

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15822

研究課題名(和文) CUL3ユビキチンリガーゼの接着分子輸送制御による新規腸管抗炎症治療法の検討

研究課題名(英文) Novel intestinal anti-inflammatory therapies by regulating adhesion molecule transport by the CUL3 ubiquitin ligase.

研究代表者

尾関 啓司 (ozeki, Keiji)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：70750610

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)：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)及びヒト白血病細胞株を用いて、それぞれCUL3遺伝子ノックダウン下のE-selection、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、MAdCAM-1、インテグリン各鎖、鎖のウェスタンブロット(WB)法によるタンパク質量変動解析、並びに蛍光免疫染色法による細胞内局在解析を行い、インテグリン鎖、鎖の発現量の低下を確認し、次にAlphaScreening法を用いて、責任BTBPの同定を試みたが、適切な標的蛋白を同定することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在本邦をはじめ潰瘍性大腸炎の患者は右肩上がりの増加を認めている。多くの新規のサイトカインや接着分子などリンパ球のトラフィッキングに関わる薬剤の新規開発が近年認められる。しかし、残念ながら今のところすべてを解決する治療法は確立されていない。今後も、既存治療効果を高め、更なる新規機序の薬剤開発の継続は必要だと考えられて今回の研究成果は今後の潰瘍性大腸炎の治療効果を高めていく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory bowel disease. We investigated whether regulating the Cullin-3 (CUL3) ubiquitin (Ub)E3 ligase protein complex, a membrane transport regulator of cell adhesion factors, could be a new therapeutic strategy for UC treatment by targeting intracellular membrane transport of cell adhesion factors in vascular endothelial cells and leukaemic cells. E-selection, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, MAdCAM-1 and integrin α - and β -chains under CUL3 gene knockdown in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human leukaemia cell lines, respectively, by Western blot (WB) method. Subcellular localisation analysis of integrin α - and β -chains by fluorescence immunostaining and protein level variation analysis using the Western blot (WB) method confirmed that the expression levels of integrin α - and β -chains were reduced, and then AlphaScreening was used to identify the responsible BTBP, but the appropriate target protein could not be identified.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 接着分子 インテグリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

【研究1】

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (UC) やクローン病 (CD) を代表とする炎症性腸疾患 (IBD) は原因不明慢性炎症性腸疾患であり炎症の制御が現治療の中心となる。腸管での炎症反応は、白血球細胞膜表面に発現している接着因子インテグリンと血管内皮細胞表面に発現する E-selection、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、MAdCAM-1 などの接着分子が結合して白血球の血管壁接着、そして消化管組織への浸潤・遊走が促進されることで増強される。よって、これらの白血球-血管内皮細胞の接着分子機構を標的とすることは IBD の治療戦略の一つになっている。しかし、47 インテグリンに対する vedolizumab 抗体は IBD 患者に有効で臨床応用されているが、抗体製剤は二次無効を起こす可能性がある。また、4 インテグリンに対する natalizumab 抗体は、有効性は得られたものの進行性多巣性白質脳症などの重篤な副作用が出現した。そこで、本研究では、申請者らが最近新たに見出した「細胞接着因子の膜輸送制御分子である Cullin-3 (CUL3) ユビキチン (Ub) E3 リガーゼタンパク質複合体を制御することが、血管内皮細胞および白血球細胞における細胞接着因子の細胞内膜輸送を標的にしに新たな IBD 治療の治療戦略になるのではないかと」を問い、本研究で解明したい。

2. 研究の目的

ユビキチン E3 リガーゼ複合体足場タンパク質 CUL3 はアダプター分子である BTB ドメイン含有タンパク質 (BTBP) を介して、基質タンパク質と複合体を形成し、基質タンパク質を Ub 化する。Ub 化された基質タンパク質は、分解や新規機能獲得または機能抑制などの制御を受ける。ヒトには 183 種類の BTBP が存在し、また各 BTBP が Ub 化する基質タンパク質も複数あると予想され、多種多様な CUL3/BTBP の生理機能が発揮される。申請者らは最近、CUL3 を血管内皮細胞において発現抑制すると、細胞の形態が円形になり、細胞伸展・遊走運動能を失うことを見出した。そこで、細胞接着因子に着目し、その発現・輸送状況を解析したところ、インテグリン 2、4、1、VE-カドヘリン、P-CAM といった接着因子のタンパク質発現または輸送が抑制されることを見出した。このことは、血管内皮細胞での E-selection、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、MAdCAM-1、白血球細胞でのインテグリン 鎖、鎖の発現・輸送を制御していることを強く示唆している。そこで、まず、CUL3 発現抑制下での血管内皮細胞と白血球細胞における上記接着因子の発現、細胞内局在の変化を解析する。変化を確認できた接着分子に関して、さらに 183 種類の BTBP に対する siRNA を用いてスクリーニングを行ない、それぞれの発現・輸送制御を担う BTBP を同定する。次に、ここで同定する CUL3/BTBP 複合体が標的とする基質タンパク質の探索・同定を、申請者らが独自に開発し、様々な基質スクリーニングに有用であることを実証しつつあるヒト・20000 タンパク質アレイ (20K アレイ) 及びフォーカスド・タンパク質アレイ (機能的グループごとにまとめたアレイ) を Alpha Screening 法 (タンパク質間相互作用解析法) に応用して行う。これと並行して、同定する基質タンパク質の Ub 化による機能制御を解明する。さらには、本研究で構築する当該 BTBP と標的基質との Alpha Screening 法を阻害剤探索に応用しシース化合物の創出を目指す。

3. 研究の方法

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 及びヒト白血球細胞株を用いて、それぞれ CUL3 遺伝子ノックダウン下での E-selection、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、MAdCAM-1、インテグリン各鎖、鎖のウェスタンブロット (WB) 法によるタンパク質量変動解析、並びに蛍光免疫染色法による細胞内局在解析を行い、変化が認められる接着因子を同定する。

UL3 はアダプター分子 BTBP を介して標的基質タンパク質に結合し、基質分子を Ub 化する。従って、CUL3 によって Ub 化を受ける基質タンパク質は BTBP と複合体を形成する分子である。ヒトには 183 種類の BTBP siRNA ライブラリーを構築し、これを用いて責任 BTBP の同定を行う。CUL3/BTBP 複合体が標的とする基質タンパク質の探索・同定は、申請者らが独自に開発し、様々な基質スクリーニングに有用であることを実証しつつあるヒト・20000 タンパク質アレイ (20K アレイ) 及びフォーカスド・タンパク質アレイ (機能的グループごとにまとめたアレイ) をハイスループットスクリーニング法である Alpha Screening 法 (タンパク質間相互作用解析法) に応用して行う。

4. 研究成果

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 及びヒト白血球細胞株を用いて、それぞれ CUL3 遺伝子ノックダウン下での E-selection、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、MAdCAM-1、インテグリン各鎖、鎖のウェスタンブロット (WB) 法によるタンパク質量変動解析、並びに蛍光免疫染色法による細胞内局在解析を行い、インテグリン 鎖、鎖の発現量の低下を確認した。次に Alpha Screening 法を用いて、責任 BTBP の同定を試みたが、適切な標的蛋白を同定することができなかった。今後、BTBP を介さない CUL3 遺伝子のコントロール機序について検討する予定である。

【研究2】

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (UC) は、下痢、下血、腹痛を主訴とする疾患群であり、近年患者数の増悪が問題になっている。既存の治療方法としては、メサラジン、コルチコステロイド、抗 TNF 抗体製剤や抗インテグリン製剤などの有用性が示されている。近年、汎 JAK 阻害剤としてトファシチニ

ブ及び、抗 IL12/23 抗体製剤としてウステキヌマブの既存治療抵抗性の中等症から重症の UC において有用性が第 相臨床試験で示されている。しかし、難治性 UC における、トファシチニブの 8 週時点での有効性は 16.6%と限定的です。同様に難治性 UC におけるウステキヌマブの 8 週時点での有効性は 15.5%と限定的です。

一方で、本邦で開発された顆粒球・単球除去治療(GMA)の有用性及び安全性が既存治療抵抗性の UC において報告されています。腸管免疫にかかわる炎症を引き起こす白血球成分を除去することで末梢血におけるサイトカイン発現の変化などを起こし効果を示すと考えられており、多くの UC 治療のなかで安全性が高い事が特徴となっている。軽症から中等症程度の UC には週に 2 回(計 10 回)施行する短期集中 GMA 加療の有用性が示されておりますが、依然として重症 UC に関するその治療効果には満足する結果が得られていません。

2. 研究の目的

難治性 UC に対して、トファシチニブ、ウステキヌマブ、GMA 治療はそれぞれ単独治療においてはプラセボ群に対して有意に治療効果が高いことが示されているが、中等症から重症 UC における、GMA とトファシチニブ及びウステキヌマブ併用治療の有用性及び安全性については、いまままで報告はされておられません。今回我々は、末梢血白血球の性質も変化させることができる GMA 加療と難治性 UC におけるトファシチニブ及びウステキヌマブにおける有効性をレトロスペクティブに検証することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

ウステキヌマブと GMA 加療についての検討は、2020 年 8 月から 2021 年 7 月までの期間に名古屋市立大学において難治性の中等症から重症 UC においてウステキヌマブと GMA 加療をうけた連続症例の 4 例について検討した。ステロイド依存性及び抵抗性 UC の内タクロリムスへの治療反応性が失われた症例(ベースラインの Mayo スコアが 6 から 12 点かつ内視鏡サブスコアが 2 から 3 点の症例)をエントリーした。主要評価項目は 10 週時点での寛解率とし、副次項目として内視鏡的改善率(内視鏡サブスコア 1 以下の率)及び CRP 値の改善率を評価した。また、治療中の有害事象についても評価した。

また、2018 年 12 月から 2019 年 11 月までの期間に名古屋市立大学及び関連施設において難治性の中等症から重症 UC においてトファシチニブと GMA 加療をうけた連続 7 例について検討した。ステロイド依存性及び抵抗性 UC の内抗 TNF 抗体製剤への治療反応性が失われた症例(ベースラインの Mayo スコアが 6 から 12 点かつ内視鏡サブスコアが 2 から 3 点の症例)をエントリーした。トファシチニブ投与方法は全例 1 日 20mg の 8 週間投与後に 1 日 10mg に全例減量投与とした。主要評価項目は 10 週時点での寛解率とし、副次項目として臨床的奏効率及び粘膜治癒率(内視鏡サブスコア 1 以下)を評価した。また、治療中の有害事象についても評価した。

本試験はすべてヘルシンキ宣言に準じて施行されて、オプトアウトの形で同意は得られた。

4. 研究成果

ウステキヌマブと GMA 併用治療群においては、10 週目の臨床的寛解率は 50%を示した。ベースライン時の Mayo スコア平均値 11.0 ± 0.41 点から 10 週目の Mayo スコアの平均値は 2.0 ± 0.41 点へと低下傾向 ($P = 0.066$) を示した。同様に、内視鏡サブスコアは、ベースライン時の平均値 2.75 ± 0.25 点から 10 週目に 1.5 ± 0.29 点へと低下傾向 ($P = 0.059$) を示した。最後に、ベースライン CRP 値平均 $1.70 \pm 0.89\text{mg/dL}$ から 10 週目の CRP 値平均 $0.08 \pm 0.03\text{mg/dL}$ と改善傾向 ($P = 0.068$) を示した。ウステキヌマブと GMA の併用治療は Mayo スコア、内視鏡サブスコア、CRP にて改善傾向を示し、10 週目の良好な臨床的寛解率を示し全例でステロイド離脱が可能であった。また、いずれの症例においても治療期間中に有害事象は認めなかった。

トファシチニブと GMA 併用治療群においては、10 週目の臨床的寛解率は 71.4%を示した。ベースライン時の Mayo スコア平均値 8.71 ± 0.80 点から 10 週目の Mayo スコアの平均値は 1.57 ± 0.48 点へと有意 ($P < 0.01$) に低下した。同様に、内視鏡サブスコアは、ベースライン時の平均値 2.4 ± 0.2 点から 10 週目に 0.6 ± 0.2 点へと有意 ($P < 0.01$) に低下した。最後に、ベースライン CRP 値平均 $0.71 \pm 0.49\text{mg/dL}$ から 10 週目の CRP 値平均 $0.02 \pm 0.005\text{mg/dL}$ と改善傾向 ($P = 0.20$) を示した。トファシチニブと GMA の併用治療は Mayo スコア、内視鏡サブスコアでは有意に、CRP は改善傾向を示し、10 週目の良好な臨床的寛解率を示し全例でステロイド離脱が可能であった。期間中の有害事象は、口唇ヘルペス、一過性 CK 上昇、TG 上昇でありいずれも保存的加療で対応可能であった。

GMA は、白血球のうち骨髄系を活性化させ除去するために、骨髄系白血球と TNF- から放出されるインターロイキン (IL) -1、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインを抑制することができます。また、活動性 UC 患者において、IL-1 によって活性化された内皮細胞への好中球の接着と白血球接着分子 Lselectin の減少が観察されており、GMA を併用することにより、ウステキヌマブやトファシチニブなどの腸管局所のサイトカイン低下作用が増強されて良好な寛解率に至っている可能性がある。本研究は単アームのレトロスペクティブの検討であり、上記の結果をより確実なものとするにはより多数の症例における前向き RCT での評価が必要になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tanida S, Ozeki K, Kanno T, Katano T, Sugimura N, Nishie H, Iwasaki H, Tanaka M, Shimura T, Kubota E, Kataoka H.	4. 巻 Nov;13(10-11)
2. 論文標題 Combination Therapy With Ustekinumab Plus Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis in Patients With Refractory Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med Res	6. 最初と最後の頁 510-514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/jocmr4625	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 Okuda Y, Shimura T, Iwasaki H, Katano T, Kitagawa M, Nishigaki R, Fukusada S, Natsume M, Tanaka M, Nishie H, Ozeki K, Yamada T, Kataoka H.	4. 巻 102(4)
2. 論文標題 Serum Exosomal Dicer Is a Useful Biomarker for Early Detection of Differentiated Gastric Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 640-649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000510993	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 Tanida S, Ozeki K, Mizoshita T, Kitagawa M, Ozeki T, Tanaka M, Nishie H, Shimura T, Kubota E, Kataoka H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Combination Therapy With Tofacitinib Plus Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis as Induction Therapy for Refractory Ulcerative Colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med Res. 2020	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/jocmr4037	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 Shimura T, Iwasaki H, Kitagawa M, Ebi M, Yamada T, Yamada T, Katano T, Nisie H, Okamoto Y, Ozeki K, Mizoshita T, Kataoka H.	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 Urinary Cysteine-Rich Protein 61 and Trefoil Factor 3 as Diagnostic Biomarkers for Colorectal Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 539-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2018.12.006. Epub 2019 Jan 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 Tanida S, Ozeki K, Mizoshita T, Kitagawa M, Ozeki T, Tanaka M, Nishie H, Shimura T, Kubota E, Kataoka H.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Combination Therapy With Tofacitinib Plus Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis as Induction Therapy for Refractory Ulcerative Colitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med Res.	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/jocmr4037	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 Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Katano T, Tanaka M, Nishie H, Shimura T, Okamoto Y, Kubota E, Kataoka H, Joh T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Combination Therapy With Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis Plus Ustekinumab in Patients With Refractory Crohn's Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ther Apher Dial.	6. 最初と最後の頁 295-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12697.	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 Shimura T, Iwasaki H, Kitagawa M, Ebi M, Yamada T, Yamada T, Katano T, Nisie H, Okamoto Y, Ozeki K, Mizoshita T, Kataoka H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Urinary Cysteine-Rich Protein 61 and Trefoil Factor 3 as Diagnostic Biomarkers for Colorectal Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 539-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2018.12.006	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------