

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16336

研究課題名(和文)炎症性腸疾患活動性関連因子に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Studies on activative factors of inflammatory bowel diseases

研究代表者

吉田 雅(Yoshida, Tadashi)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：70772333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症性腸疾患(IBD)患者の腸管粘膜における細血管増生と血管内皮細胞機能の亢進と炎症との関連について明らかにすることを目的とした。中でも、特にヒト大腸組織中の血管新生阻害物質であるThrombospondin-1(TSP-1)、血管新生物質であるCD31発現と炎症との関連に新規性を求めた。CD31は、免疫染色にて対照群(大腸癌患者正常粘膜)に対して潰瘍性大腸炎患者(UC)大腸粘膜での発現の上昇を認めた。一方で、TSP-1は免疫染色ではUC患者大腸粘膜においての発現を認めなかった。PCR検査を追加したが、TSP-1はUC患者大腸粘膜での有意な発現は認められず関連は不明であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患は、その成因が解明されておらず、根治的な治療法は大腸全摘以外には確立されていない。大腸全摘は患者QOLを著しく低下させる治療法であり、可能な限り薬物療法での治癒や長期寛解維持が望ましい。本研究では、血管新生阻害物質であるTSP-1に着目し、その発現と患者重症度との関連が見出せれば望ましかったが、残念ながらその関連はタンパクレベルでは判断が困難であった。一方で、mRNAレベルでは、TSP-1の発現度と疾患重症度には関連が認められなかった。一方で、血管新生物質であるCD31と炎症度との相関は認められ、今後の炎症性腸疾患治療における新規ターゲット因子になりうる可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the relationship between the degree of inflammation and angiogenesis in the inflammation bowel disease. The expression of the angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1 (TSP-1), in the colorectal mucosa of the ulcerative colitis patient is the main theme of this study. However, the TSP-1 was not detected in the immunohistological staining. Moreover, the mRNA expression of TSP-1 in the UC patients was not significantly different compared with control. In contrast, the expression of the one of the platelet endothelial cell adhesion molecule, CD31, was related to the degree of mucosa inflammation in the UC patients.

研究分野：大腸外科学

キーワード：炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(Ulcerative colitis),クローン病(Crohn's disease)に代表される炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease)の本邦における罹患率,有病率は最近20年間でUCは5~6倍,CDは約10倍と増加傾向にある。免疫抑制剤,ステロイド,抗TNF抗体などの薬物治療によって治療成績は向上しているが,根治的治療法は確立されていない。IBDの病因・病態は腸管における免疫異常,遺伝因子,環境因子,食餌因子,腸内細菌叢の構成異常などの関与が報告されているが,完全には解明されていない。そこで本研究では,IBDの炎症持続状態において産生される血管新生因子に焦点をあて,特に内因性の血管新生阻害物質であるThrombospondin-1(TSP-1)に注目した。ヒト大腸組織・血清中のTSP-1,他の炎症性サイトカインの発現と炎症の関連性について検討し,更には,マウスモデルを用いてTSP-1を標的とした血管因子阻害作用によって,新規IBD抗炎症治療の確立に応用できるためのエビデンス取得を目的とする。

2. 研究の目的

炎症により損傷された大腸組織中では活性化された血管内皮が直接炎症細胞浸潤やサイトカイン産生を調整しており,炎症性腸疾患患者の腸管組織中や末梢血中ではvascular endothelial growth factor(VEGF)やhypoxia-inducible factor-1(HIF-1)などのproangiogenic factorsの高発現が見られる(1)。また,CD31はUCにおける血管新生に関与していると報告される。その為,抗血管新生作用を持つ物質が炎症性腸疾患に対する新しい治療手段になる可能性が示唆される。TSP-1は内因性の血管新生阻害物質で,活性化された血小板・単球・マクロファージや種々の上皮細胞から分泌され,CD36分子を介して内皮細胞の接着,遊走,増殖を阻害し,また内皮のapoptosisを引き起こす。炎症性腸疾患患者においては,組織中のTGF- β は増加しているもののTSP-1が低下している為にTGF- β の受容体結合能が低下し炎症抑制,組織修復の機序が働かず慢性炎症が持続すると考えられる。この結果,負の循環に陥り,大腸癌の発癌に寄与すると考えられている。TSP-1様物質の投与によって,このような負の循環を断ち切り,血管新生や炎症反応が抑制され,抗炎症作用を発揮することが可能であるかどうかを検証したい。

3. 研究の方法

北海道大学病院消化器外科(旧:消化器外科・一般外科)にてUC,CD,または大腸癌に対する手術を受けた患者の大腸組織を使用した。保存方法は,(a)OCTコンパウンド内にて,-80にて保管,(b)ホルマリン内にて保管の2種類である。免疫組織学染色の条件設定を行う。UC患者においては,炎症細胞浸潤の高度・程度な部位に分けて検討し,また大腸癌症例の大腸組織の癌部,非癌部を対照群(control)として比較検討を行った。

(1)免疫染色

HE染色にて消化器外科医1名,病理医1名による炎症細胞浸潤の程度を評価して,炎症度高値,低値を把握の上,TSP-1,CD31の染色条件設定を行った。

(2)TSP-1については,q-PCRを追加して行い,mRNAレベルでの発現を検討した。

Primerは以下の通り設定した,TSP-1:F CCCAAAATGACCCTAACTGG,TPS-1:R

TGATGAAGAAGGTGCCACTG.

4. 研究成果

(1) TSP-1 の免疫組織学検討においては、positive control を置き、TSP-1 抗体の染色性を確認した。その後、UC 患者、対照群大腸組織を染色したが、発現が殆ど認められなかった(図1)。その為、q-PCR を行い、mRNA レベルでの発現を preliminary study として行ったが、一定の相関は認められず、発現量も微量であった(図2)。当初は、OCT コンパウンドで液体窒素内に凍結保存した検体を用いて行っており、検体保存の quality control に問題がある可能性も考慮した。その為、ホルマリン保存されたパラフィンブロックの検体を用いて別途検討を行ったが、いずれも染色がほとんど認められなかった。また、複数の抗体 (A6.1: sc-59887) (A6.1: LS-C87484)を用いて検討を行ったが、結果は同様であった。

TSP-1 の大腸組織における発現が免疫染色では明らかにならなかった為、追加で q-PCR を施行した。UC 炎症高度部位、UC 炎症低度部位、大腸癌、正常部の 4 群 (各群 n=11) に分類した。大腸癌組織において、TSP-1 発現がやや高値になる傾向があったものの、UC 組織においては対照群と比較して有意な変化は認められず、炎症の程度によっても発現量に変化は認められなかった(図3)。以上の結果より、免疫染色、q-PCR のいずれにおいても UC の大腸組織中の TSP-1 発現は変化が認められず、UC の炎症低度との相関は認められないと判断した。

図1

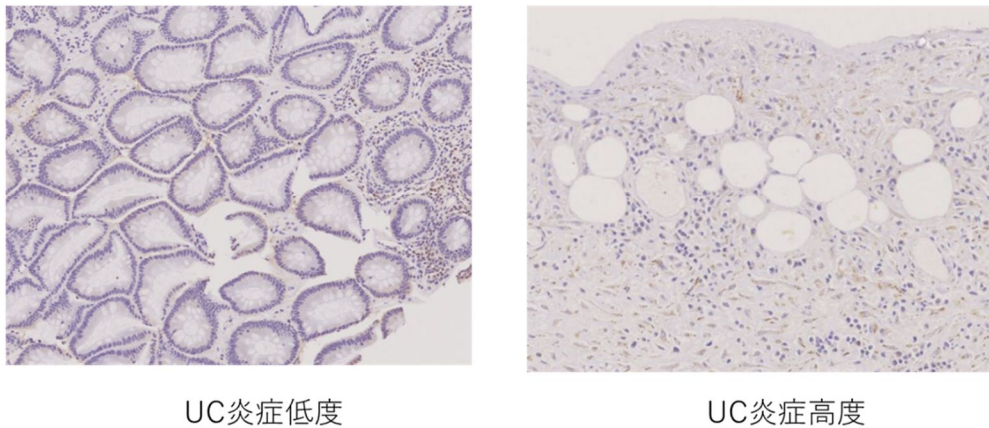


図2

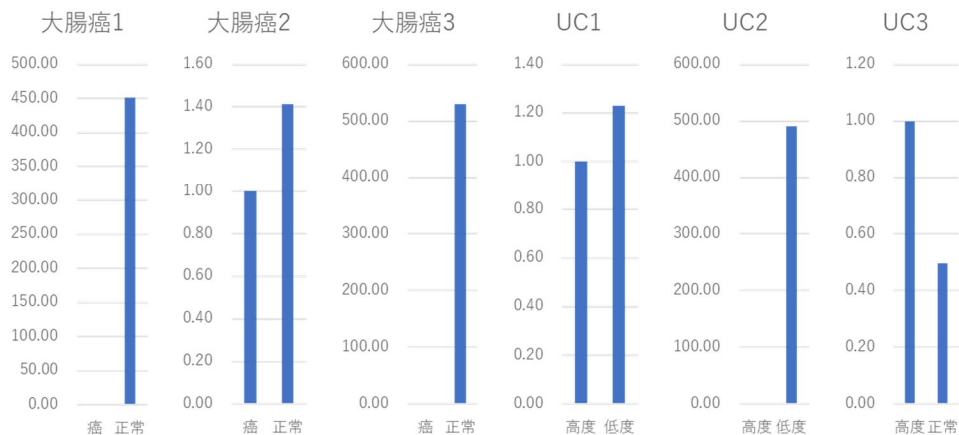
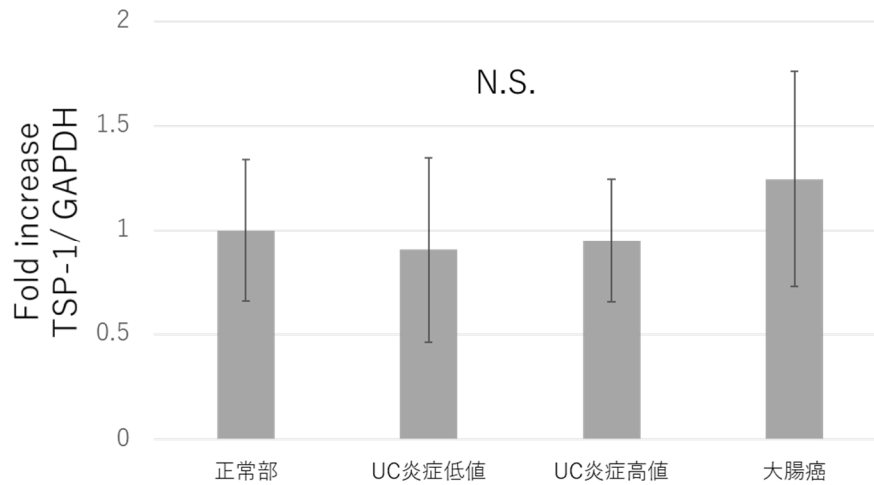
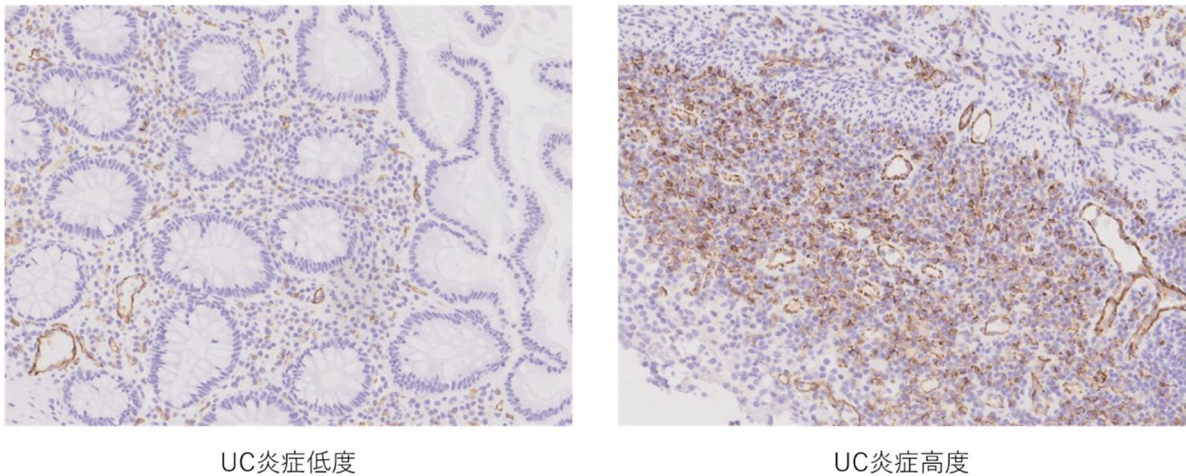


図3



- (2) 血清中 TSP-1 mRNA については、q-PCR にて検出が困難であった。
- (3) 血管新生物質である CD31 は免疫組織学染色において、UC の炎症度に応じて発現度が上昇する事が認められた (図4)。

図4



本研究において、最も着目した TSP-1 については、残念ながら UC の炎症度とは相関が認められないということが判明した。既報によれば、IBD において炎症が惹起されるトリガーとして血管新生物質やその抑制物質が重要であると推察されるが、TSP-1 がその中心的な役割を果たす可能性は低く、他のメディエーターやカスケードを介した炎症の原因を見出すことが、今後の治療法開発において重要と考えられる。

参考文献

1. Inflamm Bowel Dis 2004; 10, 573-577

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 吉田雅、本間重紀、市川伸樹、江本慎、宮岡陽一、松井博紀、武富紹信
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎合併colitic cancerに対する腹腔鏡下大腸全摘術
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 雅、本間 重紀、市川 伸樹、藤好 直、柴田 賢吾、松井 博紀、桂田 武彦、桜井 健介、福島 新弥、青山 慶哉、坂本 直哉、武富 紹信
2. 発表標題 当院における潰瘍性大腸炎に対する手術成績
3. 学会等名 第131回日本消化器病学会北海道地方会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------