

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：34309

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15786

研究課題名(和文) S100A9トランスジェニックラットの樹立及びS100を介した免疫細胞制御機構

研究課題名(英文) Establishment of S100A9 transgenic rats to understand S100 proteins' immunological role

研究代表者

岡田 光貴 (OKADA, KOHKI)

京都橘大学・健康科学部・助教C

研究者番号：80747569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は当初、S100A9を全身に高発現するトランスジェニックラット(Tg-S100A9)を作製し、S100A9の免疫学的機能と潰瘍性大腸炎(UC)発症との因果関係を明らかにすることを目的としていた。しかし、Tg-S100A9の樹立に難航したため、UCにて生体内で特異的な変動を示す因子、即ちバイオマーカーの発掘を主軸とした研究に移行した。結果、UC患者およびUCモデルラットの生体内で有意に変動する因子を複数同定することが出来た。具体的に、UC患者の血清中S100A8/A9、補体C3、 α -2-マクログロブリンはIBDの病態把握マーカーとして優秀と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では平成29年12月より、UC患者の便中S100A8/A9測定が保険適応された。一方で、重症のUCでは激しい下痢と下血を伴い採便が困難である。大腸内視鏡は医師のみが実施可能な検査であり、時間とコストを要する。CRP測定などの血液検査も特異性に欠けるため、既存のUC検査法はいずれも弱点があると言わざるを得ない。本研究の成果は、これら種々の問題を解消する新たなUC検査法の構築に繋がる。具体的には、患者には大腸内視鏡の回数削減に繋がり、身体的・精神的負担の軽減に寄与する。また、UCの検査法が確立することは、医師および臨床検査技師の負担や医療過誤の削減にも貢献する。

研究成果の概要(英文)：The initial aim of this study was to establish transgenic rats with high expression of S100A9 on their whole body (Tg-S100A9), and to elucidate the relationship between the immunological function of S100A9 and the development of ulcerative colitis (UC). However, due to the difficulty in establishing Tg-S100A9, we shifted our research focus to the discovery of biomarkers for UC.

We found that serum S100A8/A9, complement C3, and α -2-macroglobulin were more sensitive biomarkers for UC than C-reactive protein (CRP), and their serum levels were novel indexes for the severity of UC. In addition, by animal experiment, we confirmed that circulating S100A8/A9, carbonic anhydrase, and transgelin also reflect the severity of UC. These findings would contribute to advance of laboratory medicine and medical examination for UC in the future. Our effort to scrutinize potentiality of serum biomarkers is in progress.

研究分野：病態検査学

キーワード：S100タンパク質 炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 マクロファージ バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

S100 タンパク質はリウマチ様関節炎患者の滑液中に見出され、主に骨髄系免疫細胞(好中球やマクロファージなど)で産生される Ca^{2+} 結合タンパク質である(Odink K et al., Nature 330; 80-82, 1987)。本タンパク質は関節リウマチや炎症性腸疾患など多くの自己免疫性疾患の炎症部位で検出され、炎症の制御に関わっている可能性が示唆されている(Kamada N et al., J Clin Invest 118; 2269-2280, 2008)。潰瘍性大腸炎(UC)やクローン病(CD)といった炎症性腸疾患(IBD)は腸の粘膜にびらんや潰瘍が生じる疾患であり、近年日本では若者を中心にその患者数が 20 万人を超えている。特に、UC は発症後 10 年以降に慢性化し大腸癌に移行するリスクの高い疾病であることが報告されている(Eaden JA et al., Gut 48; 526-535, 2001)。しかし、現在でもその根本的な治療法が確立されていないため、問題視されている。これまでに、研究代表者は硫酸化デキストラン(DSS)を用いて UC モデルラット(UCR)を作製し、UC の発症から悪化、寛解に至るまでの過程における大腸組織中マクロファージの挙動を追跡してきた。その結果、UC の発症から重症化に伴い直腸組織に S100A9 を優位に発現したマクロファージが多数浸潤する事実を発見した。

2. 研究の目的

以上で述べた背景は、S100A9 が UC の発症と重症化に深く関わっていることを強く示唆している。今後、S100 タンパク質の免疫学的機能を包括的に解明するためには、S100A9 免疫機能の本質を明らかにする必要がある。そのためには、S100A9 を全身に高発現する遺伝子組換えラット(Tg-S100A9)の樹立が必要と考えた。そこで、研究代表者は基礎研究として、Tg-S100A9 を作製し、S100A9 の免疫学的機能と UC 発症との因果関係を明らかにすることを目的とする。また、臨床研究として、IBD 患者の血清中における変動因子を精査、IBD に対する新たなバイオマーカーを創出することを目的とする。

3. 研究の方法

日本 SLC(株)との共同研究により Tg-S100A9(ファウンダーラット, F0)の作製を試みる。F0 作製後、SD ラットとの交配後に生まれた F1 ラットの耳部組織の一部を用いてジェノタイピングを実施し、目的遺伝子が体細胞もしくは生殖細胞に組み込まれているかどうかを確認する。確認後、同様に F1 ラットと SD ラットを交配させて生まれた F2 ラットについてもジェノタイピングを実施する。このようにして得られた F2 ラットを維持しながら、本研究に必要な匹数を研究計画に沿って維持・確保し、後の動物実験および細胞実験に供する。

また、IBD 患者の各検体(血液、尿、糞便希釈液、大腸組織の抽出液)を用いて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を実施し、健常人の各検体におけるタンパク質検出量と比較、差が認められた分画に対しては電気泳動法を実施し、タンパク質バンドとして視覚化する。その後、視覚的にも差が認められたバンドをゲルから切り出し、質量分析法により各バンドに含まれるタンパク質成分を同定する。同定したタンパク質(目的タンパク質)は IBD に対するバイオマーカーの候補として、大腸組織、血液、尿および糞便中の各群間における濃度を ELISA 等の手法で測定する。

4. 研究成果

Tg-S100A9 の樹立は叶わなかった。研究代表者はラット S100A9 に対する cDNA および全身発現用ベクター(pCXGGS)を保有していたため、これを活用してファウンダーラット(F0)の作製を試みたが、ラットの全身に S100A9 を高発現する結果とならなかったため、Tg-S100A9 の樹立は断念した。

一方、UC に対する新たなバイオマーカーの創出に関しては比較的順調に推移した。研究代表者はまず、IBD 患者の血清中変動因子として S100A8/A9 に注目し、その濃度を独自に構築した ELISA で測定した。結果、血清中 S100A8/A9 は IBD 患者で有意に増加しており(図 1, 左)、既存の炎症マーカーである C-reactive protein(CRP)と比較(図 1, 右)しても血清中濃度の上昇が明らかであった。さらに、各測定法の感度と特異度の評価に有用な Receiver Operatorating Characteristic curve (ROC 曲線)を作製したところ、測定性能の良好さを示す Area under curve(AUC)は血清中 S100A8/A9 で 0.877(図 2, 左)、CRP で 0.819(図 2, 右)と、前者の方がより優れた測定法と考えられた。一方で、UC の臨床的重症度を示す数値(DAI スコア)と血清中 S100A8/A9 との相関性を検証したところ、相関係数(R)は 0.342 であり、相関性に優れた結果とは言えなかった。以上の成果は、“Serum S100A8/A9 as a potentially sensitive biomarker for inflammatory bowel disease.”のタイトルで、国際雑誌

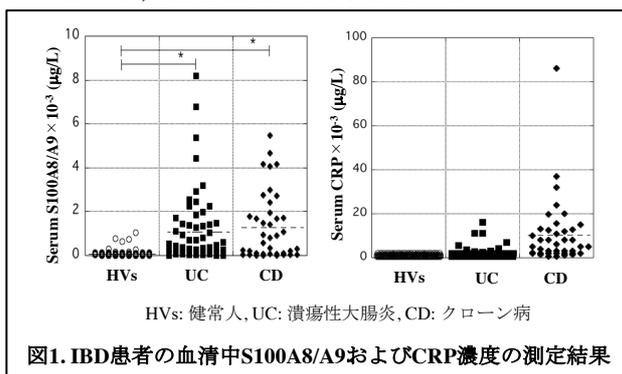


図1. IBD患者の血清中S100A8/A9およびCRP濃度の測定結果

Laboratory Medicine に掲載された (Okada K et al., Lab Med 50; 370-380, 2019)。

続いて、動物実験においても血清中 S100A8/A9 濃度の変動を詳細に追跡した。即ち、UCR の血清中 S100A8/A9 濃度の変動と、大腸組織における炎症の重症度(HIS スコア)との相関性を精査した。結果、血清中 S100A8/A9 濃度と HIS スコアとの R 値は 0.710 と、非常に良好な相関関係にあることが分かった。この成果は、

“Circulating S100A8/A9 is potentially a biomarker that could reflect the severity of experimental colitis in rats”のタイトルで、国際雑誌 Heliyon に掲載された (Okada K et al., Heliyon 6(2); e03470, 2020)。

さらに、研究代表者は、より UC に特異的な、S100 タンパク質とは異なる生体内変動因子の創出を試みた。IBD 患者の血清を用いて HPLC および電気泳動を実施したところ、健常人(HVs)の血清におけるタンパク質検出量と比較し、11 種類のタンパク質に差が認められた。その後、質量分析法により各タンパク質成分を同定したところ、補体 C3(c-C3)と α_2 -マクログロブリン(α_2 -MG)が特に注目された。即ち、血清中 c-C3 濃度は HVs に比べ、IBD 患者で有意に増加していた(図 3, 左)。一方、血清中 α_2 -MG 濃度は HVs に比べ、IBD 患者で有意に減少していた(図 3, 右)。さらに、UC の重症度を示す、DAI スコアと血清中 c-C3 および α_2 -MG との相関性の比較では、R 値がそれぞれ 0.581, 0.474 であった(図 4)。これは、先に述べた、DAI スコアと血清中 S100A8/A9 との相関性 (R=0.342)よりも高い値であり、C3 および α_2 -MG が IBD, 特に UC の病態把握に有用なバイオマーカーである可能性を強く示すものであった。この成果は、

“Serum complement C3 and α_2 -macroglobulin are potentially useful biomarkers for inflammatory bowel disease patients”のタイトルで、国際雑誌 Heliyon に掲載された (Okada K et al., Heliyon 7(3); e06554, 2021)。

以上、Tg-S100A9 の樹立は叶わなかったが、今後、研究代表者は異なるアプローチにより、S100 タンパク質の本質的な機能的役割の解析に挑む予定である。即ち、S100 タンパク質のアミノ酸配列を基調として独自に考案したりコンビナントタンパク質を作製し、これらのマクロファージに対する反応性を検証することによって S100 タンパク質の活性中心と詳細な機能的役割を解明する。また、UC に対する新たなバイオマーカーを創出に関しては、血清のみならず尿や便中といった生体試料も解析の対象とすることで総合的に検証し、より優れた病態把握マーカーの樹立を目指す。

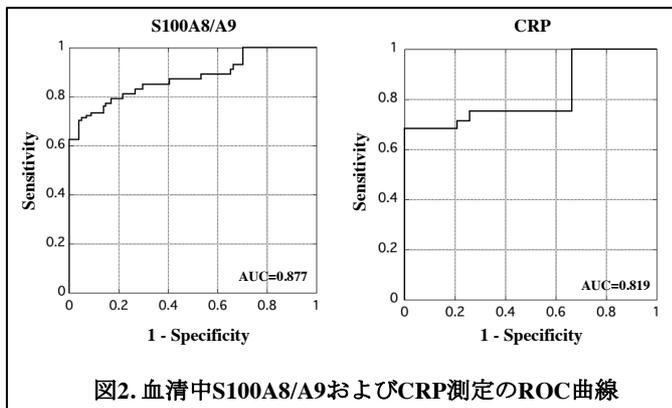


図2. 血清中S100A8/A9およびCRP測定のためのROC曲線

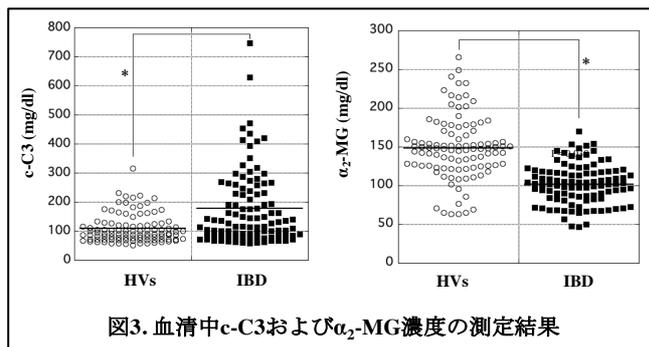


図3. 血清中c-C3および α_2 -MG濃度の測定結果

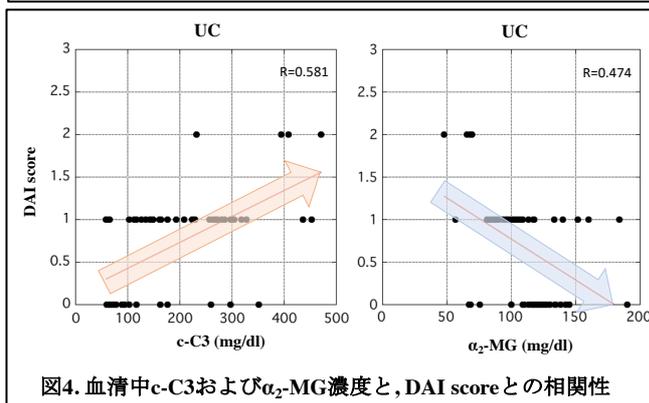


図4. 血清中c-C3および α_2 -MG濃度と、DAI scoreとの相関性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kohki Okada, Hiroshi Itoh, Masaki Ikemoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Circulating S100A8/A9 is potentially a biomarker that could reflect the severity of experimental colitis in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e03470	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 岡田 光貴	4. 巻 47
2. 論文標題 炎症性腸疾患における血清S100A8/A9のバイオマーカーとしての意義	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 148-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kohki Okada, Makoto Okabe, Yuto Kimura, Hiroshi Itoh, Masaki Ikemoto	4. 巻 未定
2. 論文標題 Serum S100A8/A9 as a Potentially Sensitive Biomarker for Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kohki Okada, Hiroshi Itoh, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi, Masaki Ikemoto	4. 巻 41(1)
2. 論文標題 Establishment of S100A8 Transgenic Rats to Understand Innate Property of S100A8 and Its Immunological Role.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 59-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-017-0664-8.	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 マクロファージ機能制御性タンパク質hMIK0-1の潰瘍性大腸炎に対する新しい治療薬としての可能性
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における大腸組織中細胞質性炭酸脱水酵素CA- の臨床的意義について
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎モデルラットの大腸組織において変動するタンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 遺伝子組換えタンパク質hMIK0-1の潰瘍性大腸炎抑制効果とその作用機構の解析
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohki Okada, Masaki Ikemoto
2. 発表標題 Serum complement C3 and 2-macroglobulin are useful biomarkers for inflammatory bowel disease
3. 学会等名 The 30th World Congress of World Association of Society of Pathology and Laboratory Medicine 2019 (WASPALM 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohki Okada, Masaki Ikemoto
2. 発表標題 Serum S100A8/A9 is a sensitive biomarker for inflammatory bowel disease: the change in its level represents the clinical severity in the patients
3. 学会等名 The 30th World Congress of World Association of Society of Pathology and Laboratory Medicine 2019 (WASPALM 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohki Okada, Masaki Ikemoto
2. 発表標題 Identification of Serum Proteins Changed in Patients with Inflammatory Bowel Disease by Mass Spectrometry and Their Potential as New Biomarkers
3. 学会等名 KAMT 2019 57th Congress and International Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田光貴, 伊藤洋志, 池本正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患患者の血清中S100A8/A9の測定意義について
3. 学会等名 第68回日本医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田光貴, 伊藤洋志, 池本正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患患者の血清中で変動するタンパク質の質量分析法による解析
3. 学会等名 第68回日本医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患における補体C3測定の臨床的意義
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 光貴, 伊藤 洋志, 池本 正生
2. 発表標題 遺伝子組み換えタンパク質によるマクロファージ機能の超制御機構とその臨床応用
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患における 2-マクログロブリン測定の臨床的意義
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 S100A8トランスジェニックラットの樹立とその免疫学的意義
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kohki Okada, Shunsuke Sekiya, Kohsuke Doi, Masaki Ikemoto
2. 発表標題 Serum S100A8/A9 is a sensitive biomarker for inflammatory bowel diseases
3. 学会等名 the 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都橘大学教員情報ページ https://kenkyu.tachibana-u.ac.jp/ktuhp/KgApp?kyoinId=ymbbyyyeggy</p>
--

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
研究協力者	池本 正生 (Ikemoto Masaki) (80144385)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・客員教授 (34204)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	伊藤 洋志 (Itoh Hiroshi) (20362387)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授 (34204)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関