

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08313

研究課題名(和文) 粘膜治癒を目指したIBD治療におけるWnt5aペプチドの有用性に関する検討

研究課題名(英文) The role of Wnt5a peptide to enhance colonic epithelial healing for the treatment of IBD

研究代表者

内山 和彦 (Uchiyama, Kazuhiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50298428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは大腸筋繊維芽細胞由来の細胞培養液からWnt5a蛋白の一部である31個のアミノ酸からなるペプチド(Wnt5aペプチド)が、大腸上皮細胞の酪酸誘導性Hsp25発現を抑制することを発見してきたが、そのメカニズムや役割に関して本研究を通して以下の結果を得た：

1)大腸上皮細胞のHSP25発現を抑制することによる細胞増殖促進作用を認め、それはカテニンの核内移行を促進することによる。2)マウスDSS腸炎からの回復期モデルで、Wnt5aペプチドを腹腔内投与すると腸炎による腸管障害からの回復が促進された。

以上よりWnt5aペプチドがHsp25の発現抑制を介した大腸上皮の再生を促進することがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, two key factors were identified that have important and counterbalancing roles regulating intestinal epithelial growth processes: pericrypt myofibroblast-derived Wnt5a and the microbial metabolite butyrate.

Intracellular Hsp25 inhibited YAMC proliferation and YAMC cell proliferation were enhanced via reduction of Hsp25 under butyrate condition with myofibroblasts conditioned medium and MS analysis revealed that the factor in conditioned medium was Wnt5a, especially a part of full length of Wnt5a: Wnt5a peptide (36mer amino acid). Synthesized Wnt5a peptide also reduced butyrate induced Hsp25 and promoted proliferation via β -catenin nuclear translocation in YAMC. Wnt5a peptide treatment in DSS colitis recovery phase model showed the quick recover compared to control.

We conclude that Wnt5a peptide has an activity to promote colonic epithelial proliferation via reduction of Hsp25 under butyrate condition.

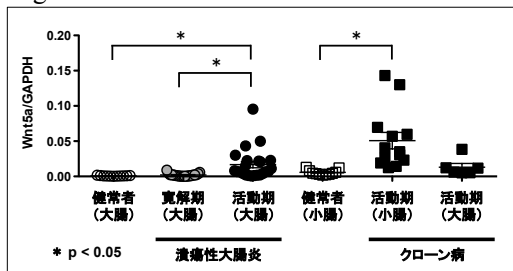
研究分野：消化器内科

キーワード：大腸上皮細胞 筋繊維芽細胞 短鎖脂肪酸 粘膜再生

1. 研究開始当初の背景

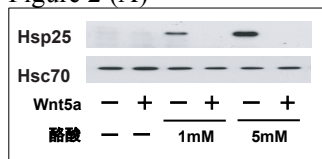
潰瘍性大腸炎やクローン病を代表とする炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: 以下 IBD) は原因不明の慢性再燃性消化管炎症疾患である。近年、IBD の病態における免疫機構や腸内細菌の関与などが明らかとなっており、それらを標的とする様々な治療が提唱されている。その治療効果の目標は臨床的寛解ではなく、内視鏡的に確認する「粘膜治癒」が重要であり粘膜治癒が得られれば、臨床的寛解の維持、手術率の低下につながる事が示されている。IBD に対しては近年多くの治療薬が臨床応用されており、治療成績も向上しているが、同時に治療抵抗性で手術を余儀なくされる症例も依然として多く存在している。また本邦では患者数が年々増加の一途をたどっており、内科治療に抵抗性で手術にいたる症例も増加している。したがって、既存の内科治療に加え、粘膜治癒を促すことによる長期寛解維持効果を発揮する治療の開発が急務である。これまでのわれわれの検討で、IBD 患者の活動期病変部腸管粘膜において、Wnt5a mRNA 発現が有意に上昇していることが分かっている (Figure 1)。

Figure 1



また、潰瘍性大腸炎患者において、その後の治療で活動期から粘膜治癒に至り、寛解期へと移行した症例は、病勢のコントロールが不良で寛解に至らなかった症例と比べ、有意に粘膜

Figure 2 (A)



での Wnt5a 発現が上昇していた。また、基礎検討として大腸筋線維芽細胞から分泌

される Wnt5a が、大腸上皮細胞における酪酸誘導性 Hsp25 発現を著明に抑制すること (Figure 2 (A))、抑制を介して大腸上皮細胞の増殖を促進していることを明らかにしてきた (Figure 2 (B))。さらに、筋線維芽細胞由来の細胞培養液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離し、質量分析計で活性成分の配列を分析した結果、筋線維芽細胞から

Figure 2 (B)

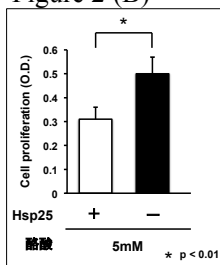
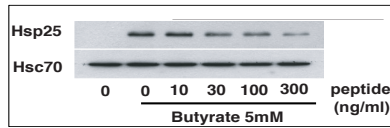
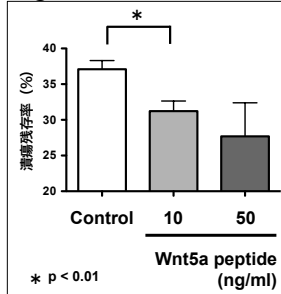


Figure 3



分泌され、活性を持つ Wnt5a は蛋白の全長ではな

Figure 4



く、その一部、31個のアミノ酸からなるペプチド (Wnt5a ペプチド) であることを発見した。

この Wnt5a ペプチドは容量依存性に大腸上皮細胞における酪酸誘導性 Hsp25 を抑制し (Figure 3)、wound healing assay によって創傷治癒を促進することはすでに確認している (Figure 4)

2. 研究の目的

Wnt5a が TGF β の経路を介して大腸の粘膜修復に関与する報告はあるが、腸管上皮細胞の創傷治癒効果に対する Wnt5a の直接的な作用はこれまで報告がない。Wnt 蛋白質は 17 種以上のサブタイプから形成され、 β -catenin、G タンパク質、protein kinase C、Rho/Rac などの細胞内シグナルを介して、形態形成、細胞増殖、形質転換 (癌化) に関与している。Wnt5a はこれまで β -catenin 非依存的なシグナルを惹起するとされてきたが、細胞種や状況により様々な経路を賦活化することが報告されており、その役割の全貌に関しては未だに明らかになっていない。これまでの検討で、我々は潰瘍性大腸炎における粘膜治癒を伴った臨床的寛解と、大腸粘膜における Wnt5a 発現に関連があることを見出した。さらに、我々は Wnt5a の一部であり、培養細胞において創傷治癒効果を有している Wnt5a ペプチドを同定しているが、この Wnt5a ペプチドの細胞内シグナル機構の詳細や動物実験をもとにした臨床応用の可能性に関しては今後のさらなる詳細な検討が必要である。

以上、これまでの我々の研究成果と IBD の実臨床における問題点をふまえ、損傷した腸管粘膜の修復における Wnt5a ペプチドの有用性を、培養細胞および動物実験モデルを用いて、将来的な臨床応用を目指したうでの検討をおこなうために本研究を企画した。

本研究では、3 年間の研究期間内に以下の点を明らかにしたい。

- (1) Wnt5a ペプチドはどのような細胞内シグナルを介して大腸上皮細胞の創傷治癒を促進しているのか。
- (2) マウス腸炎惹起モデルにおいて、Wnt5a ペプチドが創傷治癒効果を発揮するのか、その機構は培養細胞モデルと同様なのか。さらに長期飼育した場合の発癌などの安全性は担保されるのか。
- (3) IBD 患者の各種治療による腸管粘膜での

Wnt5a 発現とその治療効果との相関を検討。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた基礎実験

Wnt5a ペプチドによる細胞内シグナル

細胞増殖・創傷治癒に関しては β -catenin、protein kinase C、Rho を介した経路が報告されており、いずれも Wnt5a 刺激によって誘導される可能性がある。細胞はシカゴ大学 Eugene B Chang 教授より供与された正常マウス大腸上皮細胞 (Young Adult Mouse Colonic epithelial cell: YAMC 細胞) を用いて検討し、検討項目は以下とする。

- ・ TOP FLASH および FOP FLASH を用いた Wnt5a ペプチドの細胞内転写誘導。
- ・ Wnt5a ペプチドを作用させた際の β -catenin 核内移行、Protein kinase C 活性、Rho 活性。

筋線維芽細胞における Wnt5a 誘導因子

Wnt5a は筋線維芽細胞から分泌されることが分かっているが、その内因性の Wnt5a 発現調節因子を検討する。筋線維芽細胞からの Wnt5a 分泌促進因子候補として IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-17、TNF- α 、IFN- γ など、IBD の病態に関与しているサイトカインを検討する。それぞれの因子を筋線維芽細胞 (Vanderbilt University Pericypt Fibroblast: VUPF-1 細胞: シカゴ大学 Eugene B Chang 教授より供与) に作用させた際の Wnt5a mRNA を Real Time PCR で、タンパク発現を Western blotting 法を用いて検討する。

(2) マウスを用いた動物実験

DSS 腸炎モデル

3%DSS 水を 7 日間自由飲水させた後、Wnt5a ペプチド (10 μ g/body) を 7 日間腹腔内投与する。検討項目は以下とする。

- ・ 体重、DAI の経時的な測定
- ・ 腸管長の測定
- ・ 腸管粘膜での TGF- β などの増殖因子、Hsp25 発現 (mRNA、タンパク)

(3) IBD 患者の臨床検体を用いた検討

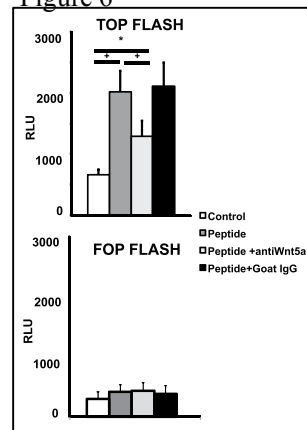
京都府立医科大学消化器内科・内藤裕二准教授の協力のもと、京都府立医科大学付属病院にて患者の同意のもとに採取された病変部粘膜を用いて検討する。対象疾患は既存の治療で病勢のコントロールが不応である潰瘍性大腸炎、クローン病とし、新たにステロイド、タクロリムス、抗 TNF- α 抗体製剤のいずれかを投与する患者を対象とする。治療前の内視鏡検査で病変部より生検を施行し、Real Time PCR 法を用いて Wnt5a mRNA 発現を測定する。治療後は経時的に粘膜における Wnt5a 発現を測定し、その際の臨床スコア、内視鏡スコアとの相関を検討する

4. 研究成果

1) Wnt5a ペプチドによる細胞内シグナルの検討: YAMC 細胞に Wnt5a ペプチドを作用させたところ、TOPflash によって β カテニンの核

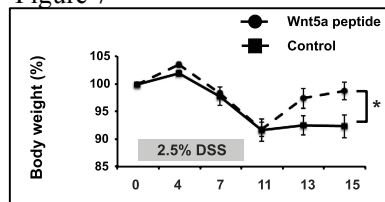
内移行が促進され (Figure 6)、細胞増殖アッセイでは細胞増殖が促進された。マウス大腸への lenti virus を用いた Hsp25 強制発現は大腸上皮細胞の増殖が抑制され、マウス大腸粘膜下への Wnt5a siRNA 投与は大腸上皮細胞の Hsp25 発現を増加させると同時に増殖を抑制した。

Figure 6



2) マウス腸炎モデルを用いた検討: マウス DSS 腸炎の回復期モデルにおいて、DSS 投与後の回復期に Wnt5a ペプチドを投与することにより、マウス大腸上皮細胞での Hsp25 発現が抑制され、腸炎からの回復が早まり (Figure 7)、粘膜再生が促進された。

Figure 7



3) ヒト大腸の検体を用いた検討: 潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜生検からの Wnt5a mRNA 発現は、潰瘍性大腸炎の活動期で強く、回復とともに改善した。また、発現量が高い患者は寛解期への移行率が高かった。ただ、症例数は限られており、今後さらなる症例数の増加による詳細な検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Uchiyama K, Sakiyama T, Hasebe T, Musch MW, Miyoshi H, Nakagawa Y, He TC, Lichtenstein L, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T, Jabri B, Stappenbeck T, Chang EB. Butyrate and bioactive proteolytic form of Wnt-5a regulate colonic epithelial proliferation and spatial development. *Sci Rep.* 2016 Aug 26;6:32094.

② Uchiyama K, Yagi Y, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Kuriu Y, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y, Naito Y. Serum metabolomics analysis for early detection of colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2017 Jun;52(6):677-694

③ Uchiyama K, Takagi T, Kashiwagi S,

Toyokawa Y, Tanaka M, Hotta Y, Dohi O, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Ishikawa T, Handa O, Konishi H, Kishimoto M, Yagi N, Naito Y, Itoh Y. Assessment of endoscopic mucosal healing of ulcerative colitis using linked colour imaging, a novel endoscopic enhancement system. J Crohns Colitis. 2017 Aug 1;11(8):963-969

〔学会発表〕（計 1 件）

① Colonic microbial ecology contributes to suppression of intestinal inflammation in Bach1-deficient mice. Kazuhiko Uchiyama, Tomohisa Takagi, Yuji Naito, Yasuki Higashimura, Katsura Mizushima, and Yoshito Ito, 9TH International conference on Heme Oxygenase Prague 2016, 14-17Sep2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ペプチド

発明者：内藤裕二、内山和彦

権利者：京都府公立大学法人

種類：特許

番号：特願 2016-163465

出願年月日：平成 28 年 8 月 24 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

内山 和彦 (UCHIYAMA, Kazuhiko)

京都府立医科大学・消化器内科・助教

研究者番号：50298428

(2)研究分担者

内藤 裕二 (NAITO, Yuji)

京都府立医科大学・消化器内科・准教授

研究者番号：00305575

高木 智久 (TAKAGI, Tomohisa)

京都府立医科大学・消化器内科・准教授

研究者番号：70405257