歳, 小腸型6例, 小腸大腸型2例, 大腸型2例), および大腸に病変のない若年成人 (NC) 10例 (男性8例, 女性2例, 平均33.2歳) に大腸内視鏡検査を施行し、回腸末端, 虫垂開口部, S 状結腸, 直腸から生検を行った。抗 FKN, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MMP-3, -9, -12抗体を用いて凍結切片の免疫染色を行った。中拡大1視野での陽性細胞数を計測し, 3視野分を集計したうえでの平均陽性細胞数をタンパク発現の指標とし, 炎症の有無, 採取部位別に評価した。また, 生検組織から mRNA を抽出し, RT-PCR で FKN と MMPs の mRNA の発現を検討した。chemokines と MMPs とともに, 炎症部位では, 陽性細胞数, mRNA 発現ともに有意に増加していた。寛解期患者の非炎症部では陽性細胞数増加や mRNA 発現の亢進はいずれも認められなかったが, 活動期患者における非炎症部位では陽性細胞数の増加がないにもかかわらず mRNA の発現は有意に亢進していた。非炎症部位の採取部位別検討では, 回腸末端での FKN, MMP-3, -9, -12が CD での陽性細胞数が UC に比べて有意に高値で, 虫垂開口部では逆に UC での MCP-1, MMP-3, -9が CD に比べ高値であった。活動期の UC, CD 患者では, chemokines と MMPs は炎症部のみならず非炎症部においても mRNA の発現が亢進していた。しかし, 非炎症部では蛋白発現の増加が抑えられているため局所の炎症が惹起されていないものと考えられた。すなわち IBD においては, post-transcriptional regulation が有効に機能することで炎症を制御していることが示唆された。また, 部位別の検討では発現パターンが異なることから, 非炎症部位であっても回腸末端や虫垂開口部での chemokines や MMPs の発現を検討することにより, 鑑別困難例の診断などの臨床応用が期待できる。

(平成16年10月27日受理)

Local Expression of Fractalkine and Macrophage-Related Matrix Metalloproteinases in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: Regulation of Inflammation and Distinguishing Features in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis

Minoru FUJITA

Inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are relapsing chronic inflammatory disorders of the gut of unknown origin. Fractalkine (FKN) is a unique chemokine that is well known to induce the recruitment and accumulation of monocytes in inflamed tissue. However, it remains unclear whether FKN is involved in the local inflammation in IBD. The aims of this study were to assess the pathognomonic roles of monocyte/macrophage-related chemokines such as FKN and matrix metalloproteinases (MMPs) in IBD, to determine what the possible mechanisms regulating the local inflammation in these conditions are, and to investigate the distinguishing features of the local expression of such chemokines and macrophage-related MMPs in UC and CD. Twenty patients with UC (14 in the active phase, 6 quiescent), 10 patients with active CD and 10 healthy subjects were enrolled in this study. During colonoscopy, some biopsy samples were taken from the ileum, appendiceal orifice, sigmoid colon, and rectum. Immunohistochemistry and the reverse transcription polymerase chain reaction were used to determine the expression of FKN, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), MMP-3, -9, and -12 in these samples. In the noninflamed mucosa of the patients with quiescent UC, neither the number of immunohistochemically positive cells for chemokines and MMPs or expression of the mRNA of such substances increased, as expected. In patients with active UC and active CD, both mRNA expression and the number of immunohistochemically positive cells significantly increased in endoscopically inflamed mucosa. In endoscopically noninflamed mucosa in patients with active IBD, there was a discrepancy between the immunohistochemical findings and mRNA expression; that is, the mRNA expression of chemokines and MMPs was strikingly accelerated despite the absence of any increase in immunohistochemically positive cells. In the terminal ileum, FKN, MMP-3, -9, and -12 were strongly expressed even in the noninflamed mucosa in active CD but not in active UC. In contrast, in the appendiceal orifice, MCP-1, MMP-3, and -9 were strongly expressed even in the noninflamed mucosa in active UC as compared with their expression in active CD. In noninflamed mucosa in active IBD, the protein expression of chemokines and macrophage-related MMPs was not accelerated despite a striking increase in mRNA expression. This finding suggests a pivotal role of post-transcriptional regulation in controlling the local inflammation in IBD. Therefore, assessment of the local status of chemokines and macrophage-related MMPs expression in the terminal ileum and appendiceal orifice may become an alternative for making a correct diagnosis in patients with indeterminate colitis. (Accepted on October 27, 2004) *Kawasaki Igakkaishi* 30(2):137-152, 2004

Key Words ① Inflammatory bowel diseases ② Fractalkine
 ③ Matrix metalloproteinases
 ④ Mechanisms of local inflammation ⑤ Differential diagnosis

はじめに

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, 以下 UC)

とクローン病 (Crohn's disease, 以下 CD) は、原因不明の炎症性疾患で大部分の症例では緩解と再燃を繰り返す。臨床像は異なるが、慢性炎症を呈し、共通した病態が存在することから、

両疾患をまとめて炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases, 以下 IBD) と総称する。

fractalkine (FKN) は、1997年に発見された白血球走化作用に細胞接着作用を合わせ持つユニークな chemokine である¹⁾。CX₃C サブファミリーに属し、tumor necrosis factor (TNF) - α や interleukin (IL) -1 β , lipopolysaccharide (LPS) などにより活性化される^{1), 2)}。単球/マクロファージ、血管内皮細胞、樹状細胞、腸管上皮細胞、グリア細胞などから産生され^{1)~6)}、単球/マクロファージ、NK 細胞、T 細胞、血小板などを標的細胞とする^{1), 3), 7)~10)}。種々の炎症の急性期に関与していることが報告されているが^{11)~13)}、IBD における検討は現時点で一つのみである⁵⁾。

細胞基質分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) は、生体組織の恒常性維持のための組織破壊に関与する生理的物質であるが、一方で癌の浸潤や転移、あるいは慢性関節リウマチ等の慢性炎症性疾患における関わりが指摘されており^{14)~16)}、FKN や monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 などの chemokines はその分泌を刺激する⁶⁾。IBD においても、活動

期の炎症粘膜に MMPs 発現が増強しているとの報告が散見される^{17)~20)}。

本研究では、UC および CD 患者の粘膜局所における chemokines (FKN, MCP-1) とマクロファージ関連 MMPs の発現を免疫組織化学および reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて同定し、疾患特異性の検討および炎症部位と非炎症部位との対比を試みた。

対象と方法

1. 対象

術前にインフォームドコンセントが得られ、臨床症状、内視鏡所見、および組織学的所見から診断の確定した UC 20例 (男性13例、女性7例、平均41.4 \pm 17.4歳、全大腸炎型11例、左側大腸炎型6例、直腸炎型3例)、CD 10例 (男性9例、女性1例、平均27.9 \pm 7.7歳、小腸型6例、小腸大腸型2例、大腸型2例)、および便秘あるいは下痢、便潜血陽性の精査で大腸内視鏡検査を受け異常所見のなかった若年成人 (normal control, 以下 NC) 10例 (男性8例、

Table 1. 対象群の臨床像

	UC		CD		NC
症例数	20例		10例		10例
年齢 (平均 \pm SD)	19~78歳 (41.4 \pm 17.4歳)		19~45歳 (27.9 \pm 7.7歳)		18~43歳 (33.2 \pm 12.8歳)
性 (男:女)	13:7		9:1		8:2
病型	全大腸炎型 11例	小腸型 6例	左側大腸炎型 6例	小腸大腸型 2例	直腸炎型 3例
				大腸型 2例	
治療	5-ASA 9例	5-ASA+経腸栄養療法 6例	5-ASA+PSL 8例	完全静脈栄養療法 1例	5-ASA+PSL+IS 1例
	無治療 2例		無治療 3例		

UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease; NC, normal control; SD, standard deviation; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; PSL, prednisolone; IS, immunosuppressants

女性2例, 平均 33.2 ± 12.8 歳)を対象とした。臨床的特徴を **Table 1** に示す。治療薬に関しては, UCでは, 18例に5-アミノサリチル酸製剤が投与され, うち9例ではプレドニゾロンも投与されていた。免疫抑制剤の投与は1例のみで, 2例は無治療であった。CDでは, 6例に5-アミノサリチル酸製剤投与および経腸栄養療法が施行され, 1例では完全静脈栄養療法が行

われていた。3例は無治療であった。

2. 組織採取

大腸内視鏡検査施行時に回腸末端, 虫垂開口部, S状結腸, 直腸の各部位から内視鏡用生検鉗子を用いて3個ずつ検体を採取し, 免疫染色用に1個, mRNA抽出用に2個使用した。免疫染色用検体は, periodate-lysin-paraformaldehyde固定液で4℃, 6時間固定した。20%

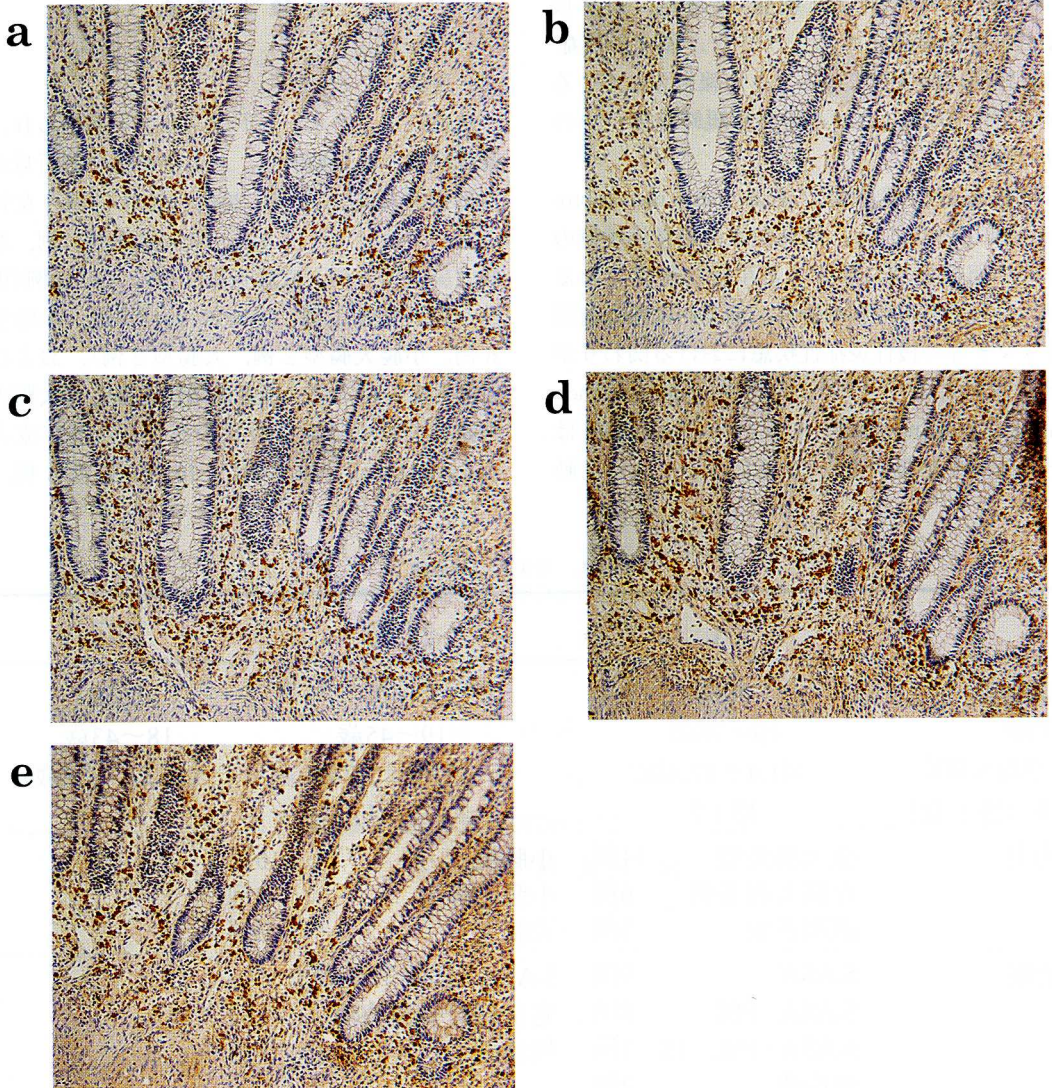


Fig. 1. 活動期 CD の炎症粘膜における免疫組織科学的所見 ($\times 100$).

いずれの chemokine, MMP においても, 単核球を中心とした陽性細胞を多数認めた。
a, FKN ; b, MCP-1 ; c, MMP-3 ; d, MMP-9 ; e, MMP-12

シヨ糖添加 phosphate-buffered saline (PBS) 溶液で約24時間浸漬後, OCT compound に包埋し, ドライアイス・アセトン溶液で急速凍結させた. mRNA 抽出用には, 検体を液体窒素で急速凍結させた. いずれも使用するまで -80°C で保存した.

3. 免疫染色

クリオスタットを用いて $5\ \mu\text{M}$ の切片を作成した. PBS 溶液で洗浄後, 3% 過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した. 抗ヒト FKN 抗体 (500 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology 社, 米国), 抗ヒト MCP-1 抗体 (1500 倍希釈, Chemicon 社, 米国), 抗ヒト MMP-3 抗体 (500 倍希釈, 富士薬品工業, 富山), 抗ヒト MMP-9 抗体 (500 倍希釈, 富士薬品工業, 富山), 抗ヒト MMP-12 抗体 (500 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology 社, 米国) を 1 次抗体として室温 4°C の暗室下に一晚反応させた. 次いでヒストファインシンプルステイン MAX-PO (ニチレイ, 東京) を添加し室温で 30 分反応させた後, 5% 過酸化水素水を加えた 0.02% 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride にて発色させ, ヘマトキシリンで核染色をした.

活動期 CD の炎症粘膜におけるそれぞれの chemokines, MMPs の免疫染色像を **Figure 1** に示す. 単核球を中心とした陽性細胞を多数認めたと, 詳細な同定は困難であったため, 100 倍の倍率で切片内の無作為に抽出した 3 視野中における陽性細胞数を計測し, その平均値を蛋白発現の指標とした.

4. mRNA の抽出および RT-PCR

acid guanidium-phenol-chloroform 法を用いて組織中の total RNA を抽出し, Oligo (dT) Cellulose (Ambion 社, 米国) を用いて mRNA を分離した. 得られた mRNA はエタノールで沈殿した後, diethylpyrocarbonate 処理蒸留水で溶解した. cDNA の合成は, 50 ng の mRNA を鋳型として, Random Decamers $50\ \mu\text{M}$ を添加し 85°C , 3 分間反応させた後, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, RNase inhibitor 10 単位, 各 dNTP 2.5 mM, moloney murine leukemia virus 由来逆転写酵素 (Ambion 社, 米国) 100 単位を加え, 総量 $20\ \mu\text{l}$ に調整し, 44°C , 60 分間反応させた. その後, 92°C , 10 分間の加熱にて酵素の非活性化を行った.

Table 2. Chemokines と MMPs のプライマー配列

FKN (283bp)	Upper	5'-GATATCTCTGTCGTGGCTGC-3'
	Lower	5'-ACCTTCGAGAAGCAGATCGG-3'
MCP-1 (469bp)	Upper	5'-GTGTGCCTGCTGCTCATA-3'
	Lower	5'-ATTTCCCCAAGTCTCTGT-3'
MMP-3 (386bp)	Upper	5'-ACAGACCTGACTCGGTTCCG-3'
	Lower	5'-CGTGAGGAAAATCGATGCAG-3'
MMP-9 (262bp)	Upper	5'-TCATCCAGTTTGGTGTTCGCG-3'
	Lower	5'-AACTACGACACCGACGACCG-3'
MMP-12 (203bp)	Upper	5'-TCAGGATTTGGCAAGCGTTG-3'
	Lower	5'-TCGTCCTCATCGAAATGTGC-3'
GAPDH (173bp)	Upper	5'-AATTCCATGGCACC GTCAAG-3'
	Lower	5'-CAAATGAGCCCCAGCCTTCT-3'

以上で作成した cDNA を鋳型に, PCR 法で chemokines, MMPs に加え, positive control として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の cDNA を増幅した. 検討した chemokines, MMPs, GAPDH のプライマー配列を **Table 2** に示すが, MCP-1 は既報のものに準じた²¹⁾. 各プライマー 10 μ M, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, dUTP, dATP, dCTP, dGTP 各 200 μ M を含む反応液に 5 倍希釈した cDNA 2 μ l を加え, 2.5 単位の AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems 社, 米国) を添加し, 総量 20 μ l に調節し PCR を行った. 95 $^{\circ}$ C, 10 分間の initial denaturation 後に, denaturation (92 $^{\circ}$ C, 1 分間), annealing (55 $^{\circ}$ C, 1 分間), extension (72 $^{\circ}$ C, 1 分間) の反応を 40 サイクル行い, 最終 extension (72 $^{\circ}$ C, 10 分間) で反応を終了した. PCR 最終産物は 2.0% アガロースゲル上で電気泳動した後, etidium bromide で染色し, 紫外線照射下で発現の有無を判定した.

活動期 UC の炎症粘膜と非炎症粘膜, および NC における mRNA の発現を **Figure 2** に示す. 得られたバンドは画像解析ソフト (NIH Image Ver. 1.62) を用いて数値化し, GAPDH との割合を mRNA 発現の指標として比較検討した.

5. 統計解析

統計解析ソフトは Macintosh 版 Stat View Ver. 5.0 を用いて行い, 各群間の比較を Mann-Whitney U test で行った. p 値は 0.05 未満を有意とした. また, **Table** 中の陽性細胞数および mRNA の発現は, 平均 \pm 標準偏差で表示した. さらに, 発現された mRNA がどの程度蛋白合成に利用されているかを示す指標として, chemokines, MMPs の陽性細胞数と mRNA 発現との割合を転写後調節率 (post-transcriptional regulation rate, 以下 PTRR) と定義した. 活動期 IBD の炎症粘膜と非炎症粘膜および寛解期 IBD における PTRR を算出し, 比較検討した.

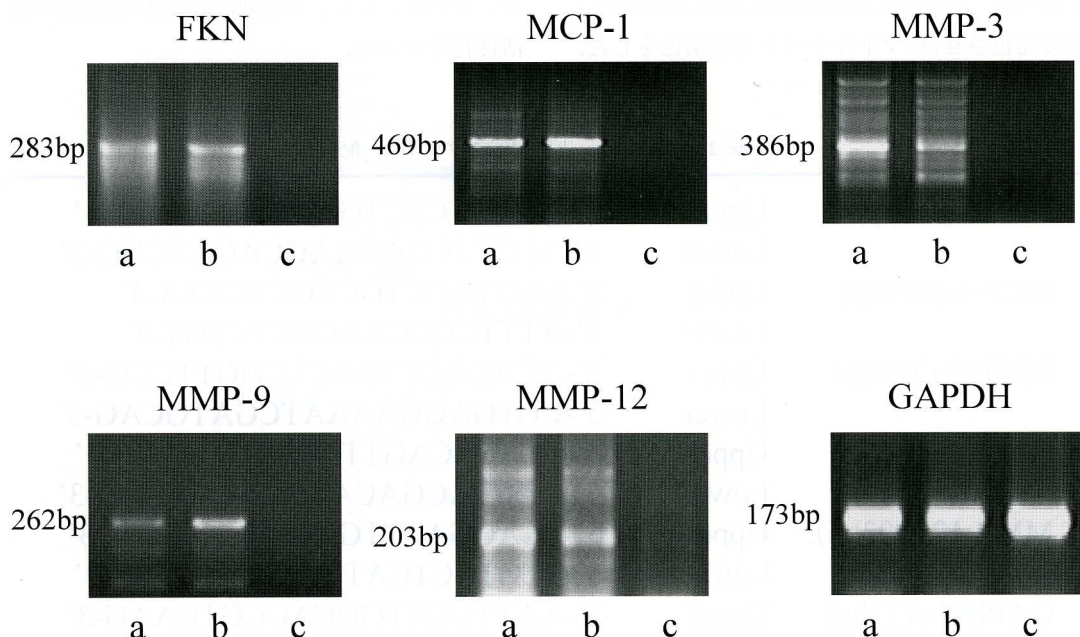


Fig. 2. RT-PCR による活動期 UC における mRNA の発現の検討.

いずれの chemokine, MMP においても, mRNA の発現は炎症粘膜と非炎症粘膜と同程度認められた. NC はほとんど mRNA の発現はみられなかった.

a, 炎症粘膜; b, 非炎症粘膜; c, normal control

結 果

1. 寛解期 IBD における chemokines と MMPs の発現

CD 症例は全例活動期であったため、寛解期 UC 症例を寛解期 IBD とした。FKN, MCP-1 の発現は、免疫組織化学的検討では寛解期 IBD と NC との間に有意差は認められなかったが (Fig. 3A), mRNA の発現はいずれも寛解期 IBD で有意に高値であった ($p < 0.01$)

(Fig. 3B). MMPs の検討でも、免疫組織化学的検討ではいずれの MMPs も両群間に有意差を認めなかった (Fig. 4A). しかし、mRNA では、MMP-3 が寛解期 IBD で有意に高値を示した ($p < 0.01$) (Fig. 4B).

2. 活動期 IBD の炎症粘膜における chemokines と MMPs の発現

UC, CD いずれも活動期の炎症粘膜では、FKN, MCP-1 の陽性細胞数が NC に比べて約 2.5~6 倍に増加していた (Fig. 5A). mRNA の発現も、NC に比べて約 5~12 倍に亢進して

いた (Fig. 5B). MMPs の検討でも、免疫組織化学的検討, mRNA の発現ともに、NC に比べて約 3~7 倍に亢進していた (Fig. 6A, 6B). ただし、UC と CD との間には有意差を認めなかった。

3. 活動期 IBD の非炎症粘膜における chemokine と MMPs の免疫組織化学的および mRNA 発現の検討

活動期の UC, CD であっても、非炎症粘膜では chemokine の蛋白発現は NC の約 0.8~1.7 倍で、明らかな発現亢進は認められなかった (Fig. 7A). MMPs についても chemokine と同様であった (約 1.0~1.7 倍) (Fig. 7B).

一方、mRNA の発現では、非炎症粘膜であっても chemokine (Fig. 8A), MMPs (Fig. 8B) とともに NC と比べ約 4~10 倍に発現が亢進していた。

4. 活動期 IBD の炎症粘膜と非炎症粘膜および非活動期 IBD における蛋白と mRNA 発現の関係

UC, CD いずれも活動期非炎症粘膜で、活動期炎症粘膜や寛解期 UC と比べ PTRR が有

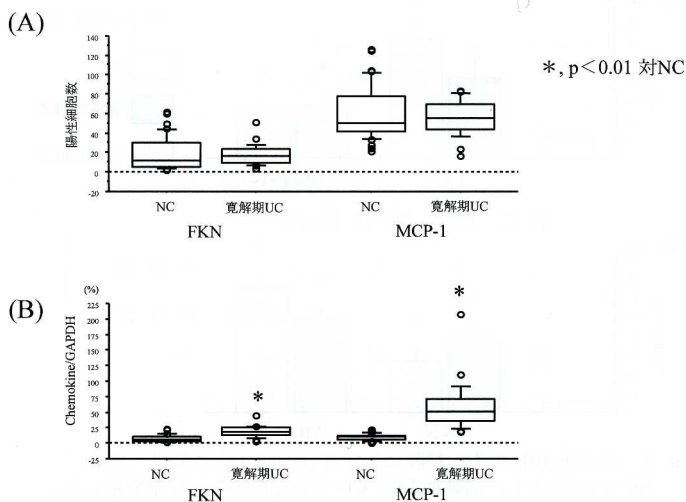


Fig. 3. 寛解期 UC における chemokines の発現の検討.

(A) 免疫染色による NC と寛解期 UC の比較では、FKN, MCP-1 いずれも陽性細胞数に有意差はなかった。

(B) RT-PCR による NC と寛解期 UC の比較では、FKN, MCP-1 いずれも寛解期 UC で NC と比し陽性細胞数が高値であった ($p < 0.01$).

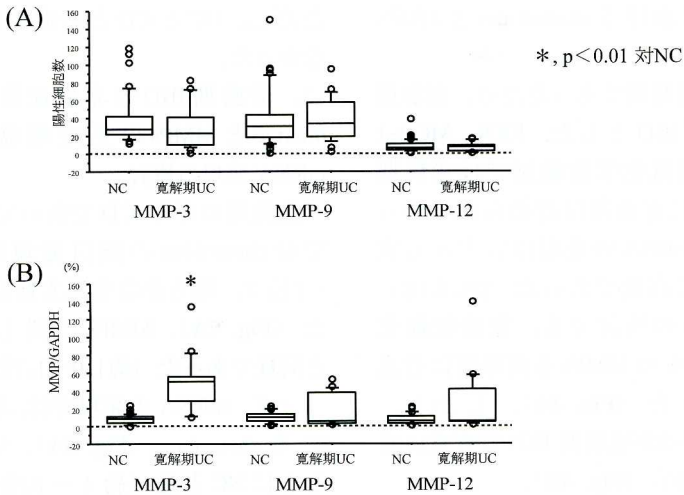


Fig. 4. 寛解期 UC における MMPs の発現の検討。
 (A) 免疫染色による NC と寛解期 UC の比較では、MMPs の陽性細胞数に有意差はなかった。
 (B) mRNA の発現は、寛解期 UC の MMP-3 で NC と比し有意に高値であった ($p < 0.01$)。

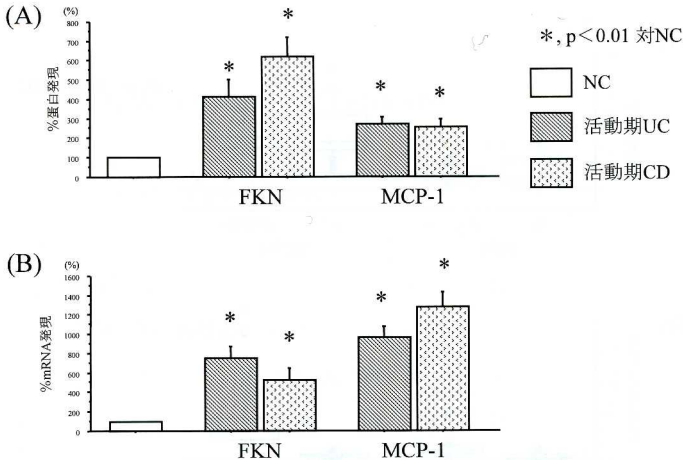


Fig. 5. 活動期 IBD の炎症粘膜における chemokines の発現の検討。
 NC を 100% とし、活動期 UC、CD での発現率を百分率で示した。
 免疫組織学的検討 (A) でも RT-PCR (B) でも chemokines の発現は亢進していた。活動期 UC、CD 間に有意差はなかった。

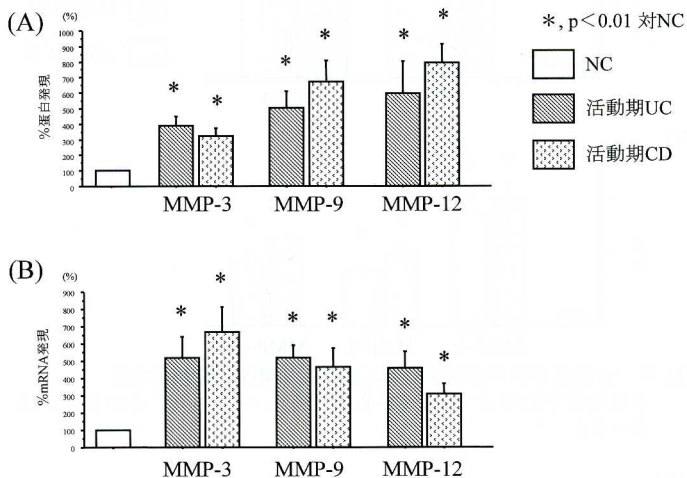


Fig. 6. 活動期 IBD の炎症粘膜における MMPs の発現の検討
免疫組織学的検討 (A), RT-PCR (B) 双方において MMPs の発現が高度であった。免疫組織学的検討, RT-PCR ともに活動期 UC, CD 間に有意差はなかった。

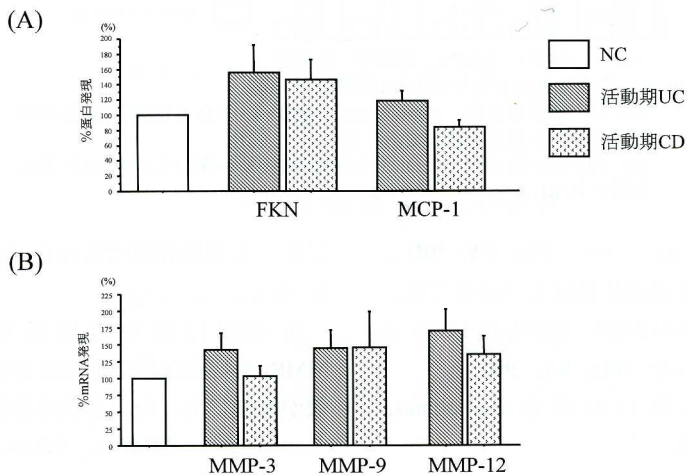


Fig. 7. 活動期 IBD の非炎症粘膜における chemokines の発現の検討
免疫組織学的検討 (A), RT-PCR (B) いずれも NC との有意差は認めなかった。

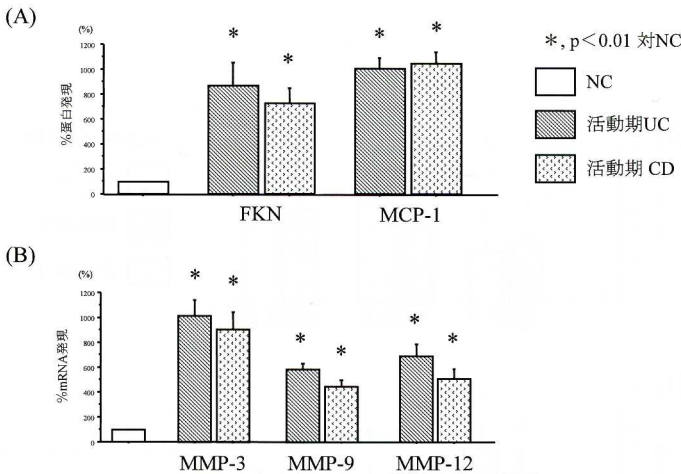


Fig. 8. 活動期 IBD の非炎症粘膜における MMPs の発現の検討
免疫組織学的検討 (A), RT-PCR (B) いずれも NC との有意差は認めなかった。

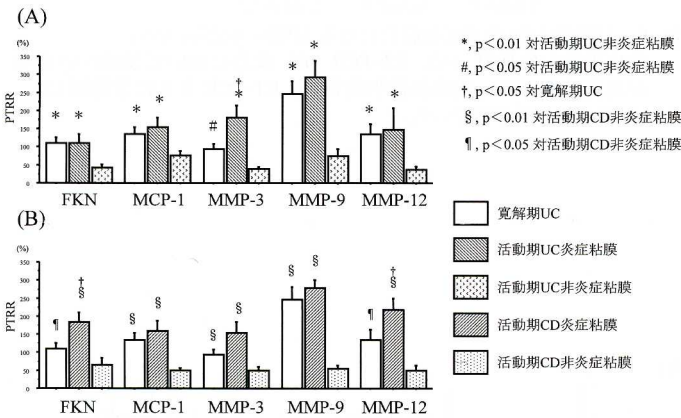


Fig. 9. 各炎症状態における転写後調節率の相違
(A) UC での検討は, chemokines, MMPs いずれも活動期非炎症粘膜で PTRR が有意に低値であった ($p < 0.05$).
(B) CD での検討でも, chemokines, MMPs いずれも活動期非炎症粘膜で PTRR が有意に低値であった ($p < 0.05$).

意に低値であった ($p < 0.05$) (Fig. 9A, 9B). 活動期の炎症粘膜と非炎症粘膜との比較では, UC の MMP-3, CD の FKN, MMP-12 以外は有意差を認めなかった (Fig. 9A, 9B).

5. 検体採取部位における chemokines, MMPs の発現の相違

回腸末端では, chemokines, MMPs の陽性細胞数は非炎症部位に比べ炎症部位で高値であった。しかし, 非炎症粘膜間の比較では FKN, MMP-3, MMP-9, MMP-12 の非炎症粘膜における陽性細胞数が, 活動期 CD で活動期 UC

に比べ有意に高値であった ($p < 0.05$) (Table 3, 4).

虫垂開口部での検討でも chemokines, MMPs も炎症部位で非炎症部位に比べ陽性細胞数が高値であった。非炎症粘膜間における比較では MCP-1, MMP-3, MMP-9 の非炎症粘膜における陽性細胞数が活動期 UC で活動期 CD に比べ有意に高値 ($p < 0.05$) であった (Table 3, 4).

S 状結腸および直腸の免疫組織化学的検討では活動期 IBD 間に有意差は認められなかつ

Table 3. 採取部位別の chemokines の免疫組織化学的所見

	FKN		MCP-1	
	炎症粘膜	非炎症粘膜	炎症粘膜	非炎症粘膜
回腸末端				
NC	—	22.2±21.5	—	60.6±25.3
寛解期UC	—	15.1±6.9	—	41.9±18.8
活動期UC	—	15.1±13.3	—	51.0±22.1
活動期CD	135.0±56.4*#†	35.3±17.4#	143.1±48.9*#†	72.7±38.4
虫垂開口部				
NC	—	25.4±15.6	—	80.1±22.7
寛解期UC	—	25.6±13.4	—	53.8±13.7
活動期UC	99.5±65.2*#†	50.8±33.9	173.3±52.8*#†	97.2±49.7#†
活動期CD	96.0±56.9*#†	38.6±32.4	140.2±75.3*#†	47.6±22.8
S状結腸				
NC	—	9.9±8.7	—	50.9±19.5
寛解期UC	—	20.0±9.1	—	67.5±15.5
活動期UC	138.8±77.0*#†	35.7±55.8	185.0±25.6*#†	59.6±47.1
活動期CD	127.7±119.0*#†	29.1±7.0	204.1±111.0*#†	47.7±29.2
直腸				
NC	—	17.1±16.4	—	50.6±31.0
寛解期UC	—	8.6±4.0	—	58.3±16.0
活動期UC	37.3±23.1*#†	—	133.4±88.1*#†	—
活動期CD	—	17.6±24.3	—	51.2±34.9

FKN, fractalkine ; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1 ; NC, normal controls ; UC, ulcerative colitis ; CD, Crohn's disease ; *, p<0.05 対 NC ; #, p<0.05 対 寛解期 UC 非炎症粘膜 ; ※, p<0.05 対 活動期 UC 非炎症粘膜 ; †, p<0.05 対 活動期 CD 非炎症粘膜

Table 4. 採取部位別の MMPs の免疫組織化学的所見

	MMP-3		MMP-9		MMP-12	
	炎症粘膜	非炎症粘膜	炎症粘膜	非炎症粘膜	炎症粘膜	非炎症粘膜
回腸末端						
NC	—	40.4±30.2	—	44.4±27.1	—	8.6±6.7
寛解期UC	—	28.8±25.3	—	30.4±24.4	—	7.6±5.4
活動期UC	—	35.2±19.9	—	31.8±20.3	—	21.2±19.0
活動期CD	118.6±32.4*#†	68.7±15.5*#	345.4±212.1*#†	75.7±21.7*#	112.9±60.2*#†	64.9±41.1*#
虫垂開口部						
NC	—	47.1±31.0	—	52.2±40.7	—	8.3±3.8
寛解期UC	—	29.9±21.5	—	30.0±21.5	—	7.0±3.6
活動期UC	150.8±27.5*#†	92.0±46.9*#†	163.5±40.1*#†	98.3±36.5*#†	82.8±84.0*#†	37.4±56.4
活動期CD	94.9±60.5*#†	37.5±24.8	132.9±45.5*#†	33.8±27.6	77.8±65.6*#†	13.9±14.3
S状結腸						
NC	—	30.0±13.1	—	29.0±23.4	—	7.4±3.9
寛解期UC	—	33.3±26.0	—	36.8±11.9	—	7.9±7.0
活動期UC	195.3±59.7*#†	53.9±47.0	191.3±111.1*#†	49.9±37.7	95.9±99.7*#†	30.7±45.4
活動期CD	149.8±122.0*#†	37.2±28.4	351.2±349.6*#†	32.5±16.4	73.6±55.1*#†	19.9±23.1
直腸						
NC	—	34.5±26.3	—	29.8±25.7	—	9.3±11.3
寛解期UC	—	11.7±8.1	—	16.6±8.0	—	5.6±3.9
活動期UC	120.3±104.0*#†	—	156.4±190.9*#†	—	45.0±56.7*#†	—
活動期CD	—	31.8±35.5	—	87.1±173.5	—	13.8±20.8

MMP, matrix metalloproteinase ; NC, normal controls ; UC, ulcerative colitis ; CD, Crohn's disease ; *, p<0.05 対 NC ; #, p<0.05 対 寛解期 UC 非炎症粘膜 ; ※, p<0.05 対 活動期 UC 非炎症粘膜 ; †, p<0.05 対 活動期 CD 非炎症粘膜

た (Table 3, 4).

RT-PCR では、活動期 IBD はいずれの部位でも炎症粘膜、非炎症粘膜ともに NC や寛解

期 IBD と比べ mRNA の発現が増加していたが、活動期 IBD 間に有意差は認められなかった (Table 5, 6).

Table 5. 採取部位別の chemokines の mRNA 発現

	FKN		MCP-1	
	炎症粘膜	非炎症粘膜	炎症粘膜	非炎症粘膜
回腸末端				
NC	—	6.7±6.5	—	10.9±5.4
寛解期UC	—	19.7±5.4*	—	64.8±16.1*
活動期UC	—	60.5±29.0**	—	82.5±44.5**
活動期CD	68.6±84.0**	41.0±17.8**	123.1±42.0**	101.1±35.2**
虫垂開口部				
NC	—	8.0±6.7	—	8.8±5.0
寛解期UC	—	15.4±7.5	—	57.0±29.4*
活動期UC	59.9±47.3**	71.2±68.8**	84.3±54.7	97.1±20.5**
活動期CD	54.1±32.1**	69.9±78.9**	88.9±76.5	117.5±38.7**
S状結腸				
NC	—	7.6±6.6	—	9.0±6.0
寛解期UC	—	21.0±13.2*	—	46.7±28.7*
活動期UC	68.0±34.3**	72.3±31.1**	97.7±65.0	119.1±39.4
活動期CD	88.9±91.0**	95.3±36.5**	124.1±83.2	96.5±29.6
直腸				
NC	—	7.1±4.1	—	8.6±4.5
寛解期UC	—	15.0±7.1	—	47.8±25.5*
活動期UC	85.5±66.0**	—	103.9±49.8**	—
活動期CD	—	72.3±24.2**	—	102.9±25.3**

FKN, fractalkine ; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1 ; NC, normal controls ; UC, ulcerative colitis ; CD, Crohn's disease ; *, p < 0.05 対 NC ; #, p < 0.05 対寛解期 UC 非炎症粘膜 ; ※, p < 0.05 対活動期 UC 非炎症粘膜 ; †, p < 0.05 対活動期 CD 非炎症粘膜

Table 6. 採取部位別の MMPs の mRNA 発現

	MMP-3		MMP-9		MMP-12	
	炎症粘膜	非炎症粘膜	炎症粘膜	非炎症粘膜	炎症粘膜	非炎症粘膜
回腸末端						
NC	—	4.1±4.0	—	8.8±7.0	—	7.9±6.3
寛解期UC	—	20.6±16.3*	—	18.5±18.5	—	17.0±19.6
活動期UC	—	76.2±52.5**	—	59.1±27.5**	—	58.5±47.2**
活動期CD	69.1±26.5**	55.0±37.6**	64.5±62.7**	46.3±35.8**	35.9±24.8**	25.8±16.5**
虫垂開口部						
NC	—	9.9±4.4	—	10.3±4.9	—	8.3±6.5
寛解期UC	—	36.5±19.5*	—	10.0±15.4*	—	15.4±17.7
活動期UC	60.7±37.6**	103.3±68.6**	43.1±31.7**	63.3±20.9**	54.0±39.4**	63.7±35.3**
活動期CD	72.0±25.9**	88.4±59.9**	24.5±29.0*	38.8±31.2*	46.9±45.5**	40.4±29.6**
S状結腸						
NC	—	8.2±3.8	—	10.0±5.4	—	9.7±5.3
寛解期UC	—	46.7±38.7*	—	18.3±22.9	—	14.1±24.7
活動期UC	69.9±23.3**	103.2±68.4**	65.1±26.8**	53.8±16.7**	46.0±28.6**	75.0±40.6**
活動期CD	78.1±36.4**	111.8±75.5**	48.7±38.2**	50.8±15.5**	60.9±40.3**	50.9±41.0**
直腸						
NC	—	8.5±7.5	—	10.7±6.6	—	4.4±3.1
寛解期UC	—	51.3±27.9*	—	16.6±8.0	—	19.0±24.5
活動期UC	86.2±38.8**	—	44.4±31.3**	—	65.6±39.3**	—
活動期CD	—	113.2±77.9**	—	46.5±20.2**	—	47.3±24.8**

MMP, matrix metalloproteinase ; NC, normal controls ; UC, ulcerative colitis ; CD, Crohn's disease ; *, p < 0.05 対 NC ; #, p < 0.05 対寛解期 UC 非炎症粘膜 ; ※, p < 0.05 対活動期 UC 非炎症粘膜 ; †, p < 0.05 対活動期 CD 非炎症粘膜

考 察

IBDの病因, 病態は, 分子生物学的手法が開発されて久しい現在となっても, いまだ不明である. chemokines や MMPs に関しても一定の見解が得られていないのが現状である.

CDの動物モデルと考えられるインドメタシン誘発ラット小腸縦走潰瘍では, 腸内細菌叢由来のLPSによりマクロファージが刺激され, 炎症性サイトカインやMMPsの産生が誘発し小腸縦走潰瘍が発生する^{22)~25)}. 本研究では, 実際のIBD患者の腸管局所において単球・マクロファージを標的とするFKNとマクロファージ関連MMPsがどのように関与しているかを検討することを目的とした. その結果, chemokines と MMPs のいずれに関しても, 炎症部位では, 陽性細胞数, mRNA発現ともに増加していることが判明した. 非炎症部位の検討では, 寛解期の患者では陽性細胞数増加もmRNA発現の亢進も認められなかった. しかし, 非炎症部位でも陽性細胞数増加がないにもかかわらずmRNAの発現が亢進していた. 以上のことから, 活動期IBD患者の非炎症粘膜では, mRNAの転写から蛋白発現に至るまでの間に何らかの制御が働き非炎症状態が維持されていることが推測された. すなわち, IBD患者におけるchemokinesやMMPsの発現に転写後調節(post-transcriptional regulation, 以下PTR)の存在が示唆された.

本研究でPTRを司る因子が何であるかは全く不明であり, 詳細に関しては今後の検討が必要であるが, PTRに関する研究は現在非常に注目されている分野である. 核内のDNA上に存在している遺伝情報から機能を持った蛋白として発現されるまでには, mRNAのスプライシングや細胞質への輸送, mRNAの翻訳などの過程が必要である. この一連の過程においてmRNAが分解されることなく安定に維持されること, すなわちRNA stabilityが最も重要であり, RNA stabilityが低下すると蛋白発現量

は減少する^{26)~28)}. chemokines や MMPs の PTR に関する研究では, この RNA stability の面からみた検討が多い. mRNA の 3' 側の非翻訳領域に AUUUA 配列を示す adenylate/uridylylate-rich elements (AURE) という部位が存在するが, この AURE は RNA stability を調節する領域である²⁹⁾. AURE 結合蛋白として知られている embryonic lethal abnormal vision protein の相同体である Hu ファミリーの一つに HuR があり, この HuR は AURE に結合することで MMP-9 の RNA stability を増強する³⁰⁾. 一方で, 一酸化窒素 (nitric oxide, 以下 NO) は, この HuR の発現を阻害し, MMP-9 の RNA stability を低下させるとの報告がある^{31), 32)}. NO は一般的に IBD の増悪因子と考えられているため, MMP-9 の mRNA stability 低下作用は相反する事象であるが, NO には有害作用のみならず生体への有益な作用をも併せ持つことが以前から示されており, HuR の AURE 結合制御機構などを上手く利用すれば, IBD の治療への応用も可能となるかもしれない. また, 細胞内シグナル伝達経路である p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway は FKN, MCP-1, MMP-3, MMP-9 の蛋白発現に関与するが, mRNA の 3' 末端のポリ (A) 鎖の長さを調節したり AURE 結合蛋白の AURE への結合を統御して, RNA stability や翻訳効率を制御していることが示されている³³⁾. p38 MAPK pathway も IBD の増悪因子として報告されているが, PTR レベルでの chemokines や MMPs の発現調節がその一因を担っている可能性もある³⁴⁾. RNA stability は薬剤によっても影響される. IBD 薬物治療の中心をなすステロイド剤であるが, dexamethasone には MCP-1 の mRNA 上に存在する dexamethasone sensitive region を介して RNA stability を低下させる作用があることが知られている³⁵⁾. 他の chemokines や MMPs の mRNA 上にも dexamethasone sensitive region のようなステロイド感受性領域が存在する可能性があり, さらに5-アミノサリチル酸製剤や免疫抑制剤などにも同様の機構

が存在するかもしれない。PTRは種々の調節機構の総称であり、IBDで中心的に働くPTRがどのようなものであるかは現在のところ不明であるが、今後の解析次第では治療へ直結させることも十分可能であると考えられる。

臨床的なCDの特徴は回腸末端に病変が好発することで、UCの特徴は直腸から口側腸管への連続性びまん性の病変とともに、虫垂開口部へのスキップした炎症性病変である^{36),37)}。今回の検討で興味深い点の一つとして、CDの回腸末端では、たとえ一見正常で肉眼的炎症性変化が認められなくてもMCP-1以外のchemokines, MMPsの発現が有意に高値であったことである。また、UCの虫垂開口部ではたとえ炎症が認識できなくてもMCP-1, MMP-3, MMP-9の発現が有意に高値であった。UC, CDいずれにおいてもIBDの診断は、臨床症状、内視鏡やX線などの画像検査、病理学的検索を併せて、その特徴的な所見から行うのが一般的である。しかし、現在の診断学ではUCともCDとも診断できない腸炎、いわゆるindeterminate colitisが疫学上5~23%に存在すると言われている^{38)~40)}。CDとUCでは根本的な治療方針が異なるため、確定診断を行った上で管理していくことが重要であるが、indeterminate colitisではそれが不可能である。今回の我々の実験結果は、一見正常で非炎症部位であ

る回腸や虫垂開口部のchemokinesやMMPsの発現を解析すれば、UCとCDの鑑別が可能となることを示唆するものである。

本研究では、IBD患者におけるchemokines, MMPsの発現を免疫組織化学とRT-PCRを用いて検討したが、IBDの炎症発現にFKN, MCP-1, マクロファージ関連MMPsが関与し、非炎症状態の維持にはPTRが重要な役割を担っている可能性が示された。さらに、局所でのchemokinesやMMPsの蛋白やmRNAの動態を解明することで、鑑別診断困難例の確定診断など臨床的な応用が期待できる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました川崎医科大学内科学(食道・胃腸)教室 春間賢教授ならびに九州大学大学院病態機能内科学教室 飯田三雄教授に深謝いたします。また、御校閲頂きました川崎医科大学内科学(食道・胃腸)教室 古賀秀樹講師および本研究に御協力頂きました川崎医科大学分子生物学教室 西松伸一郎講師ならびに川崎医科大学内科学(食道・胃腸)教室の諸兄に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第86回日本消化器病学会総会(2003年4月、埼玉)、12th United European Gastroenterology Week(2004年9月、Prague)、第12回日本消化器関連学会週間(2004年10月、福岡)で発表した。

文 献

- 1) Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640-644, 1997
- 2) Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RO, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes HG, Feng L: NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1 beta, TNF-alpha, and LPS. *J Leukoc Biol* 67: 577-584, 2000
- 3) Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordin S, Yla-Herttualla S: Linked chromosome 16 q 13, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 923-929, 2001
- 4) Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, Yamada N, Kawamura T, Fitzhugh DJ, Saraf MA, Schall T, Blauvelt A, Rosen SD, Hwang ST: Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 29: 2551-2559, 1999

- 5) Muehloefler A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC : Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocyte in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 164 : 3368–3376, 2000
- 6) Cross AK, Woodroffe MN : Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro. *Glia* 28 : 183–189, 1999
- 7) Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O : Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91 : 521–530, 1997
- 8) Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A, Okazaki T, Imai H, Yoshie O, Bloom ET, Domae N, Umehara H : Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* 164 : 4055–4062, 2000
- 9) Chakravorty SJ, Cockwell P, Girdlestone J, Brooks CJ, Savage CO : Fractalkine expression on human renal tubular epithelial cells : potential role in mononuclear cell adhesion. *Clin Exp Immunol* 129 : 150–159, 2002
- 10) Schafer A, Schulz C, Eigenthaler M, Fraccarollo D, Kobsar A, Gawaz M, Ertl G, Walter U, Bauersachs J : Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood* 103 : 407–412, 2004
- 11) Efsen E, Grappone C, DeFranco RMS, Milani S, Romanelli RG, Bonacchi A, Caligiuri A, Failli P, Annunziato F, Pagliari G, Pinzani M, Laffi G, Gentilini P, Marra F : Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans. *J Hepatol* 37 : 39–47, 2002
- 12) Ito Y, Kawauchi H, Morioka Y, Nakatsue T, Koike H, Ikezumi Y, Oyanagi A, Natori Y, Nakamura T, Gejyo F, Shimizu F : Fractalkine expression and the recruitment of CX3CR1+ cells in the prolonged mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 61 : 2044–2057, 2002
- 13) Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW : CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory disease of the nervous system. *J Neuroimmunol* 137 : 210–217, 2003
- 14) Matrisian LM, McDonnell S, Miller DB, Navre M, Sefror EA, Hendrix MJ : The role of the matrix metalloproteinase stromelysin in the progression of squamous cell carcinomas. *Am J Med Sci* 302 : 157–162, 1991
- 15) Matsuyama Y, Takao S, Aikou T : Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 80 : 105–110, 2002
- 16) Ishiguro N, Ito T, Miyazaki K, Iwata H : Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26 : 34–40, 1999
- 17) Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U : Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am J Pathol* 152 : 1005–1014, 1998
- 18) Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS : Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 117 : 814–822, 1999
- 19) Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL : Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 47 : 57–62, 2000
- 20) Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S : Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 47 : 63–73, 2000
- 21) Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K : Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 22 : 773–778, 2003
- 22) Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, Hizawa K, Fujishima M : An animal model of longitudinal ulcers in the small intestine induced by intracolonic administration of indomethacin in rats. *Gastroenterol Jpn* 28 : 10–17, 1993
- 23) Koga H, Aoyagi K, Matsumoto T, Iida M, Fujishima M : Experimental enteropathy in athymic and euthymic rats : synergistic role of lipopolysaccharide and indomethacin. *Am J Physiol* 276 : G576–G582, 1999

- 24) 垂水研一：実験的小腸縦走潰瘍におけるマクロファージと催炎症性サイトカインの役割—マクロファージ除去ラットを用いた検討。川崎医学会誌 28：243-256, 2002
- 25) 松本啓志：インドメタシン誘発ラット小腸潰瘍モデルにおけるマクロファージ関連 matrix metalloproteinases (MMPs) の役割。川崎医学会誌 29：177-188, 2003
- 26) Maquat LE, Carmichael GG：Quality control of mRNA function. *Cell* 104：173-176, 2001
- 27) Mendell JT, Dietz HC：When the message goes awry：disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* 107：411-414, 2001
- 28) Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolini A：Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 195：356-372, 2003
- 29) Shaw G, Kamen R：A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46：659-667, 1986
- 30) Huwiler A, Akool el-S, Aschrefi A, Hamada FM, Pfeilschifter J, Eberhardt W：ATP potentiates interleukin-1 β -induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of ELAV protein HuR. *J Biol Chem* 278：51758-51769, 2003
- 31) Eberhardt W, Akool ES, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, Hamada FM, Pfeilschifter J：Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferators-activated receptor α agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *J Biol Chem* 277：33518-33528, 2002
- 32) Akool el-S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W：Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 23：4901-4916, 2003
- 33) Dean JL, Sully G, Clark AR, Saklatvala J：The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilization. *Cell Signal* 16：1113-1121, 2004
- 34) Waetzig GH, Seeger D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S：p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- α signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 168：5342-5351, 2002
- 35) Poon M, Liu B, Taubman MB：Identification of a novel dexamethasone-sensitive RNA-destabilizing region on rat monocyte chemoattractant protein 1 mRNA. *Mol Cell Biol* 19：6471-6478, 1999
- 36) Hamilton SR, Morson BC：Crohn's disease. Part 1. Pathology. In Haubrich WS, Schaffner F, Beak JE, eds：Bockus Gastroenterology. 5th ed, Philadelphia, Saunders. 1995, pp 1398-1409
- 37) Matsumoto T, Nakamura S, Shimizu M, Iida M：Significance of appendiceal involvement in patients with ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 55：180-185, 2002
- 38) Hildebrand H, Fredrickzon B, Homlquist L, Kristiansson B, Lindquist B：Chronic inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 13：293-297, 1991
- 39) Moum B, Ekbohm A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, Schulz T, Stray N, Fausa O：Inflammatory bowel disease：re-evaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south-eastern Norway. *Gut* 40：328-332, 1997
- 40) Joossens S, Reinisch W, Vermeire S, Sendid B, Poulain D, Peeters M, Geboes K, Bossuyt X, Vandewalle P, Oberhuber G, Vogelsang H, Rutgeerts P, Colombel JF：The value of serologic markers in indeterminate colitis：a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 122：1242-1247, 2002