



展^{TENBO}望

TLR3 を介した 放射線誘導性腸上皮傷害機構



武村 直紀
Takemura Naoki



植松 智
Uematsu Satoshi

(千葉大学大学院医学研究院, 東京大学医科学研究所)

1 はじめに

放射線は人体に甚大な被害を及ぼす危険性があり、事故のないよう管理には細心の注意が払われる。近年では、東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所事故において、その危険性を再認識させられたことは記憶に新しい。放射線は、その電離・励起能力によって生体細胞内のDNAを損傷させる。軽度のDNA損傷は修復することができるが、それが不可能である場合にはDNAが損傷したまま分裂するか、若しくは細胞死を誘導する。これらの影響が蓄積・拡大することによる身体機能の低下を放射線障害という¹⁾。脾臓やリンパ節などの造血組織と同様に、消化管は非常に放射線感受性の高い臓器である。消化管の中でも小腸は特に感受性が強く、高線量の放射線被曝によって傷害を受けると栄養吸収や物理的バリアなどの上皮機能が失われ、吸収障害、下痢、出血に加えて、腸内細菌の組織内侵入に伴う感染症や敗血症といった急性期障害が引き起こされ、亜急性に死亡する^{2,3)}。これらの急性期の症候は放射線性消化

管症候群 (gastrointestinal syndrome ; GIS) として知られており、臨床的に解決すべき重大な問題となっている。本稿では、筆者らがGISの病態発現機構について免疫学的な観点から解析して得られた最近の研究成果について紹介する。

2 GISに関する従来の理解

小腸の粘膜は一層の上皮によって覆われており、管腔側に伸びた突起状の構造をした絨毛と、その下部にある窪みのクリプト (陰窩) に区分される⁴⁾。絨毛には吸収上皮細胞が非常に多く存在するほか、粘液を産生する杯細胞が存在し、栄養吸収や物理的バリアといった主な上皮機能を司っている。クリプトには腸上皮幹細胞が存在しており、活発に増殖・分化を繰り返している。派生した娘細胞^{*1}は成熟して絨毛に移動して上皮層を形成し、最終的には絨毛の先端から管腔内へと脱落する。小腸ではこのよ

^{*1} 娘細胞：細胞分裂で生じた2個の新しい細胞。分裂前のものを母細胞と呼ぶのに対していう。

うな上皮の更新が3～4日を周期として絶えず行われている。DNAが放射線により傷害を受けると、がん抑制遺伝子として知られるp53が細胞周期を停止させ、DNA修復応答を誘導する⁵⁾。しかし、DNAの損傷が修復不可能である場合は、p53は細胞死を誘導する。クリプトの腸上皮幹細胞や娘細胞は非常に放射線感受性が高く、死滅すると絨毛への細胞の供給が途絶してしまい、上皮構造が破綻してGISに陥る。このような分子メカニズムに基づく、放射線誘導性の細胞死を阻害する薬剤はGISの治療に有効と考えられるが、p53を阻害する薬剤を用いた治療応用は傷害されたDNAが修復可能な場合にまで影響を及ぼす可能性があるため、現実的ではなく、これまでのところ有効な治療法は確立されていないのが現状である。

3 GISの病態発現にTLR3が関与する

様々な内的・外的なストレスによって臓器障害が誘導され、疾病状態が形成される過程において、免疫応答は欠くことのできないものである。免疫応答は自然免疫と獲得免疫に大別される。20世紀の終わりまで自然免疫は病原体などの異物を貪食するだけの非特異的応答と考えられてきた。ところが近年、Toll様受容体(Toll-like receptor; TLR)の発見、機能解析を通じて、自然免疫の新たな役割が分かってきた。TLRは代表的な自然免疫受容体ファミリー分子で、哺乳動物では10数個のファミリーメンバーからなっている⁶⁾。ノックアウト(knockout; KO)マウスの解析により、TLRは細菌、真菌、

原虫、ウイルス由来の成分によって活性化され、病原体の侵入を感知することが明らかになった。リガンド*²を認識したTLRは、NF- κ BやIRFファミリーなどの転写因子の活性化を介して、炎症性サイトカインやI型インターフェロンなどを誘導して感染初期の生体防御を行うとともに、獲得免疫の誘導も制御することが明らかになっている。

最近では、本来は生体防御の機能を果たすTLRが、炎症を誘導して自己組織の損傷を増悪させる場合があることが明らかとなりつつある⁷⁾。GISにおいても自然免疫応答が病態の増悪に関与する可能性があるが、そのトリガー要因として重要なTLRを中心とした研究はこれまで十分に行われていなかった。マウスに放射線を照射すると、ヒトの放射線障害をよく反映した症状を示すことが知られている。筆者らは致死量(10 Gy)の γ 線をマウスに全身照射したところ、急速に衰弱してほぼ1週間以内に死亡したが、興味深いことにTLRファミリーのうちTLR3のKOマウスは野生型のマウスに比して有意に長く生存し、強い耐性を持つことが分かった(図1)⁸⁾。10 Gyの放射線を全身に被ばくした際の死因としては、腸管のほかに造血

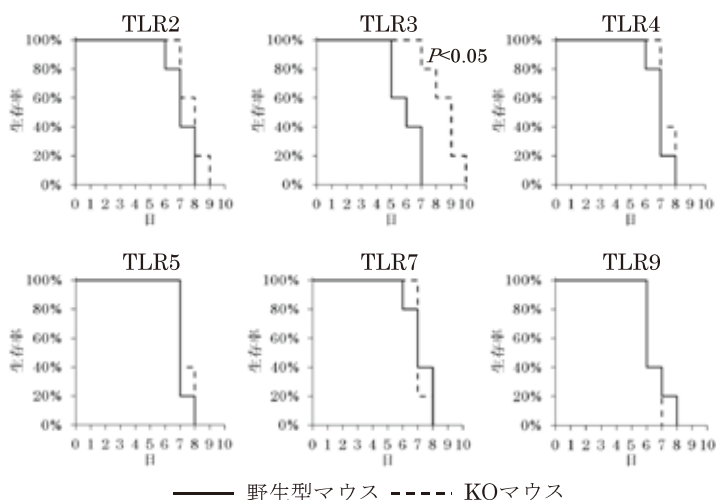


図1 放射線を全身照射した際のTLR KOマウスの生存率
マウスに10 Gyの γ 線を全身照射して生存率を測定した

*² リガンド：特定のタンパク質と特異的に結合する比較的低分子の化合物。

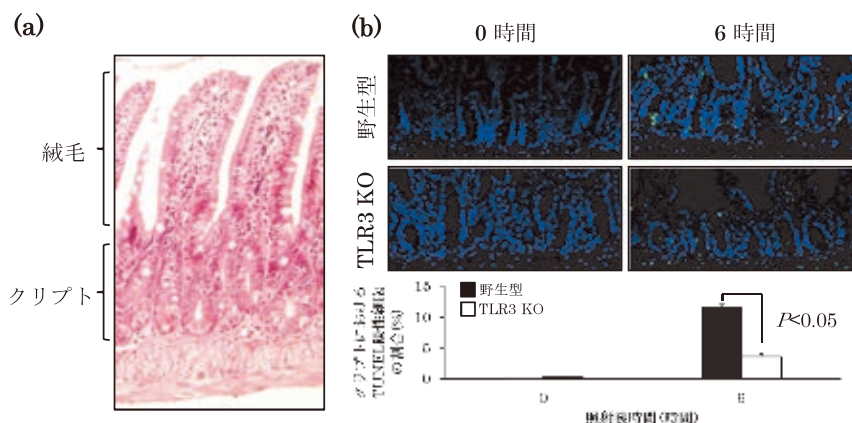


図2 野生型及び TLR3 KO マウスにおける放射線誘導性クリプト細胞死
(a) 小腸のヘマトキシリン-エオジン染色像。小腸の上皮は、上皮幹細胞やその娘細胞が活発に増殖・分化しているクリプト（陰窩）と、クリプトから供給された成熟上皮細胞群が並列して層を成す絨毛によって構成されている。(b) 10 Gy γ 線照射後の小腸 TUNEL 染色像。TUNEL 染色により死細胞が検出される（死細胞；緑、核；青）

組織の機能障害が考えられる¹⁻³⁾。骨髓及び血液中の白血球数を調べたところ、野生型マウスと TLR3 KO マウスのいずれにおいても放射線照射により劇的に減少していたが、その程度に差はなかった。一方で、GIS に伴う下痢や体重減少を調べたところ、TLR3 KO マウスは極めて軽度の症状を示した。さらに厳密に評価するために、筆者らは放射線照射した後に骨髓細胞を移入し、造血器障害の発症を未然に防いだ状態でマウスを観察した。野生型マウスは依然として重度の下痢や体重減少を示して亜急性に死亡したのに対して、TLR3 KO マウスではそれらの症状は軽く、回復して生存した。このように、致死性の GIS が成立する過程において、TLR3 が極めて重要な役割を果たしていることが分かった。

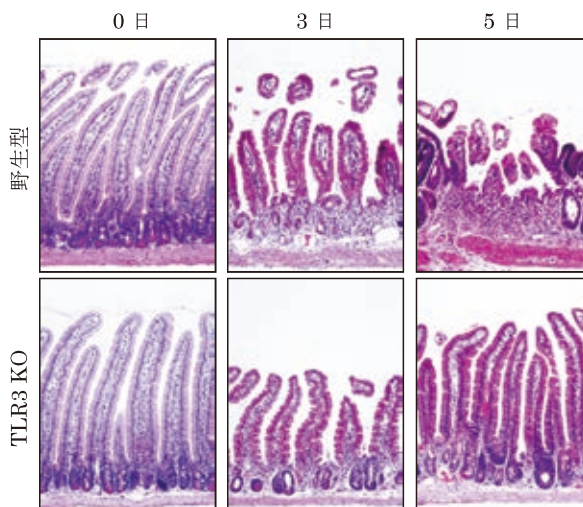


図3 放射線照射後の野生型及び TLR3 KO マウスの小腸の経時的構造変化
10 Gy の γ 線を照射してから 0, 3, 5 日目の小腸のヘマトキシリン-エオジン染色像

4 TLR3 はクリプトの細胞死を引き起こす

TLR3 がどのように GIS に寄与するのかを明らかにするために、筆者らは放射線による小腸上皮傷害の過程を経時的に組織観察した。放射

線に被ばくすると、数時間のうちに小腸のクリプトで広範な細胞死が認められる⁵⁾。注目すべきことに、野生型マウスと比して TLR3 KO マウスではその頻度が有意に少なかった（図2）。その後数日のうちに、野生型マウスではほとん

どのクリプトは構造が破綻して消失してしまい、上皮細胞の供給を失った絨毛は最終的に上皮層が脱離して固有層が露出する様子が観察された（図3）。一方で、TLR3 KO マウスでは多くのクリプトが構造を維持しており、健全状態のように細胞増殖が活発に起きていた。また、絨毛の上皮構造も破綻しなかった。すなわち、TLR3 KO マウスのクリプトでは、放射線誘導性細胞死が軽度であるために腸上皮幹細胞は死滅せず、絨毛に細胞が十分に供給され続けた結果、上皮層が破綻せずGISに至らなかったと考えられる。

次に、筆者らはTLR3の活性化がいかにしてクリプト細胞死を誘導するのかを解析した。小腸におけるTLR3遺伝子の発現分布を調べたところ、TLR3はクリプトをはじめとする上皮組織に強く発現していることが分かった。近年、小腸のクリプトを分離して*in vitro*で三次元培養し、上皮細胞のみから構成される立体的組織構造体（オルガノイド）を作成する技術が確立された⁹⁾。特筆すべきことに、小腸オルガノイドは絨毛やクリプトをそれぞれ反映した部分的構造（ドメイン）を形成する。TLR3の人工リガンドであるpoly I:C（polyinosinic-polycytidylic acid；ウイルスRNAを模倣する合成二本鎖RNAアナログ）でマウスの小腸オルガノイドを刺激したところ、クリプト様ドメインにおいてTLR3依存的な細胞死が観察された（図4（a））。同様の現象が生体でも起きるのかを評価するため、poly I:Cをマウスに腹腔投与したところ、小腸クリプトにおいてTLR3依存的な細胞死が誘導された（図4（b））。つまり、放射線被ばく後の小腸では、リガンドにより活性化したTLR3が直接的にクリプト細胞死を誘導すると考えられる。

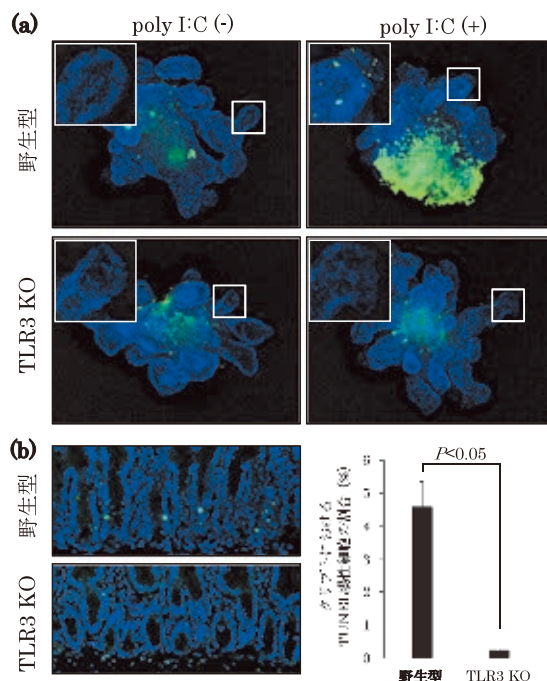


図4 野生型及びTLR3 KO マウスにおけるpoly I:C誘導性クリプト細胞死

(a) poly I:Cで刺激した小腸オルガノイドのTUNEL染色像（死細胞；緑、核染色；青）。左上図はクリプト様ドメインの一部を拡大した像。中央部には、正常に一定期間増殖した後に細胞死して脱離した、あるいはpoly I:Cにより細胞死した上皮細胞が観察される。(b) poly I:Cを腹腔投与したマウスの小腸TUNEL染色像（死細胞；緑、核；青）

5 自己のRNAがTLR3依存的細胞死を誘導する

筆者らは放射線被ばく後の小腸においてTLR3を刺激し得るリガンドを探索した。マウスをはじめ、動物の腸内にはおびただしい数の細菌やウイルスが存在する。従来、TLR3はウイルスの二本鎖RNAを認識するセンサーとして機能すると考えられていることから⁶⁾、放射線被ばく後では腸内微生物に由来する物質が小腸クリプトのTLR3を活性化すると予想した。ところが、無菌マウス（無“菌”と称されるが、ウイルスを含めて一切の微生物を保有しない）における放射線誘導性クリプト細胞死を調べたところ、腸内微生物を有する通常のマ

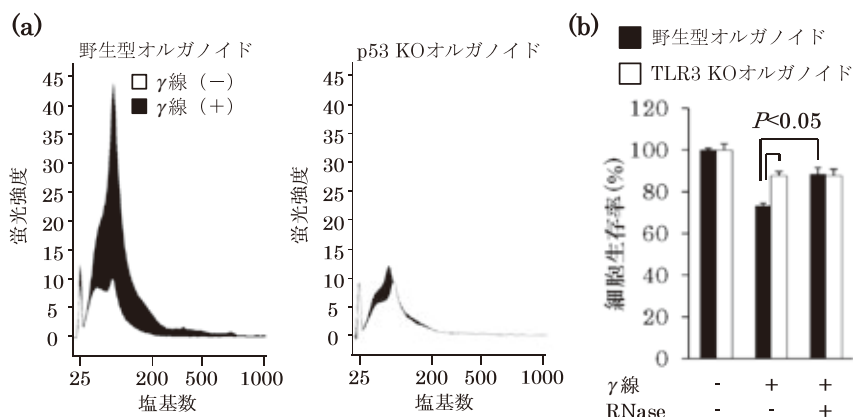


図5 自己RNAによるクリプト細胞死の誘導

(a) 10 Gyのγ線を小腸オルガノイドに照射して1日後の培養上清中のRNAをバイオアナライザーで定量した。(b) 10 Gyのγ線を小腸オルガノイドに照射して1日後の細胞生存率。一部のサンプルにはRNaseを培地に添加して培養した

ウスと差はなかった。すなわち、GISにおいてTLR3を活性化するリガンドは腸内微生物に由来するものではないと考えられた。

TLRは微生物などの非自己に由来する外来性のリガンドのほかに、傷害を受けた自己組織より放出される内因性のリガンドも認識することが明らかとなってきた⁷⁾。特定の細胞室内成分、細胞外マトリックスタンパク質、核酸などが内因性リガンドとして報告されており、TLRの活性化を介して炎症を惹起し、組織傷害を増悪させると考えられている⁷⁾。放射線によって最も初期に誘導される腸上皮傷害は、p53依存性のクリプト細胞死と考えられる⁵⁾。まず筆者らは、放射線によって誘導されるp53依存性の細胞死とTLR3依存性の細胞死の関係性を調べた。放射線誘導性クリプト細胞死に関して、TLR3 KOマウスではその頻度は減少しているものの、依然として観察される。重要なことに、TLR3 KOマウスではp53依存性の細胞死は正常に機能していた。つまり、TLR3 KOマウスにおける放射線誘導性クリプト細胞死の減少は、p53機能の低下によるものではないと考えられる。一方で、p53 KOマウスでは放射線誘導性クリプト細胞死は全く観察されなかった。p53 KOマウスの小腸では野生型と同様に

TLR3を発現しており、さらにpoly I:CによるTLR3依存性のクリプト細胞死も観察された。すなわち、放射線に被ばくしたp53 KOマウスでTLR3依存性の細胞死が観察されないのは、TLR3機能の低下が原因ではなく、リガンドが発生していないためと予想された。

そこで筆者らは、p53依存性の細胞死がTLR3リガンドの発生要因となるかを調べた。小腸オルガノイドに放射線を照射すると、クリプト様ドメインにおいてp53依存性の細胞死が起きる。興味深いことに、クリプト細胞がp53依存性に細胞死すると、細胞内のRNAが漏出することが分かった(図5(a))。さらに、漏出したRNAはTLR3依存性に細胞死を引き起こし、放射線誘導性クリプト細胞死を増悪させていた(図5(b))。本来、哺乳類の細胞内のRNAは一本鎖であり、TLR3が認識すると考えられている二本鎖RNAとは構造的に異なる。筆者らは漏出したRNAのうち、とりわけ長鎖のRNAがTLR3を活性化することを確認している。最近の報告によると、ポリオウイルス由来の一本鎖RNAはステムループなどの二本鎖様構造をとり、TLR3を活性化し得ることが明らかとなっている¹⁰⁾。同様に、哺乳類のRNAも長鎖のものは分子内に二本鎖構造を形成しやすいのか

もしれない。TLR3 リガンドとなる長鎖 RNA のタイプ、構造、ほかの生体内分子との相互作用、TLR3 への結合様式などに関して、更なる解析が要される。

6 TLR3/RNA 結合阻害剤が GIS を改善する

放射線被ばく後の小腸において、死細胞から漏出した RNA と TLR3 の結合を阻害すれば、GIS を軽減できると期待される。筆者らは、TLR3 への二本鎖 RNA の結合を阻害する薬剤として報告・市販されている (R)-2-(3-chloro-6-fluorobenzo[b]thiophene-2-carboxamido)-3-phenylpropanoic acid を試験した¹¹⁾。γ線を照射する前にマウスに阻害剤を投与しておいたところ、未投与の場合と比べてクリプト細胞死が減少し、生存率が大きく改善した(図6(a),(b))。特筆すべきことに、γ線を照射して1時間経過した時点で阻害剤を投与した場合にも生存率の改善が見られた(図6(b))。KO マウスの解析から、TLR3 の欠損は p53 機能にはほとんど影響しないと考えられる。したがって、放射線被ばくの一定時間内に TLR3 の特異的阻害剤を投与すれば、p53 の DNA 修復機能に影響することなく、GIS を予防できると期待される。

7 おわりに

本稿では、放射線被ばく後の急性期に発生する消化管上皮傷害において TLR3 が極めて重要な役割を果たしており、その活性化阻害が有効な治療手段となり得ることを紹介した(図7)。放射線事故を除いて、日常生活において私た

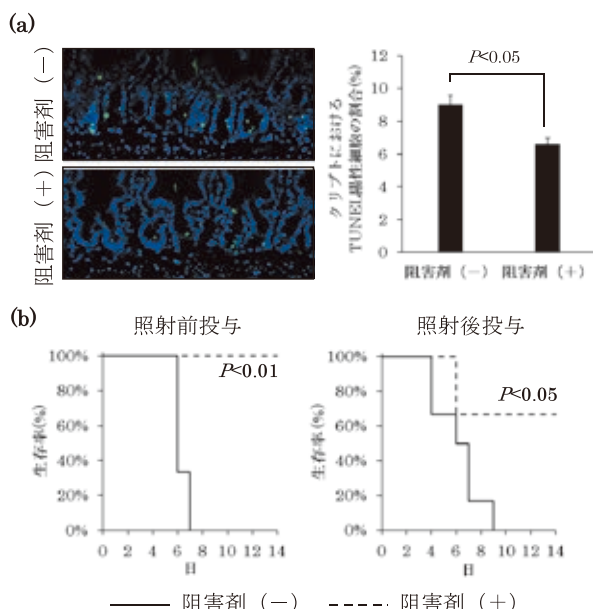


図6 TLR3/RNA 結合阻害剤による GIS 抑制効果

(a) TLR3/RNA 結合阻害剤を投与したマウスに 10 Gy の γ線を照射した際の小腸 TUNEL 染色像(死細胞; 緑, 核; 青)。阻害剤は照射 1 時間前に投与した。(b) 野生型マウスに 10 Gy の γ線を照射した際に阻害剤を投与した場合の生存率。阻害剤は照射 1 時間前あるいは 1 時間後に投与した

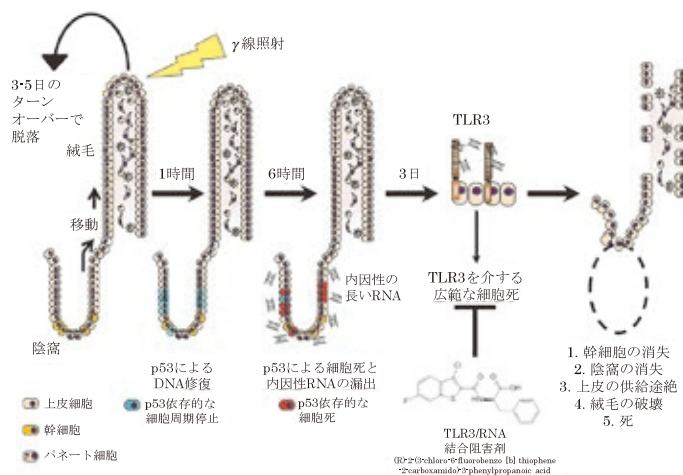


図7 GIS の病態形成機構

電離放射線が小腸クリプト細胞の DNA を傷害すると、p53 が DNA 修復のために細胞周期を停止する。DNA の損傷が修復不可能な場合、p53 は細胞死を誘導する。p53 により細胞死した細胞からは RNA が漏出し、それが TLR3 を活性化して、更に広範な細胞死を誘導する。クリプトの小腸上皮幹細胞が死滅すると、上皮細胞の供給が途絶し、絨毛上皮の構造ひいては機能が破綻して GIS に至る

ちが高線量の放射線に曝される機会はありませんように思われる。ところが、放射線ががん治療に広く応用されていることは周知の事実であり、なかでも悪性腫瘍の全身リンパ節転移や精巣・卵巣癌の腹膜播種に対して広範囲の腹部放射線照射が実施された際には、治療目的外である消化管において GIS と同様の症状がしばしば併発する。急性期での粘膜傷害の後には、慢性炎症を伴う進行性の腸炎へと発展し、狭窄、流通障害、線維化などの難治性の晩期障害を引き起こす場合があります、がん患者のクオリティ・オブ・ライフを著しく低下させている。今後、それぞれの発達段階における自然免疫機能の役割を明らかにし、放射線事故やがん治療の場における消化管障害に対して新たな予防・治療手段を提案していきたい。

参考文献

- 1) Little, M.P., *Br Med Bull.*, **68**, 259–275 (2003)
- 2) Waselenko, J.K., *et al.*, *Ann Intern Med.*, **140**, 1037–1051 (2004)
- 3) Berger, M.E., *et al.*, *Occup Med. (Lond)*, **56**, 162–172 (2006)
- 4) Potten, C.S., *et al.*, *Cell Prolif.*, **42**, 731–750 (2009)
- 5) Merritt, A.J., *et al.*, *Cancer Res.*, **54**, 614–617 (1994)
- 6) Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O., *Cell*, **124**, 783–801 (2006)
- 7) Takeuchi, O. and Akira, S., *Cell*, **140**, 805–820 (2010)
- 8) Takemura, N., *et al.*, *Nat Commun.*, **5**, 3492 (2014)
- 9) Sato, T., *et al.*, *Nature*, **459**, 262–265 (2009)
- 10) Tatematsu, M., *et al.*, *Nat Commun.*, **4**, 1833 (2013)
- 11) Cheng, K., *et al.*, *J Am Chem Soc.*, **133**, 3764–3767 (2011)