

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08371

研究課題名（和文）炎症性腸疾患の新規バイオマーカーLRGの実臨床への応用

研究課題名（英文）Application of a new biomarker LRG to real-world clinical practice of inflammatory bowel disease

研究代表者

藤本 穰（FUJIMOTO, MINORU）

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00379190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々の実用化研究シードLRGは、CRPにかわる炎症性腸疾患（IBD）の活動性マーカーとして期待される。本研究ではIBD病態におけるLRGの発現調節機序を調べた。急性期応答を担う肝細胞と病変部のLRG産生細胞（腸上皮細胞、単球系細胞、好中球）の細胞株では、炎症性サイトカイン下流の転写因子STAT3とNF- κ Bの両者がLRG産生誘導に重要であることを見出した。一方、好中球系細胞株では、分化・成熟課程でサイトカイン非依存的LRG発現が生じると考えられた。次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析では、NF- κ Bに代表される免疫シグナルがヒトIBD組織で亢進し病変部のLRG産生を促すと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、サイトカイン下流の転写因子の中で炎症形成に特に重要なSTAT3とNF- κ Bが、肝細胞や病変部位の細胞でLRG発現を直接制御すること、それとは別の機序が好中球のLRG産生を促すことを明らかにした。一方、既存マーカーCRPは、IL-6が肝細胞にてSTAT3を活性化するという単一的機序で発現が誘導される。以上から、CRPよりもさらに幅広い病態でLRGが上昇すること、自然免疫系シグナルの亢進がみられるIBD粘膜の病態は、CRPよりもLRGによく反映されること、が強く示唆され、IBD診療におけるLRG測定の優位性とその理論的根拠が示された。

研究成果の概要（英文）：LRG, one of our research seeds, has become a laboratory test to evaluate disease activity of inflammatory bowel disease (IBD). In this study, we investigated the regulatory mechanism of LRG expression in IBD. By using cell lines derived from hepatocytes and intestinal LRG-producing cells (intestinal epithelial cells, monocytes, neutrophils), we found that STAT3 and NF- κ B, the major transcription factors of inflammatory cytokines, are the key inducers of LRG production in many cell types including hepatocytes. On the other hand, in neutrophils, LRG expression was induced cytokine-independently during their differentiation and maturation process. Gene expression analysis using a next-generation sequencer revealed that immune signals represented by NF- κ B are enhanced in human IBD tissues, which likely promotes LRG production in gastrointestinal lesions.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：バイオマーカー サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

既存の炎症マーカーCRPの発現誘導にはサイトカインIL-6産生と肝細胞での急性期応答の両者が不可欠であり、一部の免疫疾患の病態および病勢はCRPの値に反映されないことがある。研究代表者らのグループの研究シーズであるマーカーLRGは、炎症性腸疾患(IBD)の活動性評価においてCRPよりも感度に優れ、内視鏡による評価との相関性も高い。この結果LRGは、研究開始前年の2018年にIBD初の血清活動性バイオマーカーとして製造販売承認を取得するに至った。しかし、IBDの活動性をLRGがどのような機序で反映するのか、CRP発現の機序とは何が異なるのか、病態生理学的には不明な点が多かった。その後、LRGの発現誘導に複数のサイトカインが関与し、肝臓にて急性期蛋白と同様の発現誘導がみられ、炎症部位にて多くの細胞がLRGを産生することが明らかになってきており、LRGの特性に関する理解が深まりつつある。

近年、サイトカイン等の分子を標的とする抗体医薬品や分子標的薬などの実用化が進み、IBD治療薬についても大幅に選択肢が増えてきている。LRG産生メカニズムの詳細を解明することは、マーカーLRG上昇がIBDのこういった病態(たとえばサイトカインバランスの異常など)を反映するのかを理解することにつながり、マーカーLRGをより有効に診療で活用する上で重要な情報となる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、IBD関連サイトカインに着目し、それらの刺激にLRG産生細胞がどう応答するかを調べてLRGの発現制御機構を解明し、IBD病態とLRGの関係をより明確にすることを目指した。

また、ヒトIBDを対象として臨床研究プロトコールを作成し、大腸内視鏡を実施される患者より病変部検体の収集を行い、IBDの病態に関わる遺伝子発現の解析を行った。

3. 研究の方法

IBDの病態においてLRG産生に関わる細胞のモデルとして、肝細胞系細胞株、腸上皮系細胞株、単球系細胞株、骨髄球系細胞株の各種細胞株を用意し、サイトカイン等の刺激を行いLRG発現の比較定量を実施した。またこれら細胞株を利用し、LRGプロモーターの制御機構の解明をデュアルルシフェラーゼアッセイにより行った。さらに変異LRGプロモーターを作製して、STATおよびNF κ Bの結合予測配列の重要性を明らかにした。また、siRNAを用いてSTATやNF κ B等の転写因子のノックダウンを行い、LRG発現誘導実験およびプロモーターアッセイの結果の検証を実施した。臨床研究においては、インフォームド・コンセントに基づきIBD患者より大腸粘膜生検検体の提供を受け、検体よりmRNAを抽出して、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を実施した。

4. 研究成果

IBDモデルマウス(DSS腸炎マウス)の大腸を免疫組織化学染色で評価すると、炎症部位の腸上皮細胞および浸潤する免疫系細胞において強いLRG発現を認めた。そこで*in vitro*において、いくつかの細胞株(肝細胞系細胞株、腸上皮系細胞株、単球系細胞株、骨髄球系細胞株)のLRG産生をチェックして、サイトカイン等の刺激前後のLRG産生をWestern Blot、ELISA、Real-time PCRにて調べた。その結果、細胞の系統によりLRG産生を強く増強するサイトカインの種類が異なることが明らかになった。

さらに、細胞へのトランスフェクション手法を確立し、siRNAによるノックダウンやデュアルルシフェラーゼアッセイによるプロモーター解析によって検証を進めた。肝細胞系、腸上皮系、単球系、好中球系の各細胞株に対し、siRNAにより転写因子STAT3やNF κ Bをノックダウンした上で、炎症性サイトカインであるIL-1、IL-6、TNF α 等で刺激を行い、LRGの発現誘導を調べた。STAT3ノックダウンでは、JAK-STAT系サイトカインであるIL-6によるLRG遺伝子発現が著明に減少し、NF κ Bのノックダウンでは、IL-1やTNF α によるLRG発現が著明に低下した。LRG発現制御機構の詳細な解析のため、デュアルルシフェラーゼアッセイによるプロモーター解析を行った。レポータープラスミド(ルシフェラーゼ遺伝子上流にLRGプロモーターを挿入)を各細胞株にトランスフェクトし、炎症性サイトカイン刺激を行うと、多くの細胞株でルシフェラーゼ活性が上昇した。プラスミド内のLRGプロモーター配列のうち、STAT分子の結合が予測される配列2箇所を除去したところIL-6への応答はほぼ消失し、NF κ B分子の結合予測配列1箇所を除去するとIL-1やTNF α への応答が失われ、上記3箇所すべてを除去すると炎症性サイトカインによるルシフェラーゼ活性上昇がほぼ失われた。つまりLRGの発現上昇においては、STAT3やNF κ Bといった転写因子がLRGプロモーターに直接結合して転写調節を行うことが示唆された。また、細胞株同士の比較から、STAT3に強く依存する細胞株と、NF κ Bに依存する細胞株があることが判明した。さらに、好中球系細胞株については、サイトカイン刺激に対する挙動が他の細胞株とはまったく異なり、STAT3にもNF κ Bにも依存しない経路の存在が示唆された。

以上より、多くの細胞において、STAT3 や NF- κ B といった炎症病態に極めて重要な両転写因子が LRG 産生に関わること、さらに、細胞の種類によって中心となる LRG 産生シグナル伝達経路に違いがあることが示唆された。その成果の一部について、英文雑誌に公表した (PLoS One. 2020 Nov 19;15(11):e0242076.)。

ヒト IBD を対象とする臨床研究においては、機関承認を得た臨床研究プロトコルに従い、下部消化管内視鏡検査を受けた IBD 患者の検体集積を前向きに行った。集積した腸粘膜生検検体より mRNA 抽出を行い、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Genome Enhancer によるデータ分析を実施したところ、炎症部位の腸粘膜では STAT3 を含む JAK-STAT 経路、NF- κ B 経路、抗原レセプター (T/B 細胞受容体) シグナル伝達経路といったパスウェイが非炎症部位よりも亢進していることが示された(図)。また、IBD 粘膜病変での遺伝子発現亢進に参与する転写因子をリストアップさせたところ、Jun や RelA といった分子が特に上位に抽出されたことから、IBD の病変部位における自然免疫系シグナルの重要性が示唆された。以上の結果より、STAT3 のみならず NF- κ B に応答して発現が上昇する LRG は、IBD 粘膜における炎症病態を把握する上で、非常に好適な機序を有していることが明らかになった。

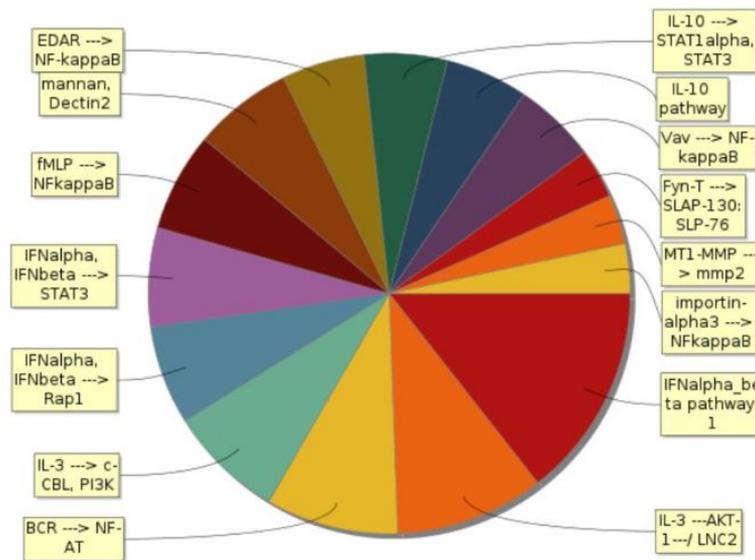


図 発現上昇を認める遺伝子のパスウェイ (ヒトIBD 炎症部位 vs 非炎症部位)

今回の研究により、多くの細胞種の LRG の発現誘導には、STAT3 と NF- κ B の 2 系統の転写因子がともに関与していることが明らかになった。また、好中球の LRG 産生には、STAT3 と NF- κ B に依存しない、全く別の機序が重要であることが示され、好中球の分化成熟過程におけるシグナルが重要であると考えられた。さらに IBD の粘膜病変では NF- κ B や Jun といった自然免疫系シグナルのパスウェイが特に亢進しており、病変部位における LRG 産生に NF- κ B のシグナルが大きく寄与することが示唆された。これらの LRG の特性は、CRP の発現機序とは全く異なるものであり、IBD 粘膜の病態評価における LRG の優位性を支持する結果であった。今回の検討から示された LRG の特性を考慮すると、他の血清学的マーカーと LRG とを同時測定し、いずれのマーカーが優位に上昇するのかを詳細に分析すれば、炎症部位におけるサイトカイン環境や免疫細胞の挙動を推測し、背景となる病態を切り分けることが可能になるかもしれない。今後の課題としてさらに検討を続けたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kajimoto Etsuko, Endo Masayuki, Fujimoto Minoru, Matsuzaki Shinya, Fujii Makoto, Yagi Kazunobu, Kakigano Aiko, Mimura Kazuya, Tomimatsu Takuji, Serada Satoshi, Takeuchi Makoto, Yoshino Kiyoshi, Ueda Yutaka, Kimura Tadashi, Naka Tetsuji	4. 巻 15
2. 論文標題 Evaluation of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a biomarker of fetal infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0242076	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 Fujimoto Minoru, Matsumoto Tomoshige, Serada Satoshi, Tsujimura Yusuke, Hashimoto Shoji, Yasutomi Yasuhiro, Naka Tetsuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Leucine-rich alpha 2 glycoprotein is a new marker for active disease of tuberculosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60450-3	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 伊藤 いづみ, 藤本 穰, 仲 哲治	4. 巻 135
2. 論文標題 血液検査による炎症性腸疾患(IBD)の疾患活動性の測定 ロイシンリッチ 2グリコプロテイン(LRG)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床栄養	6. 最初と最後の頁 748-750
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 無
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 藤本 穰, 仲 哲治	4. 巻 270
2. 論文標題 採血で知る炎症性腸疾患の活動性 新規血清マーカーLRG	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1215-1216
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 無
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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野将規, 藤本穰, 一森俊樹, 沖裕昌, 久原太助, 出間智行, 荒井紀光, 徳弘慎治, 横山彰仁, 仲哲治
2. 発表標題 ロイシンリッチ 2グリコプロテイン (LRG) 測定試薬「ナノピアLRG」の分析性能および臨床的有用性の評価
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳弘慎治, 亀山智代, 藤本穰, 一森俊樹, 沖裕昌, 久原太助, 山中茂雄, 上岡樹生, 荒井紀光, 横山彰仁, 仲哲治
2. 発表標題 ロイシンリッチ 2グリコプロテイン(LRG)測定キット「ナノピアLRG」の分析性能及び臨床性能の評価
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会第51回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本 穰
2. 発表標題 IL-6阻害薬とバイオマーカー
3. 学会等名 第34回日本臨床リウマチ学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲哲治, 藤本穰, 世良田聡
2. 発表標題 関節リウマチおよび炎症性疾患におけるLRGの意義
3. 学会等名 第71回日本皮膚科学会西部支部学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	一森 俊樹 (Ichimori Toshiki)		
研究協力者	沖 裕昌 (Oki Yusuke)		

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