

プロシーディング (第10回徳島医学会賞受賞論文)

大腸上皮細胞に発現する NADPH oxidase1 (Nox1) の分子特性

桑野由紀, 河原司, 児玉七重, 仲井沙織,
岸恭一, 六反一仁

徳島大学医学部栄養生理

(平成15年3月4日受付)

(平成15年3月5日受理)

NADPH オキシダーゼ1 (Nox1) は貪食細胞の gp91 *phox* の新しいアイソザイムとしてヒト大腸粘膜や大腸がん細胞株 (Caco2細胞) に高発現することが報告されているが, その分子機構や機能については明らかにされていない。本研究では新たに確立したモルモット大腸上皮細胞の初代培養系と, 大腸がん細胞株 (Caco2, T84, 及び HT29細胞) を用いて, Nox1 の活性ならびにその分子機構について検討した。

方 法

モルモット大腸から大腸粘膜を剥離し, コラゲナーゼ処理により分離した大腸粘膜細胞を, Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) と Ham F 12混合培地 (1:1) で1型コラーゲンをコートした培養デッシュで24時間培養した。実験に用いた細胞は, periodic acid-Schiff 染色陽性の表層粘液細胞が90%以上であり, ビメンチンを発現する線維芽細胞は1%以下であった。O₂⁻ 産生細胞は nitroblue tetrazolium (NBT) 染色で確認し, O₂⁻ 産生量はチトクローム c 還元法により測定した。

Nox ファミリー (Nox1, 2, 3, 4, 5), Toll 様受容体 (TLR) ファミリー (TLR1-10), 及び貪食細胞の NADPH oxidase の細胞質成分 (p22 *phox*, p67 *phox*, p47 *phox*, p40 *phox*, 及び rac1/2) の mRNA の発現については, それぞれに特異的なプライマーセットを3種類設計し, RT-PCR 法で確認した。RT-PCR 法で mRNA の発現が確認されたものについては, 特異的な抗体を用いて, ウエスタンブロット法と蛍光免疫組織化学染色法によりタンパク質の発現を確認した。

結 果

モルモット初代培養大腸上皮細胞は, 自発的に約160 nmol/mg protein/h の O₂⁻ を産生しており, フォルボールジエステルや LPS 刺激では活性の上昇は認めなかった。

モルモット大腸上皮細胞とヒト大腸癌由来細胞株 (Caco2, T84, HT29細胞) は, Nox1 を発現していたが, 他の Nox ファミリーの発現は認められなかった。PAS 陽性顆粒をもつモルモット大腸表層粘液細胞は Nox1 を発現しており, NBT と O₂⁻ の反応により生成するブルーホルマザンの沈着を認めた。また, モルモット大腸表層粘液細胞は p22 *phox*, p67 *phox*, および rac1 を発現していたが, p47 *phox*, p40 *phox*, および rac2 の発現は認められなかった。また, ヒト大腸がん細胞株はさらに p67 *phox* を発現せず, O₂⁻ 産生量は 5 nmol/mg protein/h 以下であった。Caco2細胞にアデノウイルスベクターを用い p67 *phox* を過剰発現させたが, O₂⁻ 産生量は増加しなかった。このことから, 大腸における O₂⁻ 産生の活性化には p67 *phox* 以外に他の構成因子が必要である可能性が示唆された。

菌体成分による大腸上皮細胞の Nox1 活性化について Caco2細胞を用いて検討したところ, 大腸菌の LPS, 黄色ブドウ球菌のペプチドグリカン, および CpG DNA による活性化は認められなかった。一方, 同細胞は, TLR5 を発現しており, サルモネラ菌のフラジェリン成分 (FliC) は transforming growth factor- β -activated kinase1 (TAK1) と TAK1 binding protein1 をリン酸化し, Nox1 活性を増加することを見出した。

結 語

モルモット初代培養大腸上皮細胞と大腸上皮細胞株 (Caco2, T84, HT29細胞) は gp91 *phox* のアイソザイムである Nox1 を酵素本体とする O_2^- 産生系を有して

いることを明らかにした。また、モルモットの初代培養系では、胃表層粘液細胞よりもその活性が強いことを明らかにした。大腸表層細胞に発現する Nox1 は、管腔内細菌との相互作用に介在して、消化管粘膜の炎症や免疫応答を制御する可能性が示唆された。

Molecular characterization of NADPH oxidase1 expressed on large intestinal epithelial cells

Yuki Kuwano, Tsukasa Kawahara, Nanae Kodama, Saori Nakai, Kyouich Kishi, and Kazuhito Rokutan
Department of Nutritional Physiology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

NADPH oxidase 1 (Nox1) is an isozyme of gp91-*phox* predominantly expressed in the human colon. In this study, we have established primary cultures of guinea pig large intestinal epithelial cells (LIEC). A great majority of the cultured cells (>90%) was surface mucous cells containing periodic acid-Schiff reaction-positive granules. Vimentin-positive fibroblasts were <1%, and macrophages were not contaminated. LIEC spontaneously produced superoxide anion (O_2^-) at about 160 nmol/mg protein/h. O_2^- -dependent formation of blue formazan particles from nitroblue tetrazolium was observed only on surface of mucous-producing cells, and these cells expressed Nox1 protein at plasma membrane and in the cytoplasm. They expressed p67-*phox*, p22-*phox*, and rac1, but not gp91-*phox*, p47-*phox*, p40-*phox*, and rac2. Immunohistochemistry showed that Nox1, p67-*phox*, and p22-*phox* were predominantly expressed in surface mucous cells of human and guinea pig colonic mucosa. Human colon cancer cell lines (Caco2, T84, and HT29 cells) expressed Nox1, p22-*phox*, and rac1, but not the other NADPH components. These cells secreted O_2^- at <5 nmol/mg protein/h. Caco2 cells possessed Toll-like receptor 5, and flagellin (FliC) from *Salmonella enteritidis* phosphorylated transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1) and TAK1-binding protein 1, and significantly up-regulated O_2^- production. These results suggest that Nox1 expressed in colonic epithelial cells may regulate interactions between pathogenic bacteria and epithelial cells for host defense.

Key words : Nox1, large intestinal epithelial cells, Toll-like receptor 5, flagellin

備考：受賞対象となった研究内容は現在、他誌に投稿準備中のため、本誌編集委員会は徳島医学会賞贈与規程第2条「本賞は本会において優れた研究を発表し、かつ受賞後速やかに四国医学雑誌にその研究成果を原著、総説、プロシーディング等論文として発表する本会会員に授与する」にのっとりプロシーディングとして受理しました。