

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16957

研究課題名（和文）CD4T細胞の代謝制御を標的にした炎症性腸疾患新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic agent for inflammatory bowel disease targeting the regulation of CD4 T cell metabolism

研究代表者

高原 政宏（Takahara, Masahiro）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80738427

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）：糖尿病治療薬であるメトホルミンは、エネルギーの調節因子であるAMPKの活性化を介してT細胞をはじめとする免疫細胞の免疫応答に関わっていることが報告されており、作用機序の一つとして注目されている。本研究では、慢性腸炎マウスモデルを用いて、大腸炎粘膜のCD4+T細胞におけるメトホルミンの抗炎症作用とその機序についての検証を、AMPKの活性化に焦点をあて検討した。

メトホルミンは、慢性腸炎マウスモデルの腸炎を抑制した。その作用機序の一つとしてミトコンドリアの酸化リン酸化、アデノシン三リン酸の産生の抑制によるAMPKの活性化を介した機序が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はCD4+ T細胞特異的大腸炎を誘発する炎症性腸疾患（IBD）モデルマウスを用いて、メトホルミンによる腸管粘膜CD4+T細胞のAMPK活性化が、腸炎の改善につながることを新たに示した。本研究は、腸管粘膜のCD4+T細胞のエネルギー代謝の抑制機序についての新たな知見を提供するものであり、IBDの治療法の開発に安全で有用な新しい治療標的を導く可能性があること、また、メトホルミンをはじめとしたエネルギー代謝を改善する薬剤は、IBDの新しい治療薬として可能性があることを示唆する結果であった。

研究成果の概要（英文）：Metformin, a diabetes drug, has been reported to be involved in the immune response of T cells and other immune cells via activation of AMPK, a regulator of energy, and has attracted attention as a possible mechanism of action. In the present study, the anti-inflammatory action of Metformin on CD4+ T cells of the colitis mucosa and its mechanism were examined using a mouse model of chronic colitis, focusing on AMPK activation.

Metformin suppressed the intestinal inflammation in a mouse model of chronic intestinal inflammation. One of the mechanism was suggested to be via activation of AMPK by suppressing mitochondrial oxidative phosphorylation and adenosine triphosphate production.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 腸管粘膜CD4T+細胞 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease; IBD) は慢性的な消化管の炎症を主体とし、再発・寛解を繰り返し、未だ根本治療のない難治性疾患で、増加傾向にある。若年者に好発することもあり、より安全な治療・寛解維持療法の開発が望まれている。近年、慢性関節リウマチを始めとした慢性炎症性疾患において、免疫担当細胞の解糖系、酸化リン酸化などのエネルギー代謝と免疫機能が密接に関連していることが明らかになり、代謝制御剤による治療応用の研究が進んでいる。しかし、消化管の慢性炎症性疾患の代表である IBD におけるエネルギー代謝病態や代謝制御剤による有効性は明らかになっていない。

2. 研究の目的

免疫細胞の中でも、CD4⁺T 細胞に焦点をあて、炎症の主座である腸管粘膜 CD4⁺T 細胞 (LPCD4⁺T 細胞) のエネルギー代謝を介した IBD の制御機構を明らかにし、IBD の新たな作用機序による有効で安全性の高い新規治療薬開発につなげることを目的とした

3. 研究の方法

糖尿病治療薬であるメトホルミンは抗炎症作用を有することが知られており、その作用機序の一つとして、細胞のエネルギーの調節因子である AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化が報告されている。この効果に注目し、マウス慢性腸炎モデルを用いて、メトホルミンの抗炎症効果と作用機序についての以下の検討を行った。

- (1) CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入腸炎マウスの大腸粘膜の CD4⁺T 細胞 (LPCD4⁺T 細胞) を抽出、刺激し、IFN- γ / IL-17A 産生を誘導、メトホルミンの抗炎症効果と作用機序について、AMPK に焦点をおき検討
- (2) 上記腸炎マウスにメトホルミンを含んだ餌を投与し、腸炎の抑制効果について検討

4. 研究成果

(1) LPCD4⁺T 細胞の活性化に対するメトホルミンの阻害効果を *in vitro* で評価した。CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入腸炎マウスの大腸粘膜の CD4⁺T 細胞 (LPCD4⁺T 細胞) を抽出。メトホルミンの存在下または非存在下で、PMA とイオノマイシンの組み合わせで刺激した。この大腸炎モデルでは、腸内細菌抗原に再反応する LPCD4⁺T 細胞から、Th1 反応に強く関連するサイトカインである IFN- γ が大量に、そして Th17 関連サイトカインである IL-17A が少量分泌されるモデルである。

メトホルミンは、4 mM の濃度では細胞毒性作用を示さず、この濃度で検討したところ、LPCD4⁺T 細胞における IFN- γ 産生細胞の頻度は、メトホルミン投与群で有意に低下した ($p < 0.01$)。対照的に、IL-17A 産生細胞または IFN- γ + IL-17A⁺ 産生細胞の頻度に差はなかった (図 1)。

(2) 続いて、メトホルミン投与における LP CD4⁺T 細胞の AMPK 発現を、ウェスタンブロッティングで比較した。AMPK の活性化は AMPK の Thr172 のリン酸化状態に依存するため、Thr172 の発言で評価した。

AMPK の Thr172 におけるリン酸化状態 (p-AMPK) 発現は、メトホルミン投与によって、LPCD4⁺T 細胞における Thr172 の発言は有意に増加した ($p < 0.05$) (図 2)。我々は以前、同じマウスモデルにおいて、AMPK の活性化が IFN- γ 産生 CD4⁺T 細胞の頻度を抑制することを報告しており、メトホルミンは、AMPK を活性化することで、大腸炎 LPCD4⁺T 細胞に直接影響を与え、Th1 反応を低下させることが示された。

(3) AMPK は、低グルコース、低酸素、虚血、ヒートショックなど、アデノシン三リン酸 (ATP) を枯渇させる細胞ストレスによって活性化される。ATP は主に、解糖系または酸化リン酸化 (OXPHOS) を介して産生される。メトホルミンは OXPHOS を抑制するといわれており、OXPHOS に対するメトホルミンの影響を LPCD4⁺T 細胞で調べた。

LPCD4⁺T 細胞において、メトホルミン投与により、OXPHOS のマーカーである OCR の低下を認め、さらに、ATP 産生の低下を認めた ($p < 0.01$)。対照的に、解糖系マーカーである ECAR は増加を認めた ($p < 0.01$)。これらの結果から、LPCD4⁺T 細胞においては、メトホルミンは OXPHOS と ATP 産生を抑制し、AMPK を活性化させることで炎症を抑制することが示唆された。一方で、解糖系は代償的に活性化することが示唆された (図 3)。

(4) CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入腸炎マウスにメトホルミンを含んだ餌を投与し、腸炎の抑制効果について検討した。

メトホルミン投与群においては、LPCD4⁺T 細胞数の減少を認めた ($p < 0.05$)。さらに、IFN- γ 産生 LPCD4⁺T 細胞数も、メトホルミン投与群で減少を認めた ($p < 0.05$)。また、両群の LPCD4⁺T 細胞における AMPK 発現を評価したところ、メトホルミン投与群における AMPK の発現は、非投与群よりも有意に高かった ($p < 0.01$) (図 4)。これらの結果は、*in vitro* と同様に、メトホルミンは LPCD4⁺T 細胞の Th1 反応を低下させ、腸炎を改善したことを示している。

更に、腸内細菌叢の違いについても検討した。メトホルミン投与後に腸内細菌組成の変化を認め、*Akkermansia* 属の増加を認めた(図 5)。

図 1

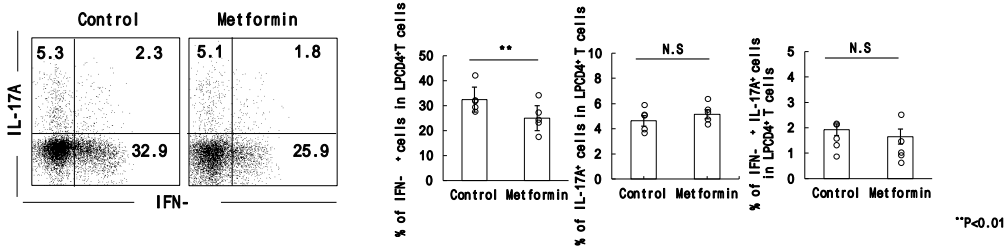


図 2

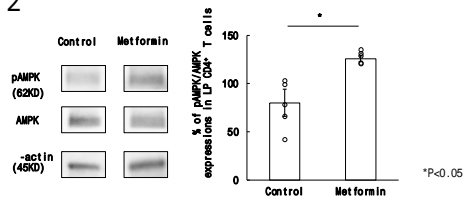


図 3

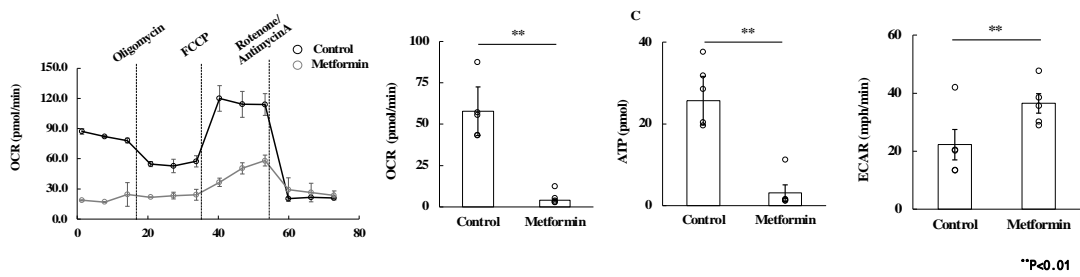


図 4

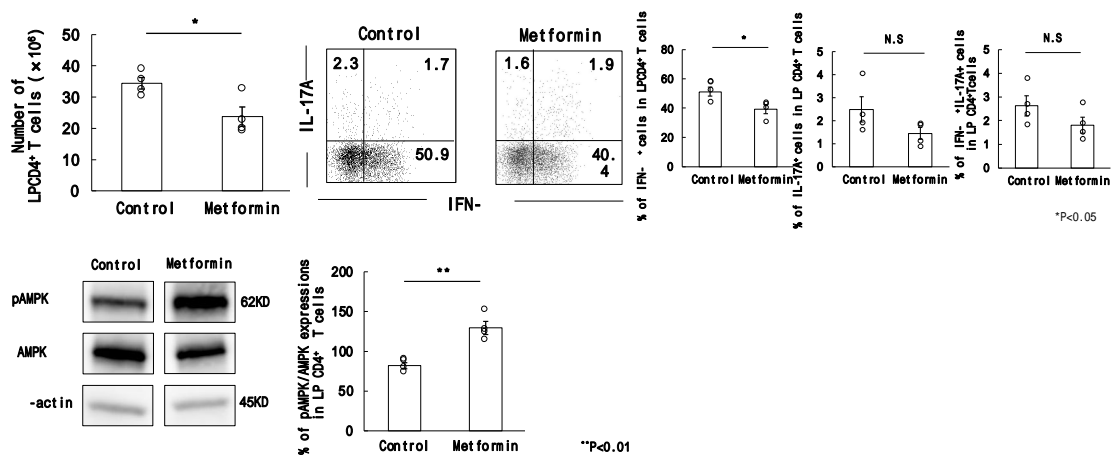
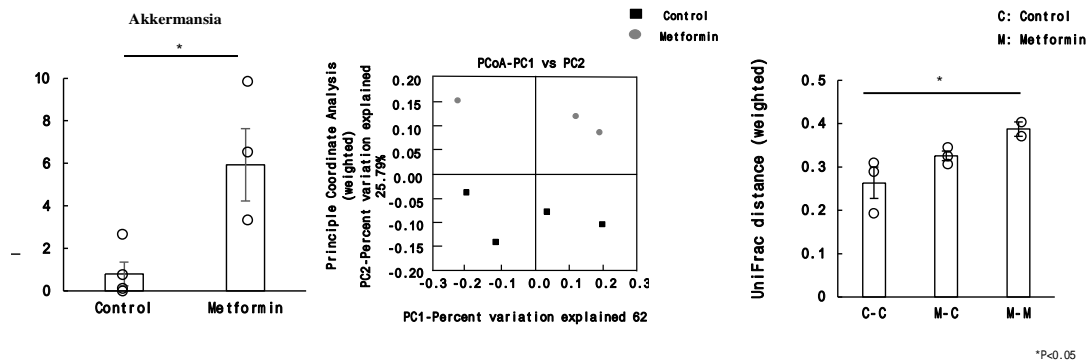


図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takahara Masahiro	4. 巻 Feb;36(2)
2. 論文標題 Metformin ameliorates chronic colitis in a mouse model by regulating. interferon- γ -producing lamina. propria CD4 + T cells through AMPK activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100831RR	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高原政宏
2. 発表標題 メトホルミンは腸管粘膜CD4+T細胞のAMPKの活性化を介してIFN- γ を制御しマウス慢性腸炎を改善させる
3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高原政宏
2. 発表標題 エネルギー代謝をターゲットにした炎症性腸疾患治療の可能性
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
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
---------	---------