

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16958

研究課題名（和文）ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータを標的とした潰瘍性大腸炎治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic agent for ulcerative colitis targeting urokinase-type plasminogen activator

研究代表者

喜田 慶史（KIDA, Yoshifumi）

徳島大学・病院・医員

研究者番号：80747650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：潰瘍性大腸炎(UC)患者では、血管新生がその病態に関与していることが報告されている。本研究ではurokinase-type plasminogen activator(uPA)を含む、血管新生関連因子のmRNA発現を調べ、uPAの発現がUC患者の大腸炎粘膜において内視鏡的重症度と相関して高発現していることを見出した。また、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎マウスにおいて、uPA阻害により大腸炎が軽減することを見出した。よってuPAは腸炎における増悪因子であることが示唆され、新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではuPAがUC患者の炎症粘膜に浸潤した好中球に発現しており、炎症の程度の相関することを見出した。また、大腸炎マウスモデルにおいて、uPAを阻害することにより大腸炎が軽減され、uPAが大腸炎の増悪因子であることが示唆された。またuPA阻害によりRANTESの有意な低下を認めた。これらの結果からuPAやRANTESが潰瘍性大腸炎の治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It has reported that abnormal angiogenesis is associated with the etiology of UC. In this study, We investigated mRNA expression of angiogenesis-related factors in colitis tissue of UC patients. uPA was highly expressed in colitis tissue and correlated with endoscopic severity of UC. We also found that uPA inhibition ameliorated DSS-induced colitis in mice. These data indicate that uPA plays an important role in exacerbation of UC, and suggest that uPA may be a potential therapeutic target for the treatment of UC.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：潰瘍性大腸炎 ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ 血管新生 RANTES

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は、びまん性の炎症が直腸から連続的に大腸に広がる原因不明の難治性腸疾患である。若年発症し再燃を繰り返す疾患であり、我が国の患者数は増え続け、現在20万人を超えている。潰瘍性大腸炎の病因として、遺伝的要因、環境因子、腸内細菌、免疫異常などの関与が分かっているが、十分には解明されていない。近年炎症性サイトカインや接着因子、細胞内シグナルを標的とした新たな機序の薬が承認されているが、未だに薬物治療では十分な効果が得られない難治例が存在する。また、これらの薬剤は感染や長期使用に伴う発癌のリスク、さらに高価な新薬の使用や患者数の増加に伴う医療費の増大が問題となっており、安全で安価かつ有効な新しい治療薬の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究ではUC患者を対象に大腸炎組織におけるuPAを含む血管新生因子の発現を検討すると共に、uPAの発現細胞を同定した。また、DSS腸炎モデルマウスを用い、uPA遺伝子のノックアウトまたはuPAを薬理的に阻害することによりUCにおけるuPA発現の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) UC患者の炎症部および非炎症部より生検を行い、mRNAを抽出した。血管新生関連因子の抗体アレイにおいてUC患者の大腸炎組織で発現が最も高かったMMP-8、uPA、Plasminogen、HGF、EndoglinのmRNA発現をreal-time PCRで測定した。また、UCの内視鏡的重症度との相関を解析した。

(2) UC患者の大腸生検組織を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、OCTコンパウンドで凍結包埋した。凍結ブロックより連続切片を作成し、同じ面をスライドガラスの上に向け鏡面切片を作成した。鏡面切片を用いてuPAと各種細胞マーカーの免疫染色を行いuPAの発現細胞を同定した。

(3) uPAノックアウト(uPA^{-/-})マウスおよび野生型(WT)マウスにそれぞれ2%DSS溶液を1週間自由飲水させ腸炎モデルを作成した。腸炎の重症度を体重変化や下痢・出血の程度からなるDisease activity indexを用いて評価した。また、摘出した大腸標本を用い、組織学的な炎症の程度を評価した。大腸組織を用いて免疫染色を行い、uPAの発現を検討した。さらに、大腸組織でのサイトカインの発現、血漿中のPlasmin活性を測定した。

(4) C57BL/6Jマウスに2%DSS溶液を1週間自由飲水させDSS腸炎を発症させ腸炎モデルを作成した。また同期間においてuPA阻害剤(UK122)またはvehicleを腹腔内に投与した。腸炎の重症度は上記同様にDisease Activity Indexや組織学的な炎症の程度で評価した。さらにサイトカイン発現を解析した。これによりuPA阻害剤による抗炎症効果を検討した。

4. 研究成果

(1)MMP-8、uPA、Plasminogen、HGF、Endoglinの内、MMP-8、uPA、HGFはUC患者の大腸炎組織では非炎症組織と比較して、有意に上昇していた。PlasminogenとEndoglinは炎症組織と非炎症組織で有意な差を認めなかった。また、uPAのmRNAの発現はUCの内視鏡的重症度と相関していた(図1)。

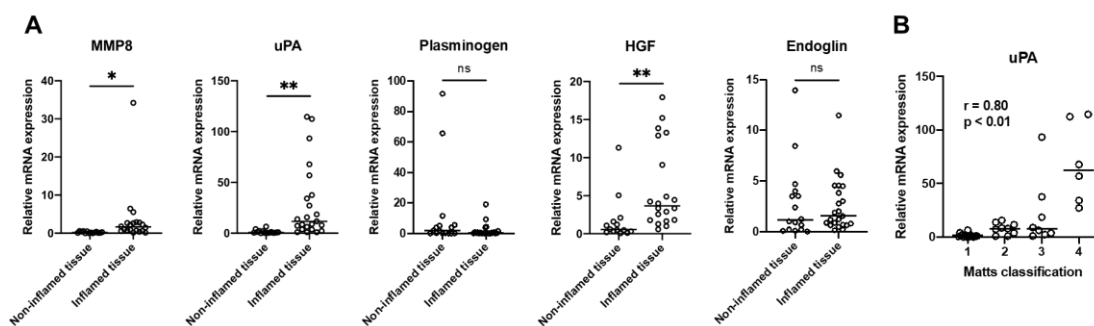


図1 潰瘍性大腸炎患者における血管新生関連因子の発現

(2) UC 患者の大腸炎組織の鏡面切片を用いた免疫組織染色では、uPA の発現は MPO 発現細胞と一致していたが、CD68、CD3、CD20 陽性細胞とは一致しておらず、大腸炎粘膜での主な uPA 産生細胞は好中球であると考えられた(図 2)。

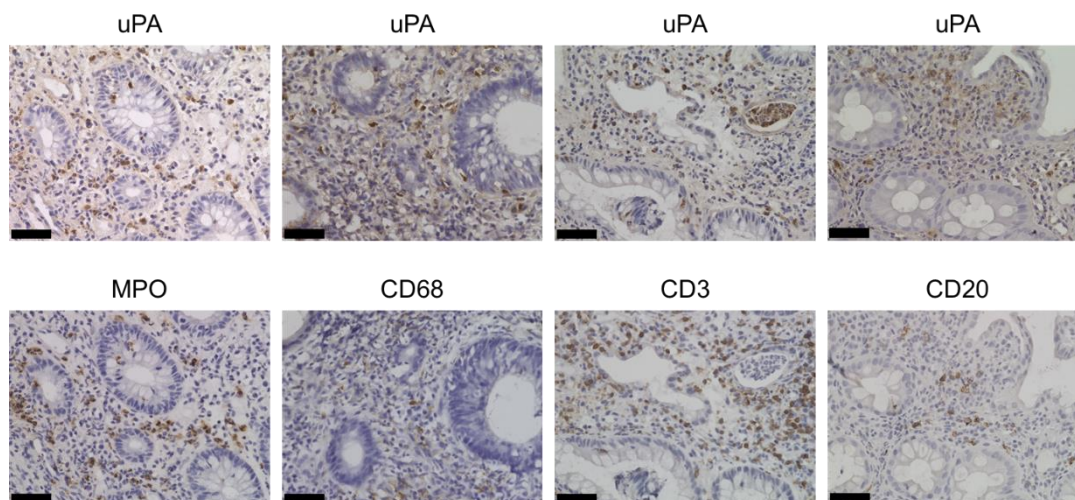


図 2 免疫組織染色による uPA 発現細胞の同定

(3) DSS 腸炎モデルにおいて、uPA^{-/-}マウスでは WT マウスと比較して Disease Activity Index は uPA^{-/-}において低い傾向を認め、Histological score の有意な低下を認めた。(図 3)。WT マウスの大腸炎組織における uPA 免疫染色では大腸粘膜に uPA 陽性細胞を認め、鏡面切片における検討では潰瘍性大腸炎組織と同様、主に好中球に発現していた。uPA^{-/-}マウスでは大腸炎組織において RANTES、IL-12(p40)、GM-CSF、IL-5 の低下を認めた。また、uPA^{-/-}マウスでは血漿プラスミン活性の有意な低下を認めた。

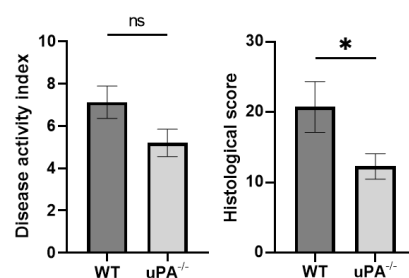


図 3 uPA ノックアウトマウスにおける抗炎症効果

(4) DSS 腸炎モデルを用いた実験において、uPA 阻害剤を投与したマウスでは Vehicle を投与したマウスと比較して、Disease activity index および Histological score の有意な低下を認めた(図 4)。またノックアウトマウスにおいて低下していたサイトカインのうち、RANTES の有意な低下を認めた。

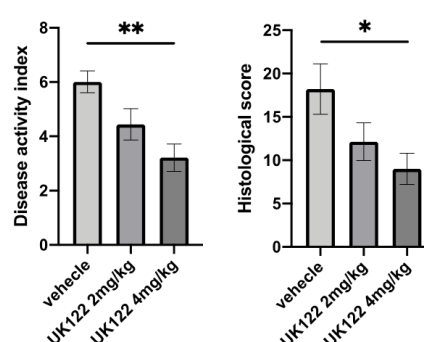


図 4 uPA 阻害剤による抗炎症効果

以上の結果から、UC 患者の大腸炎組織では大腸に浸潤した好中球が uPA を発現しており、その程度は内視鏡的重症度と相関していることを明らかにした。また、uPA を阻害することによりマウス大腸炎が軽減しており、uPA が大腸炎の増悪に関わっていることが示唆された。uPA が潰瘍性大腸炎の新たな治療標的となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------