

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09367

研究課題名(和文) シクロスポリンによるFLIPを介した腸上皮細胞ネクロプトーシス抑制効果

研究課題名(英文) Inhibitory effect of intestinal epithelial necroptosis via FLIP by cyclosporine

研究代表者

櫻庭 裕丈 (Sakuraba, Hirotake)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90422063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DSS急性腸炎モデルにおいてシクロスポリン投与による、ネクロプトーシス調節分子の発現調節解析を行った。RIPK3、AMPK、MLKL及びRIPK1の発現は、コントロール群とシクロスポリン投与群との間に有意な発現の差は認めなかった。一方、ネクロプトーシスからの炎症誘導メディエーターであるHMGB-1の発現は、腸上皮細胞分画においては、DSS投与0、1日目、粘膜下組織の分画では、DSS投与2日目において、コントロールに比べてシクロスポリン投与群で有意に抑制されていた。ネクロプトーシス調節因子であるRIPK3、AMPKを介さない、HMGB1発現抑制効果の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シクロスポリンによるネクロプトーシス実行メディエーターであるHMGB-1の発現調節効果の存在が明らかになった。従来のネクロプトーシス調節分子を介さない機序が存在する可能性があり、腸上皮ネクロプトーシスの新しいメカニズムあるいはHMGB1の治療マーカーの可能性など、さらなる解析を進める意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We assessed the expression of molecules which adjusted necroptosis by cyclosporine in DSS-induced colitis model. As for the expression of RIPK3, AMPK, MLKL and RIPK1, there was no differences it between the control group and the cyclosporine-treated group. Whereas the expression of HMGB-1, which was one of inflammatory mediators from necroptosis, was significantly inhibited by cyclosporine as compared with controls.

Our data suggested that cyclosporine inhibited the expression of HMGB1 independent of RIPK3, AMPK which were conventional regulatory molecules of necroptosis.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：腸上皮ネクロプトーシス シクロスポリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(UC)における治療成績は、Infliximab(IFX)に代表される抗 TNF- α 療法及びシクロスポリン、FK506 といった calcineurin 阻害剤、顆粒球除去療法(GCAP)などの登場により飛躍的に向上した。シクロスポリンの持続静注療法はステロイド不応性重症潰瘍性大腸炎に対して大腸全摘術を回避し、内科的緩解導入を可能にする有効な治療法であることが多くの報告により確立されつつある。その効果は投与後 3-4 日前後と比較的早期に出現すること、また内視鏡検査所見上は深掘れ潰瘍を有する症例で有効であるなどの特徴がある (Lichtiger S, et al, N Engl J Med. 1994)。早い効果発現と高い治療奏功率は、シクロスポリンの治療効果が活性化 T 細胞機能抑制効果のみならず腸管粘膜上皮細胞に対するバリア機能改善、粘膜修復効果の存在を示唆する。シクロスポリンの治療効果発現機序が UC の免疫異常の是正に強く関わっている可能性がある。従ってその作用機序解明により、UC そのものの病態の 1 つを明らかにできる可能性がある。

腸管粘膜上皮細胞のバリア機能という点で、UC 患者の活動期大腸粘膜において腸上皮細胞アポトーシスの増加が報告されている (Straer J, et al, Gastroenterol. 1997)。また、腸上皮細胞におけるアポトーシスの制御における STAT3 シグナルの関与が報告された (Xialoling J, et al, Gut, 2010)。さらに STAT3 は炎症性腸疾患(IBD)の全ゲノム相関解析で特定された感受性候補遺伝子の 1 つでもあり、STAT3 シグナルによる腸上皮アポトーシス制御異常が、UC の病態に密接に関与している可能性がある。

研究代表者は、これまでに炎症疾患動物実験腸炎モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルにおいてシクロスポリンが腸管粘膜局所での TGF- β シグナルの発現を高めることにより腸上皮細胞アポトーシスを介した粘膜障害を抑制することを明らかにしている (Biochem Biophys Res Commun 2007;359)。シクロスポリンが腸管粘膜局所での TGF- β シグナルを介し cFLIP の発現を高めることにより腸上皮細胞アポトーシスと次いで起こる粘膜障害を抑制することを明らかにした (Am J Physiol, 2009;297)。さらに、cFLIP はアポトーシスと同様にネクロトーシスの制御においてもキーとなる分子である。腸上皮細胞機能の破綻において、アポトーシスと並んでネクロトーシスによる腸上皮細胞死からくる炎症の誘導が IBD 患者の腸管粘膜障害に関与している可能性と、その経路での cFLIP による抑制効果を考え本研究の立案に至った。こういった解析結果をもとに今回の研究を進めた。

2. 研究の目的

これまでの研究を進展させ、シクロスポリンによる腸上皮細胞ネクロトーシス制御を介した効果の機序を明らかにすることを目的とした。シクロスポリンによる Smad/STAT3 シグナル調節による cFLIP を介した腸上皮細胞ネクロトーシスの制御と炎症誘導物質産生抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウス (C57BL/6) DSS 誘発腸炎モデルにおいてシクロスポリン投与による、分離した腸上皮のネクロトーシス調節分子 (RIPK1,3, MLKL, cFLIP, caspase-8,3) の発現と、ネクロトーシスからの炎症誘導メディエーター (HMGB-1, IL-33, ROS, cyclophilin) の発現について解析する。また、分離した腸上皮細胞から抽出した蛋白で、RAW 細胞を刺激しサイトカインの誘導能を解析する。
- (2) 抗 TGF- β 抗体投与下及び抗 IL-22 抗体投与下でシクロスポリン投与による、分離した腸上皮のネクロトーシス調節分子の発現解析を行う。
- (3) In vitro の腸上皮細胞培養 (Caco2, HT-29) システムで、シクロスポリン、IL-22、TGF- β による cFLIP を介したネクロトーシス関連発現調節の機序を解析する。それらの刺激下で TNF- α もしくは TRAIL+zVAD (caspase-8 inhibitor) によるネクロトーシス誘導上皮細胞から抽出した蛋白で THP-1 細胞を刺激しサイトカインの発現を解析する。

4. 研究成果

マウス (C57BL/6) に 4% DSS を自由飲水させた急性腸炎モデルにおいてシクロスポリン投与による、ネクロトーシス調節分子の発現の変化について経時的な解析を行った。DSS 投与 0,1,2 日目の分離した腸上皮から蛋白抽出を行いネクロトーシス調節分子 RIPK3, AMPK の発現をウェスタンブロットで解析した。DSS 投与 0,1,2 日目においてコントロール群とシクロスポリン投与群との間に有意な発現の差は認めなかった。一方、ネクロトーシスからの炎症誘導メディエーターである HMGB-1 の発現は、分離した腸上皮細胞分画においては、DSS 投与 0,1 日目でコントロールに比べてシクロスポリン投与群で有意に抑制されていた。粘膜下組織の分画では、DSS 投与 2 日目において、コントロールに比べてシクロスポリン投与群で有意に抑制されていた。ネクロトーシス調節因子である RIPK3, AMPK を介さない、MLKL 及び RIPK1 の発現抑制効果の存在が示唆された。RIPK3, AMPK 以外のネクロトーシス調節因子である MLKL 及び RIPK1 などを介した HMGB-1 の発現抑制効果、またはネクロトーシス調節因子そのものを介さずに炎症誘導物質の産生を抑制する可能性が考えられる結果が得られた。そのため、分離した上皮細胞の MLKL 及び RIPK1 の発現について解析したが、シクロスポリン投与による発現の抑制効果は認められなかった。DAMP molecule について HMGB-1 以外に HSP60, 70 の発現も検討したが、シク

ロスポリンによる発現の変化は認めなかった。

IL-33、IL-1 β についての追加解析を行ったが、そちらも優位な差は認めなかった。シクロスポリンによる腸上皮細胞のネクロトーシスの制御効果を示す結果が得られなかった。これまでの研究で報告してきたアポトーシス制御が主な作用機序であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawaguchi Shogo, Sakuraba Hirotake, Haga Toshihiro, Matsumiya Tomoh, Seya Kazuhiko, Endo Tetsu, Sawada Naoya, Iino Chikara, Kikuchi Hidezumi, Hiraga Hiroto, Fukuda Shinsaku, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 42
2. 論文標題 Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Positively Modulates TNF- α -Induced CXCL10 Expression in Cultured HuH-7 and HLE Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 2095 ~ 2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s10753-019-01073-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bamba Shigeki, Sakemi Ryosuke, Fujii Toshimitsu, Takeda Teruyuki, Fujioka Shin, Takenaka Kento, Kitamoto Hiroki, Umezawa Shotaro, Sakuraba Hirotake, et al	4. 巻 55
2. 論文標題 A nationwide, multi-center, retrospective study of symptomatic small bowel stricture in patients with Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 615 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00535-020-01670-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hisamatsu Tadakazu, DIAMOND2 Study Group	4. 巻 54
2. 論文標題 Withdrawal of thiopurines in Crohn's disease treated with scheduled adalimumab maintenance: a prospective randomised clinical trial (DIAMOND2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 860 ~ 870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00535-019-01582-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakuta Yoichi, for the MENDEL study group	4. 巻 53
2. 論文標題 NUDT15 codon 139 is the best pharmacogenetic marker for predicting thiopurine-induced severe adverse events in Japanese patients with inflammatory bowel disease: a multicenter study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1065 ~ 1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00535-018-1486-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akemoto Yui, Sakuraba Hirotake, Tanaka Masanori, Hiraga Hiroto, Kikuchi Hidezumi, Morohashi Satoko, Ota Shinji, Hasui Keisuke, Satake Miwa, Watanabe Rina, Tanaka Nahoko, Kawaguchi Shogo, Tatsuta Tetsuya, Sawaya Manabu, Chinda Daisuke, Mikami Tatsuya, Ishiguro Yoh, Kijima Hiroshi, Fukuda Shinsaku	4. 巻 12
2. 論文標題 Gastric Focal Neutrophil Infiltration and Wide Duodenal Gastric Foveolar Metaplasia Are Histologic Discriminative Markers for Crohn's Disease and Behçet's Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1159/000494922	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hirotake Sakuraba, Hiroto Hiraga, Shinsaku Fukuda
2. 発表標題 Treatment to targets of total mural healing assessed by endoscopy and MR-DWI avoids surgery in newly diagnosed Crohn's disease.
3. 学会等名 The 27th JDDW 2019 KOBE Nov. 21 International Session Symposium 2
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻庭裕丈、平賀寛人、福田眞作
2. 発表標題 高齢潰瘍性大腸炎症例の寛解維持療法
3. 学会等名 第22回日本高齢消化器病学会(神戸) シンポジウム2
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 櫻庭裕丈、福田眞作	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 497
3. 書名 消化器疾患最新の治療2019-2020 消化管全般にわたるもの「膠原病の消化器病変」	

1. 著者名 田中正則、明本由衣、櫻庭裕丈	4. 発行年 2019年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 237
3. 書名 腸管パーチエット病のすべてがわかる	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----