

ラット腸上皮細胞における ケモカインの産生と酪酸および薬物による影響

川端一史 大野恭裕

近畿大学医学部第2内科学教室

抄 録

特発性炎症性腸疾患 (Idiopathic inflammatory bowel disease: IBD) において腸上皮細胞は障害の標的となるだけでなく、自ら炎症に参加して諸因子を産生し、IBDの病因やその臨床症状にも関与することが推測される。大腸上皮細胞においては種々のサイトカイン産生が報告されているが、小腸上皮細胞におけるサイトカイン産生に関する報告は少ない。この研究ではラット非癌小腸上皮細胞株である IEC-6 細胞を用い、C-X-C ケモカインである Gro- α および C-C ケモカインである monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) の産生について検討した。IEC-6 細胞は、IL-1 β 刺激により Gro- α を、IL-1 β および TNF- α 刺激により MCP-1 を産生し、酪酸は、IEC-6 細胞の IL-1 β 刺激による Gro- α の産生を増強し、一方、MCP-1 の産生は抑制した。IL-1 β 刺激 Gro- α の産生は、5-aminosalicylic acid (5-ASA) により増強し、IL-1 β 刺激 MCP-1 の産生は、5-ASA と sulfasalazine により増強した。dexamethasone は有意に IL-1 β 刺激 Gro- α および MCP-1 産生を抑制し、一方、cyclosporin A は影響を与えなかった。小腸上皮細胞は、Gro- α および MCP-1 を産生し、腸管における免疫反応に関与すると考えられ、また、小腸上皮細胞における C-X-C ケモカインと C-C ケモカインの産生調節機構は異なる可能性が示唆された。

Key words: chemokine, IEC-6, Gro- α , MCP-1, butyrate

緒 言

腸上皮細胞は、絶えず上皮細胞の腸管腔側において、栄養物、細菌、細菌産物を含む腸内腔因子に暴露されている。また、上皮細胞は、基底膜側において、ホルモンや単球やリンパ球などによって分泌されるサイトカインなど種々の因子とともに粘膜固有層の単核球の影響を受ける環境にある。腸上皮細胞の主な役割は栄養の吸収である。一方、腸上皮細胞は、腸内腔の感染物質、トキシン、抗原に対して宿主のための防御バリアーとしても作用する^{1,2}。

特発性炎症性腸疾患 (Idiopathic inflammatory bowel disease: IBD) と総称されるクローン病と潰瘍性大腸炎 (UC) の病因は未だ不明であるが、その病因、病態は免疫異常を背景とし、慢性の炎症に起因する組織傷害をきたす疾患である。IBD 腸管粘膜においては、多核白血球、マクロファージおよびリンパ球や形質細胞の浸潤が認められ、IL-1 β , IL-6,

IL-8 などの血中や大腸生検粘膜中での濃度の増加が報告されている^{3,4}。IBD において腸上皮細胞は障害の標的となるだけでなく、種々の成長因子やサイトカインを産生し、それによって自ら炎症の発症や維持に重要な役割を果たすと考えられる。また、活性化されたマクロファージやリンパ球、血管内皮、線維芽細胞、好中球などからは、種々のサイトカインが産生されることが報告されている。特に、走化性サイトカイン、chemotactic cytokine (ケモカイン) は、白血球やリンパ球の遊走作用を有し、炎症局所への細胞浸潤誘導において重要なサイトカインと考えられる⁵。

ケモカインは、アミノ酸の配列により C-X-C, C-C, C-X₃-C, C の 4 つのサブファミリーに分類される⁶。C-X-C サブファミリーは、IL-8, Gro- α , β , γ , neutrophil activating peptide (NAP)-2 などがあり、好中球の走化および活性化因子として働き、また、T リンパ球や好塩基球遊走活性を持っている

る。C-Cサブファミリーは, monocyte chemoattractant protein (MCP), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) などがあり, 主としてマクロファージ, 単球の活性化や走化能を有する。

IBDにおいては, 大腸だけでなく, 小腸においても炎症は生じており, 大腸上皮細胞においては種々のサイトカイン産生が報告されているが, 小腸上皮細胞におけるサイトカイン産生に関する報告は少ない。われわれは, ラット非癌小腸上皮細胞株である IEC-6 細胞⁷ を用い, C-X-C ケモカインである Gro- α および C-C ケモカインである MCP-1 の小腸上皮細胞における産生について検討した。また, short chain fatty acid (SCFA) は, carbohydrate の bacterial fermentation の産生物であり^{8,9,10}, SCFA の一つである酪酸 (butyrate)⁹ は, 大腸粘膜に対して主要な栄養物として重要な役割を演じているが, UC においては糞便中の butyrate が活動期に減少しており¹¹, distal UC^{12,13} や diversion colitis¹⁴ 患者において SCFA の直腸への注入により, 腸上皮細胞の治療を促進し, 症状を改善することが報告されている。そこで, 小腸上皮細胞における Gro- α および MCP-1 の産生に対する butyrate の影響についても検討した。さらに, IBD 治療に用いられる薬剤である sulfasalazine, その構成物である sulfapyridine と 5-aminosalicylic acid (5-ASA), cyclosporin A および dexamethasone の Gro- α および MCP-1 の産生に対する影響についても検討した。

方 法

細胞培養

非癌ラット小腸上皮細胞株・IEC-6 細胞 (ATCC) を 5.0×10^4 cells/cm² として 12 穴平底マルチプレート (IWAKI, 東京) で 100,000 U/l ペニシリン・100 mg/l ストレプトマイシン合剤, ヒューマリン R, 5% 仔牛胎児血清 (Gibco, MD, USA) 含有 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) で培養し細胞が confluent 状態に増殖した後, lipopolysaccharide (LPS) (Difco, MI, USA) またはサイトカイン刺激下で 24 時間, 37°C, 5% CO₂ 条件下において培養した。

サイトカインとしては, interleukin (IL)-1 β (0.1, 1.0, 10 ng/ml), IL-2 (10, 100 U/ml), IL-4 (10, 100 U/ml), IL-6 (1.0, 10 ng/ml), IL-10 (1.0, 10 ng/ml), interferon- γ (IFN- γ) (100, 1000 IU/ml), tumor necrosis factor- α (TNF- α) (1.0, 10 ng/ml) (R&D System, Minneapolis, MN, USA) を刺激物

質として用いた。LPS は, 1.0, 10 μ g/ml で刺激した。培養 24 時間後に, 上清を回収し, ラット Gro- α と MCP-1 の測定を行った。

IEC-6 細胞を butyrate (0, 2, 3 および 5 mM) とともに 24 時間 preincubation した後, IL-1 β (1.0 ng/ml) 又は LPS (10 μ g/ml) を用いて 24 時間刺激培養し上清を回収し, Gro- α と MCP-1 の測定に供した。また, IBD 治療に用いられる薬剤である sulfasalazine とその構成物である sulfapyridine と 5-ASA (各々 1, 2, 5, 7, 10 mM), dexamethasone (Sigma) (10^{-8} , 10^{-6} M) および cyclosporin A (0.1, 1.0 μ g/ml) とともに 24 時間 preincubation した後, IL-1 β (1.0 ng/ml) による刺激培養を行い, 24 時間後に上清を回収し, Gro- α と MCP-1 産生へのこれら薬剤の影響を検討した。

IL-1 β 刺激による Gro- α と MCP-1 mRNA の発現に対する butyrate の影響を調べるために, IEC-6 細胞を 0, 2 および 5 mM butyrate とともに 24 時間 preincubation した後 IL-1 β (1.0 ng/ml) を添加し, 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後の各細胞を 0.1 M phosphate buffered saline (-) (PBS) (PH 7.4) で 2 回洗浄して細胞を回収し, Gro- α と MCP-1 mRNA の測定に供した。

Gro- α および MCP-1 の測定

培養上清中の Gro- α 及び MCP-1 を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Gro- α : Immuno Biological Laboratories, 群馬, MCP-1: BioSource International, CA, USA) を用いて duplicate で測定した。なお, これら ELISA 法により測定できる濃度下限は, Gro- α で 12.2 pg/ml, MCP-1 で 8.0 pg/ml であった。培養上清を回収後, 12 穴平底マルチプレートの各 well は, 0.1 M phosphate buffered saline (-) (PBS) (PH 7.4) で 2 回洗浄し, 0.1% sodium dodecylsulfate にて細胞を破壊し細胞蛋白量を bincinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) で測定した¹⁵。刺激物質による細胞増殖への影響を補正するために Gro- α と MCP-1 の濃度は細胞蛋白 1 μ g あたりの濃度 (/ μ g cell protein) として示した。

Gro- α および MCP-1 mRNA の発現

RNA 抽出

IEC-6 細胞を 0, 2 または 5 mM butyrate と共に IL-1 β 1.0 ng/ml で刺激した後, 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間で, 細胞を回収し PBS で洗浄し, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA, USA) を使用し, RNA ペレットを得た。

RNA は, diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解し spectrophotometer (DU® 640, Beckman, CA, USA) を用い, 260 nm での吸光度をもとに RNA 含有濃度を求めた。

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

上記の方法で抽出した RNA 1 µg を 2.5 U/µl, 1 µl の murine leukemia virus reverse transcriptase (Perkin Elmer, NJ, USA) と 2.5 µM, 1 µl の oligo d(T)¹⁶ primer (Perkin Elmer) を含有した反応液と混和し 42°C で 30 分間インキュベートし, cDNA を作成した。RT 反応により得られた cDNA 産物は 2.5 U/100 µl, 0.5 µl の Taq polymerase (Perkin Elmer) を含んだ反応液に, 1.2 µM, 1 µl の Gro- α あるいは MCP-1 の上流 (5'-) および下流 (3'-) プライマーと 0.2 µM, 1 µl の β -actin プライマーとともに混和し PCR 機 (PC-800, Astec, 福岡) により PCR 反応を行った。使用したプライマーは下記の如くである。

Gro- α	5'-AGCCGCCAAGCCACAGGGG-GG
Gro- α	3'-CGCCATCGGTGCAATCTAT-CTTC
MCP-1	5'-ATGCAGGTCTCTGTCACG-CTT
MCP-1	3'-TCTCACTTGGTTCTGGTC-CAG
β -actin	5'-TTGTAACCAACTGGGAC-GATATGG
β -actin	3'-GATCTTGATCTTCATGGT-GCTAGG

各々得られる PCR 産物は, Gro- α が 269 bp, MCP-1 が 288 bp, β -actin が 769 bp である。Gro- α の PCR 反応は, 熱変性に 95°C で 5 分間, アニーリングに 62°C で 1 分間, 伸長反応に 72°C で 1 分間を 1 サイクルとした。その後, 第 2-27 サイクルは, 95°C で 1 分間, 62°C で 1 分間, 72°C で 1 分間の PCR を施行し, 最終サイクルは伸長反応を 72°C で 4 分間として計 28 サイクル PCR を行った¹⁶。MCP-1 の PCR 反応は, 熱変性に 94°C で 15 秒間, アニーリングに 50°C で 20 秒間, 伸長反応に 72°C で 1 分間を 1 サイクルとした。これを 27 サイクル行い, 最終サイクルは熱変性に 94°C で 15 秒間, アニーリングに 50°C で 20 秒間, 伸長反応を 72°C で 7 分間として計 28 サイクル PCR を行った¹⁷⁻¹⁹。

アガロースゲル電気泳動

上記により得た RT-PCR 産物 7 µl を bromophenol blue (Sigma, MO, USA) 含有 loading buffer に混和後, 2% アガロース (ニッポンジーン) ゲル内で泳動した。同時に DNA 分子量マーカーとして 100 bp DNA ladder (Takara, 大津) を泳動し, PCR 産物の分子量を確認した。なお, 電気泳動は, ミニゲル電気泳動装置 (AE 6000) (ATTO, 東京) で TBE 緩衝液 (45 mM : Trizma base (Sigma), 45 mM : sodium borate (Sigma), 1 mM : EDTA (PH 8.0) (Sigma)) 内で 100 ボルトの電圧で 20 分間行った。電気泳動後, ゲルをエチジウムブロマイド (Sigma) で染色し, ultraviolet transilluminator にて各バンドを確認した。

統計学的処理

測定結果は, 平均 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で表した。2 群の差は, student *t* 検定を用い危険率 5% 以下を統計学的に有意とした。

成 績

IEC-6 細胞におけるサイトカイン, LPS 刺激による Gro- α および MCP-1 の産生

IEC-6 細胞において, Gro- α は, 非刺激, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, LPS, IFN- γ , TNF- α の各刺激においては産生されず, IL-1 β 刺激においてのみ産生された (図 1. A)。MCP-1 は, 非刺激, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, LPS, IFN- γ の各刺激においては産生されず, IL-1 β および TNF- α 刺激においてのみ産生された (図 1. B)。IL-1 β 刺激下の Gro- α 産生は, 濃度依存性の増加を認めた (図 2. A)。また, IL-1 β あるいは TNF- α 刺激下の MCP-1 産生は, それぞれ濃度依存性の増加を認めた (図 2. B)。なお, Gro- α および MCP-1 の測定結果は, 細胞蛋白濃度で補正しているが, IL-1 β 刺激における細胞蛋白量はコントロールと比べて抑制されなかった (データは示さず)。

IEC-6 細胞における IL-1 β , LPS 刺激による Gro- α および MCP-1 産生に対する butyrate の影響

IL-1 β あるいは LPS 刺激による Gro- α の産生に対する butyrate の影響について検討した。butyrate は IL-1 β 刺激 Gro- α の産生を濃度依存性に増強した。また, butyrate は LPS 刺激 Gro- α の産生においても, 有意ではないが増加傾向を示した (図 3. A)。バクテリアの菌体成分である LPS と butyrate という 2 つの腸管内物質によって腸上皮細胞は Gro- α を軽度産生し, 腸管内物質のみでも腸上皮細胞よりサイトカインを誘導する可能性が示唆され,

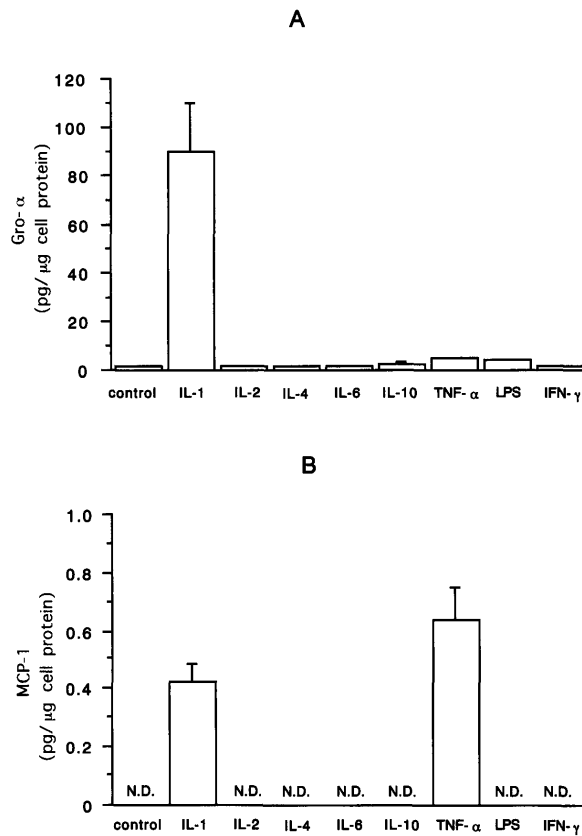


図1 IEC-6細胞における各種刺激物質による Gro- α (A) および MCP-1 (B) の産生
IL-1 β は1.0 ng/ml, IL-2 は100 U/ml, IL-4 は100 U/ml, IL-6 は10 ng/ml, IL-10 は10 U/ml, IFN- γ は1000 IU/ml, TNF- α は10 ng/ml, LPS は10 μ g/ml の刺激濃度の結果を示した。
結果はすべて mean (column) \pm SE (bars) で示した。(n=4)

butyrate は腸における炎症の一因となる可能性が考えられた。同様に, IL-1 β あるいは LPS 刺激による MCP-1 の産生に対する butyrate の影響を検討した。butyrate は IL-1 β 刺激 MCP-1 の産生を濃度依存性に抑制し 5 mM において約60%抑制したが, LPS 刺激 MCP-1 の産生には有意な影響を与えなかった(図3. B)。未刺激, IL-1 β , LPS 刺激において butyrate は, 細胞蛋白量の約50%を抑制した(データは示さず)。

IEC-6細胞における IL-1 β 刺激 Gro- α および MCP-1 産生に対する sulfasalazine, sulfapyridine, 5-ASA, dexamethasone および cyclosporin A の影響

IL-1 β 刺激における Gro- α および MCP-1 の産

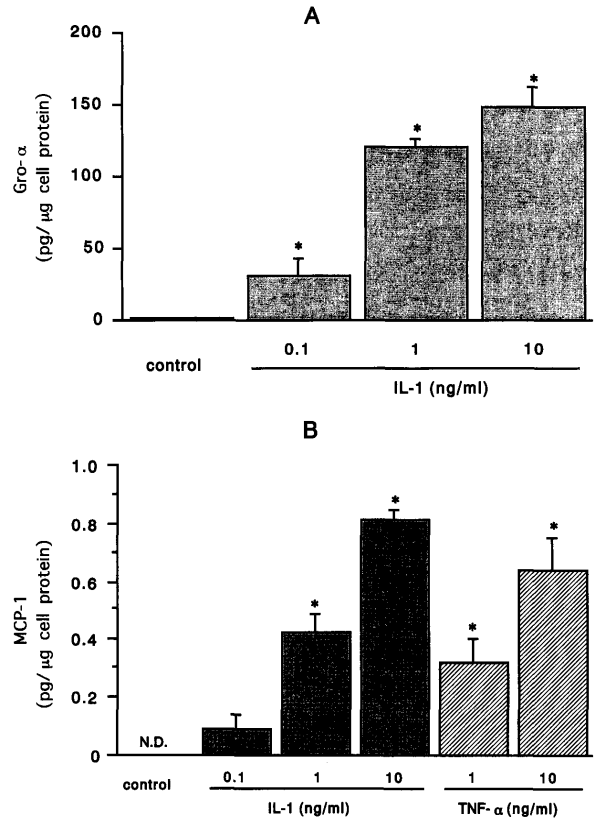


図2 IEC-6細胞における IL-1 β 刺激による Gro- α (A) および IL-1 β , TNF- α 刺激による MCP-1 (B) の産生
結果はすべて mean (column) \pm SE (bars) で示した。(n=4)
* p<0.05: control との比較

生に対する sulfasalazine, その構成物である sulfapyridine と 5-ASA, dexamethasone および cyclosporin A の各薬剤の影響を検討した。5-ASA は, 10 mM において有意に IL-1 β 刺激下の Gro- α の産生を増加させたが, sulfasalazine および sulfapyridine については, IL-1 β 刺激下の Gro- α の産生に有意な影響を認めなかった(図4. A)。dexamethasone は, 濃度依存性に IL-1 β 刺激下の Gro- α の産生を抑制し, cyclosporin A は, IL-1 β 刺激下の Gro- α の産生に影響を認めなかった(図5. A)。MCP-1 においては, 5-ASA は 5 mM において, sulfasalazine は 1, 2, 5 mM において有意に IL-1 β 刺激下の MCP-1 の産生を増加させたが, sulfapyridine は IL-1 β 刺激下の MCP-1 の産生に影響を認めなかった(図4. B)。dexamethasone は濃度依存性に IL-1 β 刺激下の MCP-1 の産生を抑制し, cyclosporin A は IL-1 β 刺激下の MCP-1 の産生に影響を認めなかった(図5. B)。5-ASA 7 mM, sulfapyridine 7 mM 刺激において IL-1 β 刺激における細胞蛋白量は増加し, sulfasalazine 10 mM 刺

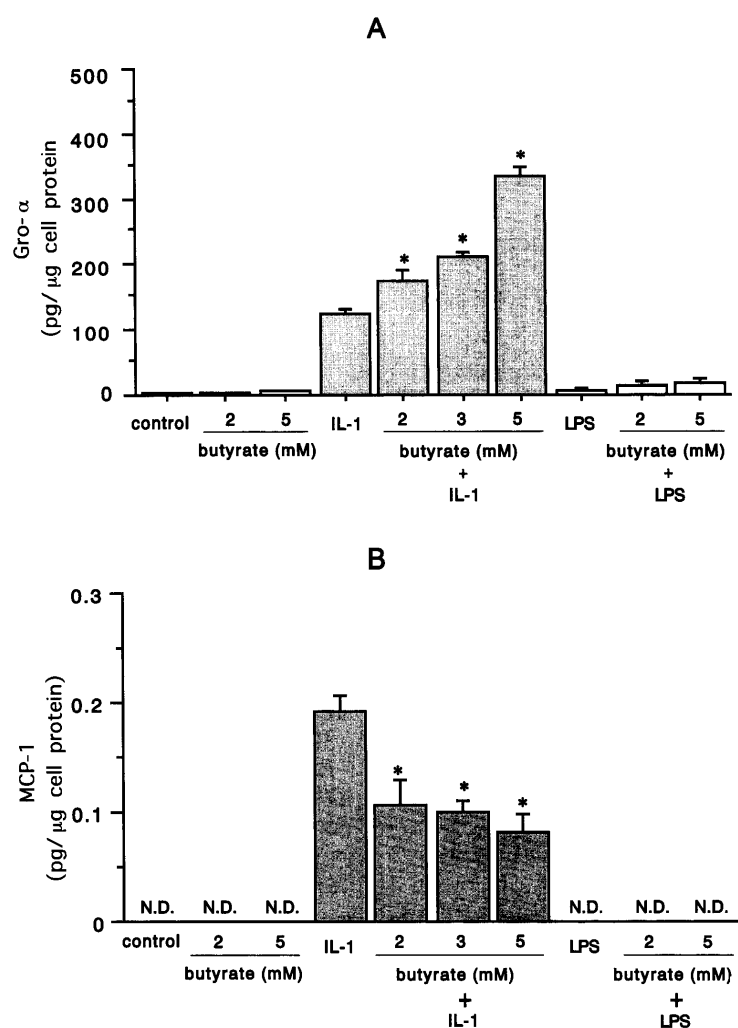


図3 IEC-6細胞におけるIL-1 β , LPS刺激によるGro- α (A) およびMCP-1 (B) の産生に対するbutyrateの影響
結果はすべてmean (column) \pm SE (bars) で示した. (n=4)
* p<0.05: IL-1 β 刺激との比較

激において細胞蛋白量を抑制し, dexamethasone および cyclosporin A は, 細胞蛋白量に有意な影響を与えなかった (データは示さず).

IEC-6細胞におけるIL-1 β 刺激Gro- α およびMCP-1 mRNA発現に対するbutyrateの影響

IL-1 β 刺激後, 1時間から24時間までbutyrateによるGro- α およびMCP-1のmRNA発現の変化を検討した. 結果は β -actinとGro- α あるいはMCP-1 mRNAの比として比較検討したところ, IL-1 β 刺激後のGro- α mRNA発現はbutyrateにより6時間で明瞭に増強され, MCP-1 mRNA発現は6時間後に抑制を認めた. IL-1 β 刺激後, 6時間におけるGro- α およびMCP-1のmRNA発現を図6に示すが, IL-1 β 刺激mRNA発現は, Gro- α においては, 未刺激においても軽度発現を認め, butyrateによりmRNA発現は増強し, MCP-1においては, butyrateによりmRNA発現は抑制された.

考 察

IBDにおいて, 潰瘍性大腸炎の活動期にはリンパ球, 形質細胞, マクロファージが浸潤²⁰, さらに炎症が著明なところには好中球や好酸球が浸潤しており, 所々に腺窩上皮を破壊している腺窩膿瘍がみられ, acute on chronicの像を呈してくる²¹. また, 末梢血液中および腸粘膜局所におけるリンパ球, 単球などの活性化²²が知られており, 炎症粘膜には単核球, 多核白血球の浸潤が認められ, IL-1 β , IL-6, IL-8などの血中や大腸生検粘膜中の濃度は増加していることが報告され^{3,4}, サイトカイン産生異常がIBDの病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている²³. 炎症局所への細胞浸潤は, 内因性の走化因子として走化性サイトカイン (ケモカイン) の関与が推測される.

ケモカインであるGro- α は, 好中球に対する走化能や活性化能, またメラノーマ細胞に対する増殖作用を有しており, マクロファージ, 好中球, リン

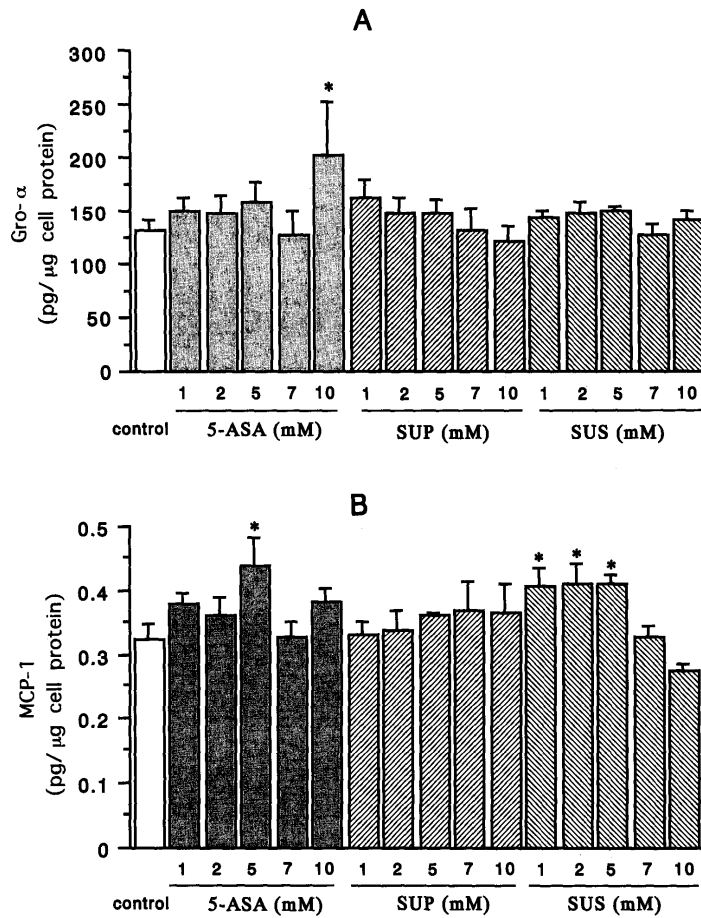


図4 IEC-6細胞におけるIL-1 β 刺激によるGro- α (A)およびMCP-1 (B)の産生に対するsulfasalazine (SUS), sulfapyridine (SUP), 5-aminosalicylic acid (5-ASA)の影響
結果はすべてmean (column) \pm SE (bars) で示した. (n=4)
* p<0.05: control (IL-1 β 刺激) との比較

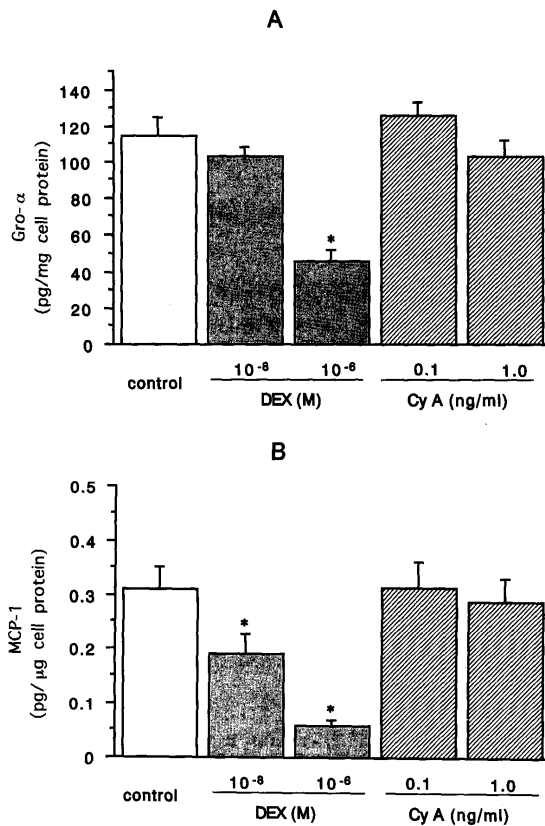


図5 IEC-6細胞におけるIL-1 β 刺激によるGro- α (A)およびMCP-1 (B)の産生に対するdexamethasone (DEX), cyclosporin A (Cs A)の影響
結果はすべてmean (column) \pm SE (bars) で示した. (n=4)
* p<0.05: control (IL-1 β 刺激) との比較

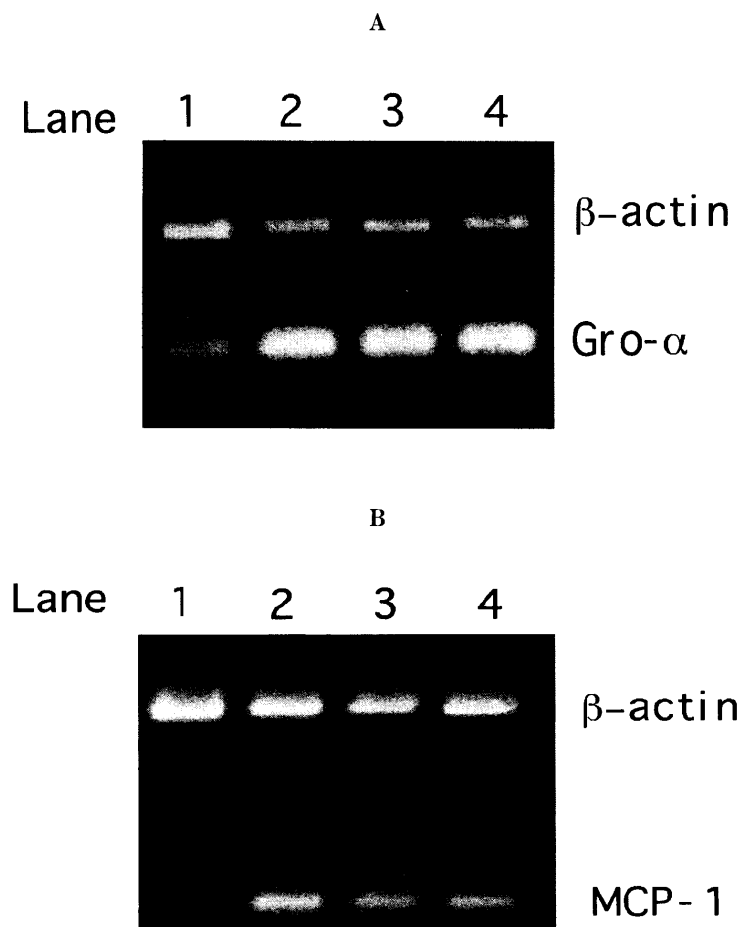


図 6

IEC-6 細胞における IL-1 β 刺激 Gro- α (A) および MCP-1 (B) mRNA 発現に対する butyrate の影響

IL-1 β 刺激後, 6 時間における mRNA 発現を示した (Lane 2 ~4).

Lane 1; 非刺激, Lane 2; butyrate 0 mM, Lane 3; butyrate 2 mM, Lane 4; butyrate 5 mM

パ球, 線維芽細胞, 血管内皮細胞などから産生される。一方, MCP-1 は, 単球, 活性化型 T 細胞の走化・活性化因子であり, 好塩基球のヒスタミンの遊離を誘導し, 単球, マクロファージ, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, 腎メサンギウム細胞, 肺胞上皮細胞などから産生される²⁴⁻²⁸。

本研究で明らかにされたこととして, IL-1 β 刺激により Gro- α の産生を認め, IL-1 β および TNF- α 刺激により MCP-1 の産生を認めた。IL-1 β や TNF- α は, 主として単球より産生されるので, 単球/マクロファージの活性化あるいは monokine 産生が腸上皮細胞による Gro- α や MCP-1 の産生に重要であることを示すものである。ヒトの IBD において大腸粘膜におけるサイトカイン産生が報告されているが, 小腸細胞によるケモカイン産生の報告はほとんどなく, われわれの得た成績は IBD においては小腸上皮細胞も免疫反応に関与する可能性があることを示した点で興味深い。小腸上皮細胞は, TNF- α 刺激により Gro- α の産生は認めなかったが, MCP-1 の産生は認めた。このケモカイン産生の差異については, 1) C-C, C-X-C ケモカインの情報伝

達系の差異^{29,30}, 2) 核内転写因子の違い, 3) C-C, C-X-C ケモカイン遺伝子は異なる遺伝子座に存在する³¹ ので, TNF- α 刺激が chromosome に影響した, などが考えられる。

short-chain fatty acid (SCFA) は, undigested dietary starch や fiber polysaccharide の fermentation product であり, ヒト^{32,33} やラット³⁴ の粘膜の細胞増殖を刺激し, blood flow を増強し, 大腸においてエネルギーを供給する^{35,36}。SCFA の一つである butyrate は, bacterial product であり, 上皮細胞に対して主要な栄養物として重要であり, distal UC^{12,13} や diversion colitis¹⁴ 患者において butyrate や SCFA の直腸への注入より, 上皮細胞の治癒を促進し, 症状を改善することが報告されている。しかしながら, in vitro においては, 細胞の分化を誘導したり³⁷, 細胞の増殖を抑制するという報告が多く, また, アポトーシスを誘導したり³⁸, 潰瘍性大腸炎において butyrate の代謝が傷害されている^{39,40} という報告がある。そこで, 今回 Gro- α および MCP-1 の産生に対する butyrate の影響について検討したが, butyrate は IL-1 β 刺激下で MCP-1 の産生を抑制

し、Gro- α の産生を増強した。Gro- α は C-X-C サブファミリーに、MCP-1 は C-C サブファミリーに属するが、butyrate は C-X-C サブファミリーと C-C サブファミリーに対して逆の作用を示した。このことと butyrate が IBD を改善するとの報告とを考えると、腸上皮細胞において butyrate による Gro- α の産生増強効果より MCP-1 の産生抑制効果の方が有効に働く、腸上皮細胞をとりまく粘膜固有層単核球を含めた周囲への炎症反応を抑える、あるいは in vivo では自律神経系や消化管ホルモンを介した作用などの可能性が考えられる³⁷。われわれは、butyrate がヒト大腸上皮細胞においても C-X-C サブファミリーに属する IL-8 の産生を増強し、C-C サブファミリーに属する RANTES の産生を抑制することを報告しており³⁰、本研究の結果と併せると、butyrate は大腸および小腸において C-X-C サブファミリーと C-C サブファミリーに対し異なる産生調節作用を示す可能性が示唆された。

IBD 治療に用いられる薬剤である sulfasalazine、その構成物である sulfapyridine と 5-ASA の IL-1 β 刺激における Gro- α および MCP-1 の産生に対する butyrate の影響についても検討した。IL-1 β 刺激 Gro- α の産生は、5-ASA により増強し、sulfasalazine および sulfapyridine は影響を認めず、IL-1 β 刺激下で MCP-1 の産生は、5-ASA と sulfasalazine により増強し、sulfapyridine では影響を認めなかった。IBD において、in vivo においては、sulfasalazine あるいは 5-ASA は臨床的に効果を認めており⁴¹、ラット TNB 大腸炎モデルにおいても 5-ASA 投与により腸粘膜の炎症の広がりや重症度を減少させ、active UC 患者からの大腸粘膜培養における組織中および medium 中の IL-1 産生の検討においても、5-ASA と sulfasalazine は大腸粘膜組織中の IL-1 を減少させたと報告している⁴²。dexamethasone と cyclosporin A の小腸上皮細胞の IL-1 β 刺激下の Gro- α および MCP-1 産生への影響については、dexamethasone は有意に IL-1 β 刺激下の Gro- α および MCP-1 産生を抑制し、cyclosporin A は IL-1 β 刺激下の Gro- α および MCP-1 産生に影響を与えなかった。本研究の in vitro の実験においては、5-ASA および sulfasalazine は、腸上皮細胞による IL-1 β 刺激下で Gro- α や MCP-1 の産生を抑制せず、cyclosporin A は Gro- α および MCP-1 産生に影響を与えなかったが、IBD の炎症粘膜マクロファージは、5-ASA の投与により抑制された報告⁴³ や cyclosporin A は主として T 細胞に作用する免疫抑制剤であることから考え、5-ASA や sulfasalazine あるいは cyclosporin

A は腸上皮細胞に対しては Gro- α や MCP-1 の産生に影響を与えず、腸粘膜内のマクロファージやリンパ球に影響を与え、サイトカインの産生に効果がある。または、長期にわたる腸上皮細胞への暴露が影響をあたえるのではないかと考えられる。

ヒトの IBD において大腸粘膜におけるサイトカイン産生が報告されているが、小腸細胞によるケモカイン産生の報告はほとんどない。小腸上皮細胞 (IEC-6 細胞) は、C-X-C サブファミリーである Gro- α および C-C サブファミリーである MCP-1 を産生し、好中球やマクロファージの粘膜への集積を起こしうる可能性があり、IBD において標的となるだけでなく、粘膜固有層単核球、luminal factor を含む腸管炎症ネットワークの構成細胞でケモカイン産生の場となり、ケモカイン産生に腸上皮細胞が重要であり、腸管における免疫反応に関与すると考えられた。また、TNF- α 刺激により Gro- α は産生されず、MCP-1 が産生され、小腸上皮細胞における C-X-C ケモカインと C-C ケモカインの産生調節機構が異なる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った青木矩彦教授に深甚なる謝意を捧げるとともに御協力いただいた第 2 内科各位に深く謝意を表します。

なお本論文の一部は、第 25 回日本臨床免疫学会 (平成 9 年 9 月 18 日、東京)、第 39 回日本消化器病学会大会 (平成 9 年 10 月 31 日、福岡)、第 71 回日本内分泌学会総会 (平成 10 年 6 月 4 日、福岡) において発表した。

文 献

1. Sanderson IR, Walker WA (1994) Mucosal barrier. In: Ogra PL, Lamm ME, Stober W, McGhee JR, Bienenstoch J (eds): Handbook of Mucosal Immunology. Academic Press, New York, pp 41-48
2. Stadnyk AW (1994) Cytokine production by epithelial cells. FASEB J 8: 1041-1047
3. Issacs KL, Sartor RB, Haskill S (1992) Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. Gastroenterology 103: 1578-1595
4. Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB (1992) Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 37: 818-826
5. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene intercrine cytokine family. Annu Rev Immunol 9: 617-648
6. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 15: 675-

- 705
7. Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine: characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80: 248-265
 8. Cummings JH, MacFarlane GT (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70: 443-459
 9. Cumming JH (1981) Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22: 763-769
 10. Royall D, Wolever BM, Jeejeebhoy KN (1990) Clinical significance of colonic fermentation. *Am J Gastroenterol* 85: 1307-1312
 11. 中村正樹 (1989) 潰瘍性大腸炎の病勢としての糞便中乳酸: 完全静脈栄養法の有用性判定に対する応用. *日消病会誌* 86: 1627-1637
 12. Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli G-M, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H (1992) Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103: 51-56
 13. Senagore A J, MacKeigan J M, Scheider M, Ebrum J S (1992) Short-chain fatty acid enemas: A cost effective alternative in the treatment of nonspecific proctosigmoiditis. *Dis Colon Rectum* 35: 923-927
 14. Harig J M, Soergel K H, Komorowski R A, Wood C M (1989) Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med* 320: 23-28
 15. Lowry OL, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
 16. Huang S, Paulauskis JP, Kobzik L (1992) Rat KC cDNA cloning and mRNA expression in lung macrophages and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 922-929
 17. Yoshimura T, Takeya M, Takahashi K (1991) Molecular cloning of monocyte chemoattractant protein-1 and its expression in spleen cells and tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 504-509
 18. Russell ME, Adams DH, Wyner LR, Yamashita Y, Halnon NJ, Karnovsky MJ (1993) Early and persistent induction of monocyte chemoattractant protein 1 in rat cardiac allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6086-6090
 19. Natori Y, Sekiguchi M, Ou Z, Natori Y (1997) Gene expression of CC chemokines in experimental crescentic glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 109: 143-148
 20. Kobayashi K, Asakura H, Hamada Y, Hibi T, Watanabe M, Yoshida T, Watanabe N, Miura S, Aiso S, Tsuchiya M (1998) T lymphocyte subpopulations and immunoglobulin-containing cells in the colonic mucosa of ulcerative colitis: a morphometric and immunohistochemical study. *J Clin Lab Immunol* 25: 63-68
 21. 朝倉 均, 船越和博, 杉村一仁, 笹川哲也 (1993) 潰瘍性大腸炎の成因と治療. *日内会誌* 82: 656-662
 22. Sasakawa T, Takizawa H, Bannai H, Narisawa R, Asakura H (1995) Activated CD4+ and CD8+ cells in the colonic mucosa of ulcerative colitis patients: their relationship to HLA-DR antigen expression on the colonic epithelium and serum soluble CD25 levels. *Digestion* 56: 516-522
 23. 村田有志, 金澤 洋 (1996) サイトカインの炎症性腸疾患における役割. *医のあゆみ* 178: 588-593
 24. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ (1989) Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 169: 1449-1459
 25. Yoshimura T, Leonard EJ (1990) Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE. *J Immunol* 144: 2377-2383
 26. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae COC, Matsushima K (1990) Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 144: 3034-3038
 27. Rovin BH, Yoshimura T, Tan L (1992) Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol* 148: 2148-2153
 28. Paine R, Rolfe MW, Standiford TJ, Standiford TJ, Burdick MD, Rollins BJ, Strieter RM (1993) MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J Immunol* 150: 4561-4570
 29. Liebler JM, Kunkel SL, Burdick MD, Standiford TJ, Rolfe MW, Strieter RM (1994) Production of IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes: disparate responses to phytohemagglutinin and lipopolysaccharide. *J Immunol* 152: 241-249
 30. 大野恭裕, 森村正嗣, 藤本美香, 川端一史, 西村明芳, 岸谷 譲, 雑賀豊彦, 丸山宜之, 青木矩彦 (1996) 大腸上皮細胞による interleukin-8 (IL-8) 及び RANTES 産生. *消と免疫* 33: 86-91
 31. Ohno Y, Lee J, Fusunyan RD, Macdermott RP, Sanderson IR (1997) Macrophage inflammatory protein-2: Chromosomal regulation in rat small intestine epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10279-10284
 32. Scheppach W, Bartram P, Richter A, Richter F, Liepold H, Dusel G, Hofstetter G, Ruthlein J, Kasper H (1992) Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *J Parenter Enteral Nutr* 16: 43-48
 33. Frankel W, Lew J, Su B, Bain A, Klurfeld D, Einhorn E, MacDermott RP, Rombeau J (1994) Butyrate increases colonocyte protein synthesis in ulcerative colitis. *J Surg Res* 57: 210-214
 34. Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL (1989) Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *J Parenter Enteral Nutr* 13: 109-116
 35. Roediger WEW (1982) Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83: 424-429
 36. Roediger WEW (1980) Role of anaerobic bacteria in

- the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21 : 793-798
37. Frankel WF, Zhang W, Singh A, Klurfeld DM, Don S, Sakata T, Modlin I, Rombeau JL (1994) Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 106 : 75-380
38. Hague A, Elder DJE, Hicks D, Paraskeva C (1995) Apoptosis in colorectal tumour cells: Induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxcholate. *Int J Cancer* 60 : 400-406
39. Clausen MR, Mortensen PB (1995) Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut* 37 : 684-689
40. Chapman MAS, Grahn MF, Boyle MA, Hutton M, Rogers J, Williams NS (1994) Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut* 35 : 73-76
41. Munakata A, Yoshida Y, Muto T, Tsuchiya S, Fukushima T, Hiwatashi N, Kobayashi K, Kitano A, Shimoyama T, Inoue M, Makiyama K, Nakajima M (1995) Double comparative study of sulfasalazine and controlled-release mesalazine tablets in treatment of active ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 30 : 108-111
42. Rachmilewitz D, Karmeli F, Schwartz L, Simon PL (1992) Effect of aminophenols (5-ASA and 4-ASA) on colonic interleukin-1 generation. *Gut* 33 : 929-932
43. Grimm MG, Elsbury SKO, Pavli P, Doe WF (1996) Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 38 : 90-98