

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：34309

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15422

研究課題名(和文) マクロファージ制御性ペプチドの潰瘍性大腸炎に対する機能的役割と薬理効果の解析

研究課題名(英文) Functional role and pharmacological effects of macrophage-regulated peptides on ulcerative colitis.

研究代表者

岡田 光貴 (OKADA, KOHKI)

京都橘大学・健康科学部・専任講師

研究者番号：80747569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が独自に考案したS100タンパク質の遺伝子組換えペプチドが潰瘍性腸炎(UC)モデルラットの病態、およびマクロファージ(M ϕ)の免疫機能にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。結果として、ラットのS100A8を組換えた人工ペプチドrMIKO-1の投与は、ラットのUCの病態を改善した。ラットのS100A8の投与でもUCの病態は改善したが、rMIKO-1の投与による薬理効果が上回った。また、rMIKO-1はM ϕ 内に取り込まれることで炎症性サイトカインの産生と分泌を抑制する効果を発揮することが判った。rMIKO-1のUC治療への応用が今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はS100A8タンパク質の本質的な役割と、それを規定する一次構造の解明に繋がり、ひいては基礎免疫学の発展にも貢献できることから学術的に価値がある。UCは大腸組織に慢性炎症が生じ、症状の寛解と再燃を繰り返す難病である。本研究は、UCの発症機序の解明や、UCを含む炎症性疾患における過剰な免疫反応の制御を目的とした治療薬の開発に繋がることが予想され、社会的意義も大きい。さらに、病態解析学や実験病理学、薬理学分野などの発展にも貢献できる。本研究にて樹立したrMIKO-1は、M ϕ の異常な活性を律することで定常状態に導くため、UC以外の炎症性疾患に対する有益な効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify how a recombinant peptide of S100 protein affects the pathogenesis of ulcerative colitis (UC) rat model and the immune function of macrophages (M ϕ). As a result, administration of rMIKO-1, an artificial peptide recombinant with rat S100A8, improved the pathogenesis of UC in rats. Although administration of rat S100A8 also improved the pathogenesis of UC, the pharmacological effect of rMIKO-1 administration was greater than that of rMIKO-1 administration. The application of rMIKO-1 to the treatment of UC is a future challenge.

研究分野：実験病理学

キーワード：潰瘍性大腸炎 S100タンパク質 マクロファージ 組換えペプチド

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(UC)は大腸組織に慢性炎症が生じ、症状の寛解と再燃を繰り返す難病である。UCの患者数は年々増加傾向にあり、発症後10年以降では大腸癌に移行するリスクが非常に高いことから、世界的にも対策が求められている(Eaden JA et al., Gut 48(4):526-535, 2001)。申請者は以前、UCモデルラットの大腸粘膜に浸潤したマクロファージ(MΦ)がS100A9による刺激を受け、炎症性サイトカインの産生と分泌を促進すること(Okada K et al., Biochem Biophys Res Commun 456(1):415-420, 2015)、また、S100A8を全身に高発現するトランスジェニックラットではUCの炎症が軽減されること(Okada K et al., Inflammation 41(1):59-72, 2018)、を報告した。以上より、S100タンパク質が有する免疫機能がUCの病態に深く関係していることは明らかであるが、具体的な機能的役割は未詳であった。なお、S100A8とS100A9は生化学的に分子量と一次構造が異なっており、この差が両タンパク質の免疫機能の差に繋がっていると申請者は予想した。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、「S100タンパク質の機能的役割を規定する一次構造はどのようなアミノ酸配列で構成されているのか、また、その構造を組換えたペプチドを利用し、炎症部位に浸潤する活性型MΦを制御することは可能か」を学術的な「問い」とし、検証を実施した。

3. 研究の方法

研究期間は3年を想定した。各年度の研究項目①～③の詳細を以下に記載する。

① 組換えペプチドの作製と精製(R3年度)

タンパク質のN末端およびC末端のアミノ酸(AA)配列は翻訳後修飾されやすく、シグナル配列としての機能を有することが多い(Rosen CB et al., Nat Chem Biol 13(7):697-705, 2017)。そこで、ラットS100A8とS100A9のN末端およびC末端側からそれぞれ20AA配列を切断(A8- α , β およびA9- α , β)、もしくは付加(A8- γ , ϵ およびA9- γ , ϵ)したペプチドのcDNA(計8種類)を作製し、pCold-Iベクターに挿入したプラスミドを設計した。このプラスミドを大腸菌内に導入した組換え体を作製し、培養する。その後、イソプロピル- β -D-ガラクトピラノシド(IPTG)を用いて、低温下で目的ペプチドの発現を誘導した。菌体を破碎後、Ni-アガロースカラムを用いて目的ペプチドを精製した。

② S100タンパク質および組換えペプチドのマクロファージに対する機能的役割の検証(R3-4年度)

in vitroの実験を通じて、S100タンパク質の機能的役割を規定する一次構造を推定した。次に、MΦの異常活性を抑制する組換えペプチドを選定し、その中からUCに対して治療効果を発揮する新規ペプチド製剤としての候補を絞り込んだ。

まず、ラット(Wistar:Slc)に4%チオグリコレート(10 ml/匹)を腹腔内投与した。3日後、腹腔に誘導されたMΦをリン酸緩衝液(PBS)にて回収、その後、プレートに定着させて培養し、実験に供した。MΦを予めS100タンパク質あるいは組換えペプチドで一定時間処理した後、リポポリサッカライド(LPS)刺激を実施し、MΦの活性化を誘導した。あるいは反対に、LPSでMΦを活性化した後で、各種ペプチドを投与した。以上の条件による刺激後、MΦ内外における炎症関連因子の変動を精査した。具体的には、各種ペプチドの受容体、即ちToll-like Receptor(TLR)やRAGEへの結合、細胞内への取り込み、NF- κ Bへの作用を確認した。さらに、MAPK経路や各種サイトカインなど炎症に関わる諸因子の変動を各種分析法により精査した。対照として、LPS無刺激の非活性型MΦを各種ペプチドで処理し、それらのMΦに対する毒性の有無を検証した。

③ 組換えペプチドのUCモデルラットに対する薬理効果の検証(R4-5年度)

先のin vitro実験の結果に基づきMΦの異常活性を抑制する機能が示されたペプチドを対象として、それらの投与がUCの病態に与える影響と薬理効果の有無をin vivoの実験で精査した。

ラット(Wistar:Slc)に5%硫酸化デキストラン(DSS)を10日間常飲させ、実験的にUCを誘導した(UC群)。一方、in vitro実験によりMΦ異常活性の抑制、および抗炎症性作用を示した組換えペプチドを別のUC群のラット腹腔内に毎日投与(1.0 mg/day程度)した(UCP群)。なお、UCP群に投与したペプチドと同量のPBSをUC群には腹腔内投与した。DSS投与期間中、各群のラットから採尿と採便を毎日実施した。実験開始後10日目には各群のラットを解剖し、心臓採血と大腸組織の摘出を行った。投与期間中は体重変動、便の性状、大腸からの出血の有無を観察し、腸炎重症度をDisease activity index scoreで判定した。また、大腸組織の病理学的、組織学的変化はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色や免疫染色により確認し、投与した各組換えペプチドの薬理効果を検証した。特に、UCにおける炎症は直腸部から大腸全域に広がるため、大腸組織は肛門側から順に直腸部、中間部、近位部に3分割し、Histological scoreを指標としてそれぞれの部位の重症度を精査・評価した。各種生体試料中における炎症マーカー(サイトカインやCRP等)はELISA等を用いて測定した。さらに、大腸組織中における各マーカーのmRNA発現量はPCR、Real-Time PCR等を用いて解析した。以上から、UCに対する組換えペプチドの薬理効果および副作用を詳細に解析した。

4. 研究成果

ラットの S100A8 タンパク質を基調とした組換えペプチド rMIKO-1 を毎日投与した UC モデルラット(UCP 群)では、UC の症状である下痢と下血が有意に軽減されていた(Fig.1)。大腸組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本を観察しても、重度の大腸炎の特徴である杯細胞の消失や免疫細胞の浸潤が UCP 群では軽減されていた(Fig.2)。また、rMIKO-1 は MΦ 内に取り込まれ、転写因子である NF-κB と結合する性質を有していた。結果的に、rMIKO-1 を取り込んだ MΦ は、炎症性サイトカインの産生と分泌が抑制されており、これら炎症因子を抑制的に制御している可能性が高まった。以上の結果から、UC の炎症における rMIKO-1 投与は、NF-κB の抑制と炎症性サイトカインの転写阻害に寄与する可能性が考えられた。

また、S100A8 タンパク質自体、rMIKO-1 ほどの薬理効果は無いものの、毎日の投与により UC モデルラットの炎症を抑制していた。特に、S100A8 を投与した群では、好中球の浸潤が明らかに抑制されていた(Fig.3)。さらに、S100A8 投与群の UC モデルラットでは、大腸組織における S100A9 と、炎症性サイトカインの 1 種である tumor necrosis factor-α(TNF-α)の産生が抑制されていた。S100A8 で刺激した MΦ では、細胞内 S100A8 の発現がオートクライン的に活性化され、逆に S100A9 の発現は活性化されなかった。LPS で刺激し、活性化された MΦ では、細胞内 S100A9 や TNF-α の発現上昇を認めた。また、抗 S100A8 抗体で処理し、細胞内 S100A8 を阻害した MΦ では、S100A9 と TNF-α の活性が非常に高まる傾向を認めた。以上の結果から、UC の炎症増悪期における S100A8 は、LPS と S100A9 が関与する MΦ 内シグナル伝達経路を抑制することで、特に TNF-α の産生と分泌を制御する、抗炎症性のタンパク質として働くと考えられた。

研究期間全体の実験結果を総括すると、S100A8 タンパク質、あるいはそれを基調として作製した組換えペプチドは、UC の炎症を抑制的に制御する可能性が高いと考えられた。

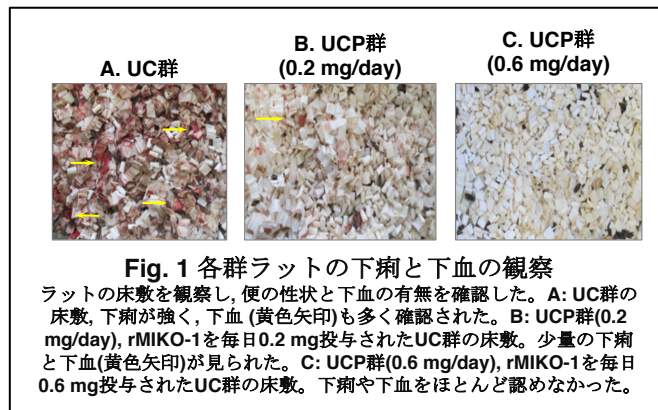


Fig. 1 各群ラットの下痢と下血の観察
ラットの床敷を観察し、便の性状と下血の有無を確認した。A: UCP 群の床敷、下痢が強く、下血(黄色矢印)も多く確認された。B: UCP 群(0.2 mg/day)、rMIKO-1 を毎日 0.2 mg 投与された UCP 群の床敷。少量の下痢と下血(黄色矢印)が見られた。C: UCP 群(0.6 mg/day)、rMIKO-1 を毎日 0.6 mg 投与された UCP 群の床敷。下痢や下血をほとんど認めなかった。

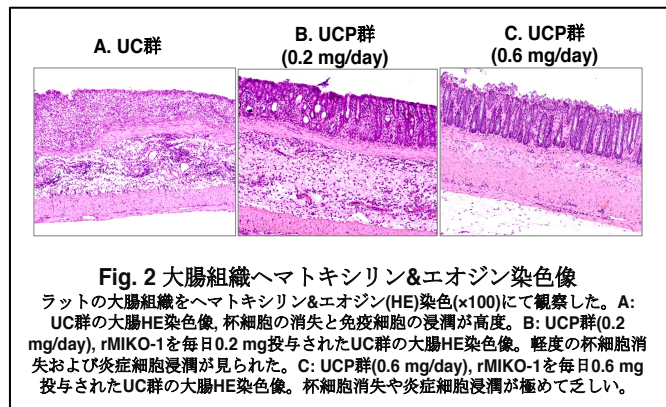


Fig. 2 大腸組織ヘマトキシリン&エオジン染色像
ラットの大腸組織をヘマトキシリン&エオジン(HE)染色(x100)にて観察した。A: UCP 群の大腸 HE 染色像。杯細胞の消失と免疫細胞の浸潤が高度。B: UCP 群(0.2 mg/day)、rMIKO-1 を毎日 0.2 mg 投与された UCP 群の大腸 HE 染色像。軽度の杯細胞消失および炎症細胞浸潤が見られた。C: UCP 群(0.6 mg/day)、rMIKO-1 を毎日 0.6 mg 投与された UCP 群の大腸 HE 染色像。杯細胞消失や炎症細胞浸潤が極めて乏しい。

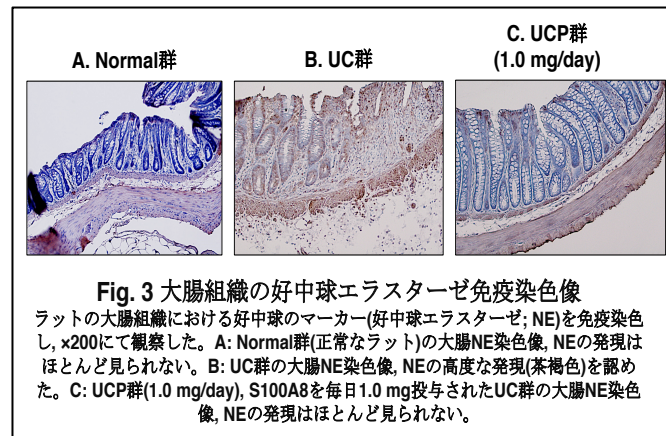


Fig. 3 大腸組織の好中球エラスターゼ免疫染色像
ラットの大腸組織における好中球のマーカー(好中球エラスターゼ; NE)を免疫染色し、x200にて観察した。A: Normal 群(正常なラット)の大腸 NE 染色像。NE の発現はほとんど見られない。B: UC 群の大腸 NE 染色像。NE の高度な発現(茶褐色)を認めた。C: UCP 群(1.0 mg/day)、S100A8 を毎日 1.0 mg 投与された UCP 群の大腸 NE 染色像。NE の発現はほとんど見られない。

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 2件）

1. 著者名 岡田 光貴	4. 巻 51
2. 論文標題 炎症性腸疾患の重症度判定に貢献する臨床検査法の発展	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 151-152
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 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 岡田 光貴	4. 巻 37
2. 論文標題 潰瘍性大腸炎の重症度判定に貢献するバイオマーカー候補タンパク質の発掘	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1138-1142
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 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 岡田 光貴	4. 巻 50
2. 論文標題 炎症性腸疾患のバイオマーカー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 検査と技術	6. 最初と最後の頁 1317-1319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1543208849	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 岡田 光貴	4. 巻 38
2. 論文標題 潰瘍性大腸炎に対する臨床検査の発展	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 70-74
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 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 岡田 光貴、松尾 佳乃	4. 巻 11
2. 論文標題 Nicotine exerts a stronger immunosuppressive effect than its structural analogs and regulates experimental colitis in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 922-941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11030922	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 岡田光貴, 池本正生	4. 巻 45
2. 論文標題 A new hybrid protein is a novel regulator for experimental colitis in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 180-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-021-01537-5	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 岡田光貴, 池本正生	4. 巻 11
2. 論文標題 Carbonic anhydrase III has potential as a biomarker for experimental colitis and functions as an immune regulator by inhibiting inflammatory cytokine secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology11040494	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡田 光貴、松尾 佳乃
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎モデルラットへのニコチン腹腔投与の影響と薬理効果
3. 学会等名 第62回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾 佳乃、池本 正生、岡田 光貴
2. 発表標題 DSS誘導潰瘍性大腸炎に対するS100A8タンパク質の薬理効果及びその機能的役割について
3. 学会等名 第62回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 光貴、伊藤 洋志、米田 孝司
2. 発表標題 型炭酸脱水酵素の大腸炎抑制効果の可能性
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾 佳乃、岡田 光貴
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎モデルラットに対するS100A8タンパク質の機能的役割
3. 学会等名 第33回生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 光貴、松尾 佳乃
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎に対するニコチンの薬理効果に関する基礎的検討
3. 学会等名 第33回生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患に対する血清中 型炭酸脱水酵素の臨床的意義について
3. 学会等名 第70回日本医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 マクロファージにおける3型炭酸脱水酵素の免疫抑制機構に関する基礎的検討
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 ラット大腸炎に対する組換えペプチドhMIK0-1の薬理効果
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内 彩香, 岡田 光貴, 池本 正生, 伊藤 洋志
2. 発表標題 hMIK0-1によるラット大腸炎抑制効果及びその薬理効果
3. 学会等名 第31回日本臨床化学会近畿支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田光貴、池本正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患における生体内変動タンパク質の重症度判定マーカーとしての性能評価
3. 学会等名 第31・32回生物試料分析科学会合同年次学術集会
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
---------	---------