

## 課題番号 48

## 低分子量 GTP 蛋白 Ral の自然免疫における役割

## [1] 組織

代表者：仲瀬 裕志  
 (京都大学医学部附属病院 内視鏡部)  
 対応者：堀内 久徳教授  
 (東北大学加齢医学研究所)  
 分担者：松浦 稔 (京都大学消化器内科)  
 本澤 雄介 (京都大学消化器内科)

研究費：物件費 30 万円

## [2] 研究経過

本研究の目的・概要：炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎・クローン病)の患者数は年々増加傾向にあり、その発症機序の解明は重要である。現在までの研究結果より、Ral の発現上昇は腸炎悪化につながる事が明らかとなった。そこで本研究では、Ral の自然免疫機構における役割の解明を目的として研究を行った。以下、研究活動状況の概要を記す。

平成 27 年 4 月 22 日 東北大学：現在までの研究成果の報告ならびに今後の進め方について  
 平成 27 年 11 月 27 日 京都大学：現在までの研究成果の報告ならびに今後の進め方について  
 上記以外にも定期的にメールなどにより、進捗状況についての打ち合わせを逐次行ってきた。

## [2] 成果

## (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) RalGAP $\alpha$ 2 KO マウスではマクロファージ中心とした炎症細胞浸潤が WT に比し多い傾向にあった。大腸組織中の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-12p40, IL-1 $\beta$ , IL-17A)の遺伝子発現が RalGAP $\alpha$ 2 KO マウスでは WT に比し有意に高値であった。この結果より、Ral の発現上昇が腸管に軽微な炎症を引き起こす可能性が示唆された。

(2) デキストラン硫酸投与による腸炎モデルを用いた検討：デキストラン硫酸投与後、RalGAP $\alpha$ 2 KO マウスでは WT に比し有意に生存率が低く、組織学的にも有意に激しい腸炎が発症していた。DSS 投与後の大腸組織において、RalGAP $\alpha$ 2 KO

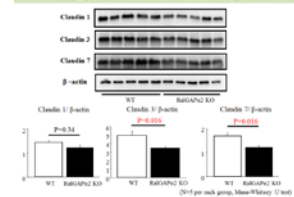
マウスでは、TNF- $\alpha$ , IL-12p40 の遺伝子発現が有意に増強していた。

(3) BMDM を用いた検討では、RalGAP $\alpha$ 2 KO と WT の間で、マクロファージ貪食能に差は認められなかった。

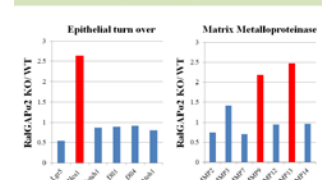
(4) 大腸上皮細胞の phenotype の検討：Tight junction molecule の蛋白発現を定常状態で評価したところ、RalGAP $\alpha$ 2 KO マウスでは ZO-1, Claudin 3, 7 の蛋白発現が WT に比し有意に減弱していた。さらに大腸上皮細胞を単離しマイクロアレイ解析で検討した結果、

RalGAP $\alpha$ 2 KO マウスの大腸上皮細胞では、Hes1, MMP2, MMP9 の遺伝子発現が WT に比し 2 倍以上増加、ADAM17 の遺伝子発現が WT に比し 3 倍以上減少していた。これらの結果から、Ral の発現上昇が、大腸上皮細胞のバリア機能に影響をもたらす可能性が示唆された。

大腸組織中の Claudin の蛋白発現定量



マイクロアレイ解析結果



## (3-2) 波及効果と発展性など

炎症性腸疾患は、原因不明の難治性炎症性疾患である。本共同研究成果は、Ral の発現亢進が、接着分子や上皮細胞分化に関与する分子などに影響を及ぼし、大腸粘膜バリアー機構の破綻、しいては腸炎増悪につながるものと考えられた。現在、本モデルは大腸粘膜バリアー機能障害がその発症機序に強く関与する潰瘍性大腸炎のモデルマウスとして考えられている。今まで得られた結果をもとに、Ral-GAP を loxp で修飾した RAL-GAP 遺伝子改変マウスを使用し、Villin プロモーターを持つ Cre マウス、LysM プロモーターをもつ Cre マウスと交配することにより腸管上皮およびマクロファージ特異的に Ral-GAP が欠損したマウスを作製し、研究を継続している。世界でも報告されたことのない潰瘍性大腸炎モデルが作製されたものと考えられる。このモデルマウスを使用することにより、今後は炎症性大腸腫瘍発症の機序や新規治療開発などに取り組むことが可能となる。

[4] 成果資料

(1) Yoshino T, Nakase, H, Horiuchi H, Chiba T.  
The role of Ral in colitis-associated cancer in mice. (Poster Presentation ) The 2<sup>nd</sup> JGSE International Topic Conference March 23, 2013

(2) 南尚希、吉野琢哉、堀内久徳：腸炎関連発癌におけるRalの関与についての検討 第102回消化器病学会近畿地方会 パネルディスカッション  
2015年2月21日 大阪

(3) 南尚希、越川頼光、山田聡、本澤有介、吉野琢哉、松浦稔、仲瀬裕志、堀内久徳：腸管炎症におけるRalの役割 第52回日本消化器免疫学会総会  
2015年7月30日~31日 東京

(4) 南尚希、越川頼光、山田聡、本澤有介、松浦稔、妹尾浩、仲瀬裕志、堀内久徳：第102回日本消化器病学会総会 2016年4月21日~23日 東京  
(発表予定)