1. 消化管粘膜再生における IL-13 作用の重要性

川 島 麗 土 肥 多恵子

国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部

Critical Roles of IL-13 Effects in Regeneration from Small Intestinal Injury

Rei KAWASHIMA and Taeko DOHI

*Department of Gastroenterology, Research Institute, International Medical Center
of Japan, Tokyo, Japan*

Summary

Background: Signaling by IL-4 and IL-13 is transduced via a receptor complex of IL-13R α 1 and IL-4R α chains. However, contribution of a putative decoy receptor of IL-13, IL-13R α 2, is not clear. The aim of this study was to determine the significance of Th2-type cytokines in the gastrointestinal (GI) epithelial cell repair system. **Methods:** We compared the tissue recovery in wild type (WT) and IL-4 receptor a deficient (IL-4R KO) mice following mucosal damage induced by 3 Gy-whole body γ -irradiation. The expression of IL-4, IL-13 and related molecules in the regenerative process were assessed. **Results:** Expression of IL-13R α 2 dramatically increased in myofibroblasts and fibroblasts on day 3. In contrast, in IL-4R KO mice, intestinal tissue repair after irradiation was delayed, and the transient upregulation of IL-13R α 2 was not seen. Injection of a soluble IL-13R α 2-immunoglobulin chimeric protein to both of WT and IL-4R KO mice resulted in the improvement of tissue recovery. Addition of IL-13 into primary tissue culture of the jejunum induced epithelial cell damage with decreased expression of membrane bound β -catenin. **Conclusions:** Our study demonstrated that IL-13 has a potential to induce epithelial cell damage, and IL-13R α 2 functions as a regulatory factor in the regeneration of intestinal epithelial cells.

はじめに

近年発症率が増加傾向にある炎症性腸疾患は、クローン病、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) の2つを指し、いずれも若年に発症する慢性の消化管炎症であり、いまだ原因は不明である。炎症性腸疾患が粘膜免疫の破綻を伴っていることは、局所でのサイトカインレベルの異常や活性化 T 細胞の存在から示されている。クローン病の場合、局所での IL-12, IFN- γ 発現の上昇が見られることから、T ヘルパー 1 (Th1) 型優位の異常な免疫応答がその病態を形作っていると考えられる¹⁾。最近になってクローン病においては IL-17 と IL-23 が中心的役割を果たしていると報告されている²⁻⁴⁾。一方 UC では、局所の CD4⁺ 細胞の産生する IL-13 が病態に関与している Th2 型優位の炎症であ

る⁵⁾。IL-13 というサイトカインがどのようなメカニズムで組織傷害をもたらすのか、まだすべて解明されていないが、IL-13 などのサイトカインとその作用機転をターゲットとした治療法は、炎症性腸疾患の粘膜治癒において有用性が高いと考えられる。本稿では、放射線照射による上皮細胞傷害の修復過程における Th2 型サイトカインとその受容体の役割について、我々の最近の知見を紹介する。

インターロイキン (IL)-13

Th2 型サイトカインである IL-13 は、IL-4 と多くの生理的機能を共有し、気管支喘息などアレルギー疾患の発症因子として注目されてきた。IL-13 は、IL-4 と同様、Th2 細胞や肥満細胞、NK、NKT 細胞より産生され、標的細胞に存在する受容体に結合し、細胞内の

図 1 IL-4, IL-13 受容体

シグナル伝達分子を介してさまざまな生物活性を誘導する。炎症やアレルギー疾患における tissue remodeling において、上皮細胞の増殖抑制、線維化、ムチン産生の促進など中心的な役割を果たしている⁶⁾。

IL-4 シグナルを伝達する受容体は、現在までに 2 種類が知られており、IL-4 レセプター α 鎖 (IL-4R α) と共通 γ 鎖 (common γ) よりなる 1 型受容体と、IL-4R α と IL-13 レセプター $\alpha 1$ 鎖 (IL-13R $\alpha 1$) よりなる 2 型受容体とがあるが、この 2 型受容体は IL-13 レセプターとしてシグナルを伝達する⁷⁾。さらに、IL-13 と結合するもう一つのレセプターである IL-13 レセプター $\alpha 2$ 鎖 (IL-13R $\alpha 2$) は、IL-13R $\alpha 1$ の数百倍もの高い親和性を持って IL-13 と結合するものの、シグナル伝達ドメインが短いため、主な機能は IL-13 のデコイ受容体であると考えられてきたが⁸⁻¹⁰⁾。最近になってシグナル伝達の可能性も報告されている (図 1)¹¹⁾。

消化管と Th2 型サイトカイン

IL-4, IL-13 発現は、消化管の寄生虫排除に必須であるだけでなく^{12,13)}、同時に粘液産生細胞の増加など病理学的変化をも引き起こす。われわれは、消化管炎症時に産生されるサイトカインにのよって、異なる病理学的変化が現れることを指摘してきた。例えば、マウスハプテン誘導大腸炎モデルにおいて、IL-4 のような Th2 型サイトカインを過剰に存在させると、上皮の萎縮・線維化が起こるが^{14,15)}、Th1 型のサイトカインが優位な状態では局所的な潰瘍性病変を特徴とする¹⁶⁾。このことは、全層性潰瘍を特徴とするクローン病で Th1 優位な応答を示し、粘膜固有層に局限した瀰漫性の粘膜の荒廃がおこる潰瘍性大腸炎で局所的に Th2 型サイトカインが検出されることとよく対比される。

図 2 IL-4R $\alpha^{-/-}$ マウスにおける上皮細胞傷害からの修復の遅れ (照射後 3 日目; H&E 染色)

また IL-4 と IL-13 を過剰に産生する T 細胞画分を T 細胞欠損マウスに移入すると、寄生虫感染の際に見られるような小腸絨毛萎縮、粘液産生細胞の増加が誘導される。一方で、IFN- γ を過剰に産生する T 細胞の移入実験では、大腸炎とともに、胃粘膜上皮のアポトーシスを伴うびらん性胃炎が見られる¹⁷⁾。そこで今回、IL-4, IL-13 などの Th2 型サイトカインが、腸管上皮修復・再生過程においてどのような役割を果たすのかを明らかにすることを目的として解析を進めた。

腸管上皮細胞再生における IL-4R 依存性

Wild Type (WT) マウスおよび IL-4 受容体 α 鎖欠損 (IL-4R $\alpha^{-/-}$) マウスに、放射線の全身照射 (3Gy) を行って小腸粘膜傷害を誘導し、その後の修復・再生過程を比較検討した。

消化管上皮細胞は約 3 日間ですべての細胞が入れ替わる盛んな細胞回転によってその構築を保っている。放射線照射を受けた WT マウス小腸において、上皮細胞分裂による組織修復が照射後 3 日目に観察されるが、IL-4R $\alpha^{-/-}$ マウスでは上皮再生が遅れ、3 日目になっても上皮細胞分裂が認められない (図 2)。5 日後においても IL-4R $\alpha^{-/-}$ マウスにおいての細胞増殖は完全ではないことから、放射線照射により傷害を受けた小腸上皮細胞の修復は、IL-4R により伝達されるシグナルに依存していることが明らかになった¹⁸⁾。

放射線照射による IL-13 産生亢進

正常な消化管上皮細胞の細胞回転の維持のためには、粘膜固有層の間質細胞や免疫担当細胞との相互作用や、それらの産生する成長因子、サイトカインなどの微小環境が適切に保たれている必要があると考えられる。そこで、放射線照射による上皮細胞傷害からの再生過程における免疫担当細胞の役割を検討するため、粘膜固有層細胞について解析を加えた。

上皮細胞の分裂が最も盛んになる照射後 3 日目の時

点で、WT マウス小腸の粘膜固有層細胞 (LPMCs) を EDTA および collagenase により分離した。放射線照射前には総数 $1.2 \times 10^6/\text{head}$ の LPMCs が得られたが、照射後には $0.2 \times 10^6/\text{head}$ と著明に減少した。この細胞群の IL-13 発現を RT-PCR により解析したところ、放射線照射前にはほとんど検出されなかった IL-13 の発現が照射後に誘導された。IL-4, IFN- γ も共に発現上昇が見られた。この現象は IL-4R $^{-/-}$ マウスにおいても同様であった。

そこで、これらのサイトカイン産生細胞を同定するため、FACS 解析を行った。照射前では CD4 $^{+}$ T 細胞, CD8 $^{+}$ T 細胞および B220 $^{+}$ 細胞はそれぞれ LPMC の 13%, 21%, 56% を占めたが、これらのリンパ球は、照射後にはほとんど消失した。一方、panNK (DX5), NKG2D (CX5) 陽性である NK 細胞は照射後残存し、それぞれ LPMCs の 72, 55% を占めた。照射後 3 日後の NK 細胞で IL-13 発現の顕著な誘導が見られた。放射線抵抗性の活性化 NK 細胞が IL-13 を産生していると考えられた。これまでに、ハプテン誘導潰瘍性大腸炎モデルにおいて、NKT 細胞から産生される IL-13 が上皮細胞傷害の原因因子である可能性を示唆する報告があるが¹⁹⁾、放射線照射後の小腸という環境下では、IL-13 は NK 細胞由来であることが明らかになった。

サイトカイン受容体の発現誘導

小腸組織のサイトカイン受容体遺伝子の発現を定量 RT-PCR により経時的に比較検討した。WT マウスにおいて、IL-4, IL-13 のシグナル伝達受容体構成分子 (IL-4R α , common γ , IL-13R α 1) の mRNA 発現に顕著な変動は見られなかった。一方、IL-13R α 2 の mRNA 発現が、組織修復にともなって一過性に上昇した。さらに我々は、IL-13R α 2 が、基底膜の線維芽細胞および筋線維芽細胞に限定して発現していることを見いだした。これに対し、組織修復に遅れが生じる IL-4R $^{-/-}$ マウスにおいては、IL-13R α 2 発現の上昇が見られないことを発見した (図 3)。WT マウスにおいては、細胞増殖因子である trefoil factor family (TFF)1, fibroblast growth factor (FGF)-7 も上皮細胞増殖に伴い発現上昇が見られた。

IL-4, IL-13 による IL-13R α 2 発現誘導

IL-13R α 2 の発現は、IL-4R 発現に依存し、IL-4R を介して伝達される IL-4, IL-13 シグナルによって誘導されることが知られていたが、われわれは、WT および IL-4R $^{-/-}$ 由来の消化管の間質細胞を用いてこれを

図 3 IL-4R $^{-/-}$ マウスにおいて IL-13R α 2 発現の上昇は見られない。A. IL-13R α 2 の免疫組織染色。B. 小腸組織のサイトカイン受容体遺伝子の発現を定量 RT-PCR により経時的に比較検討した。

検証した。すなわち、マウス小腸の初代培養により得られた線維芽細胞および筋線維芽細胞の培養液中に IL-4, IL-13 を添加すると、IL-13R α 2 発現は数倍に増加した。IL-4 と IL-13 による IL-13R α 2 発現の相加効果も見られた。一方で、IL-4R $^{-/-}$ マウスにおいては、IL-13R α 2 発現上昇は見られなかった。

IL-13 傷害作用の中和

IL-4R $^{-/-}$ マウスにおける放射線照射後の上皮修復の遅れは、IL-13 のデコイ受容体である IL-13R α 2 発現が上昇しないため、放射線照射によって誘導された IL-13 を中和しないためと解釈することができる。そこで、IL-4R $^{-/-}$ マウスに IL-13R α 2 を補うことによる、修復遅延改の改善を試みた。IL-13 の中和を目的として可溶性のキメラ蛋白 IL-13R α 2-Ig を作製し、これを IL-4R $^{-/-}$ マウスに投与したところ、組織修復が WT マウスと同程度まで改善された。IL-13R α 2-Ig 投与による上皮細胞の増殖亢進は、細胞増殖因子である TFF1, FGF-7 の発現を伴っていた。

さらに、WT マウスに対しても IL-13 の中和が組織修復の促進効果をもたらすと予測し、IL-13R α 2-Ig の投与を行った。12Gy という高線量で小腸上皮がほぼ完全に消失した後のクリプト再生が、IL-13R α 2-Ig 投与群において促進していることが確認され、IL-13R α 2 治療は WT マウスにおける組織修復にも有効であった。

IL-13 の細胞傷害活性

IL-13 中和実験の効果は、同時に、IL-13 に細胞傷害性活性があることを示唆する。

IL-13 の細胞傷害性を直接的に証明する方法としてわれわれは小腸組織片を培養するという腸管組織培養法を開発し、サイトカイン刺激後の変化を検討した。細胞間接着分子である β -catenin を上皮傷害性の指標として検討した結果、IL-13 添加により細胞間の β -catenin 染色性が弱くなり、IL-13 が上皮細胞に対して傷害性を持つことが確認された (図 4)。

興味深いことに、IL-4 は、IL-13 のような細胞傷害性を示さず、受容体を共用すると考えられている IL-4、IL-13 の間に異なる作用が見いだされた。これまでに、大腸癌細胞株単層培養系を用いた実験において、IL-13 の添加によってバリア機能の低下が起こるが、IL-4 ではそのような現象は観察されないことが報告されている²⁰⁾、このように、IL-4 と IL-13 間の作用点の相違を支持する報告はあるが、現在のところ IL-4R α 非依存的な IL-13 の作用機構は証明されていない。

消化管における IL-13 の炎症エフェクターとしての意義は、これまでに、ハプテン誘導潰瘍性大腸炎モデルが IL-13 の中和により軽減すること¹⁹⁾ により示されているが、そのメカニズム解析としてこれまでに示されているのは、IL-13 により、大腸癌細胞株における細胞間接着因子の膜染色性、細胞接着性、細胞移動度が減弱すること、アポトーシスが誘導されバリア機能が低下すること²⁰⁾、皮膚表皮由来細胞株で β -catenin の膜染色性が低下すること²¹⁾、膜タンパク質切断酵素である a disintegrin and metalloprotease

図 4 IL-13 細胞傷害性の証明。腸管組織培養法を用い、サイトカイン (20 ng/mL) 添加 (4 時間)。H&E 染色, β -catenin の免疫組織染色。

(ADAM) が誘導されること²²⁾ などである。今回われわれが用いた腸管組織培養法は、細胞株よりも、より *in vivo* に近い現象をとらえることができ、生体内での IL-13 の細胞傷害性作用を明らかにした系といえる。

結論と考察

これら一連の実験により、放射線照射によって誘導された IL-13 自身に組織傷害作用があること、また、IL-13R α 2 発現によりこの組織傷害性を抑えることで上皮細胞の再生が促進するという消化管組織修復のメカニズムが明らかになった (図 5)¹⁸⁾。

また、WT マウスを用いた実験から、IL-13R α 2 による IL-13 の中和療法は、炎症性腸疾患などの免疫異常を持つ個体における上皮再生だけでなく、放射線療法や抗ガン剤による粘膜傷害に対しても効果が期待できる可能性が示唆された。

今回の実験で IL-13 により β -catenin の細胞局在変化が見られた。 β -catenin は、Wnt シグナルや APC 変異によって核移行すると、細胞増殖促進に働く核内分子として機能し、癌化との関連も深い。興味深いことに、われわれはこれまでに、炎症時 IL-13 の高い産生を示す Th2 応答優位マウスにおいて大腸炎症発癌の頻度が高く、その腫瘍で β -catenin 核移行の頻度も高いことを報告した²³⁾。3 日に一度上皮細胞の入れ替わる、非常に早い細胞回転を特徴とする消化管においては、細胞間結合の変化は細胞増殖・分化・細胞移動等と密接に関わっていると考えられる。今後、IL-13 の細胞間結合分子に対する作用を分子レベルで明らかにし、局所で IL-13 の産生が高まっている潰瘍性大腸炎

図 5 IL-13R α 2 による IL-13 シグナリングの阻害

の病態の理解を深めることによって、新規治療法の開発につながるだけでなく、炎症発癌のメカニズムにも迫ることができると考えている。

文 献

- 1) Macdonald TT et al: Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307**: 1920-1925, 2005
- 2) Fuss IJ et al: Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 9-15, 2006
- 3) Fujino S et al: Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**: 65-70, 2003
- 4) Dong C: Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* **6**: 329-333, 2006
- 5) Fuss IJ et al: Nonclassical CD 1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* **113**: 1490-1497, 2004
- 6) Zhu Z et al: Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and interleukin 13 transgenic mice. *Am J Respir Crit Care Med* **164**: 67-70, 2001
- 7) Zurawski SM et al: Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J* **12**: 2663-2670, 1993
- 8) Chiamonte M et al: Regulation and function of interleukin-13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med* **197**: 687-701, 2003
- 9) Wood N et al: Enhanced IL-13 responses in mice lacking IL-13 receptor. *J Exp Med* **197**: 703-709, 2003
- 10) Donaldson D et al: The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization. *J Biol Chem* **272**: 2317-2324, 1998
- 11) Fichtner-Feigl S et al: IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. *Nat Med* **12**: 99-106, 2006
- 12) Urban J Jr et al: IL-4R alpha and Stat 6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* **8**: 255-264, 1998
- 13) Finkelman FD et al: IL-4 and IL-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* **201**: 139-155, 2004
- 14) Dohi T et al: Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper 2-type responses. *J Exp Med* **189**: 1169-1180, 1999
- 15) Dohi T et al: T helper type-2 cells induce ileal villus atrophy, goblet cell metaplasia and wasting disease in T cell-deficient mice. *Gastroenterology* **124**: 672-682, 2003
- 16) Dohi T et al: Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterology* **119**: 724-733, 2000
- 17) Dohi T et al: CD4+CD45RB^{hi} interleukin-4 defective T cells elicit antral gastritis and duodenitis. *Am J Pathol* **165**: 1257-1268, 2004
- 18) Kawashima R et al: IL-13 Receptor alpha 2 promotes epithelial cell regeneration from radiation-induced small intestinal injury in mice. *Gastroenterology* **131**: 130-141, 2006
- 19) Heller F et al: Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* **17**: 629-638, 2002
- 20) Heller F et al: Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* **129**: 550-564, 2005
- 21) Fujii-Maeda S et al: Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alterations in E-cadherin distribution. *J Invest Dermatol* **122**: 20-28, 2004
- 22) Hirao T et al: Overexpression of ADAM9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells. *Exp Cell Res* **312**: 331-339, 2006
- 23) Osawa E et al: Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer* **118**: 2232-2236, 2006