

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24591980
研究課題名(和文) エリスロポエチンの炎症性腸疾患に対する新規治療の可能性

研究課題名(英文) Therapeutic potential of Erythropoietin for IBD

研究代表者

中村 信治 (Nakamura, Shinji)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30423924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(EPO)の炎症性腸疾患(IBD)に対する新規治療の可能性について検討した。DSS腸炎モデルマウスにおいてEPO投与群は有意に生存を改善し、体重回復率も有意に改善した。腸管組織では炎症反応の改善を認め、また腸管局所の免疫反応の抑制を認めた。PCNAはEPO投与群では過剰に発現し、EPO投与によりヒト大腸上皮細胞株は濃度依存性に増加した。またEPO受容体はヒト潰瘍性大腸炎、クローン病腸管組織にも発現を認めた。以上よりEPOの元来持つ造血作用と今回明らかになった抗炎症作用、組織再生作用、この3作用が腸管組織に有意に働きIBDに対し有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the therapeutic potential of erythropoietin (EPO) for the treatment of IBD. Mice treated with rhEPO significantly survived compared with control mice induced by 5-day DSS. Histological analysis confirmed that EPO treatment reduced the colonic inflammation. EPO treatment significantly downregulated the local expressions. In a 4-day DSS-induced colitis model, rhEPO significantly improved the recovery of body weight loss compared to controls. PCNA expression was significantly upregulated in the colon tissue from mice treated with rhEPO. In addition, rhEPO increased the growth of cultured human colon epithelial cells in a dose-dependent manner. Furthermore, EPO-receptor expression was confirmed in human IBD colon tissues. Conclusion. Three major functions of EPO, hematopoiesis, anti-inflammation and regeneration, may produce significant effects on intestinal inflammation, therefore suggesting that EPO might be useful for IBD.

研究分野：大腸肛門病学

キーワード：エリスロポエチン IBD 腸管 組織再生

1. 研究開始当初の背景

(1)潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)に代表される炎症性腸疾患(IBD)は、今なお原因不明の難治性疾患である。全国集計による患者数も近年増加の一途を辿り、2004年には潰瘍性大腸炎で8万人以上、クローン病で2.3万人以上に達したとされている。いずれの疾患においても、患者のQOLを長年にわたり蝕み、肉体的かつ精神的苦痛は甚大なものである。既存治療は、栄養療法の他、ステロイド、5-ASA製剤、免疫抑制剤による薬物療法などの保存的治療が中心であるが、外科的治療を要する場合も少なくない。また、最近では、好中球(顆粒球)除去療法や抗TNF抗体などの新たな分子標的治療が奏功することもあるが、それでも今なお重症例や難治例は少なくはない。さらに病期期間が長期になるとColitic Cancerの発症や薬物の長期使用による副作用等、多くの問題が発生する。患者のQOLや予後を抜本的に改善するには、従来にはない新たな観点からの治療戦略の確立が必要である。

(2)腎性貧血に対する薬剤として広く臨床で用いられているエリスロポエチン(EPO)は、腎不全患者のQOLの改善に大きく貢献している。最近の研究からEPOは、造血作用以外にも、虚血性障害時における神経や心臓に対する保護作用や抗炎症作用、様々な生体の細胞に対する増殖および障害修復促進効果等多彩な機能を持つことが報告されるようになった。そこで我々はこのEPOの新たに判明した抗炎症作用に基づく障害抑制効果や腸管粘膜の再生促進作用が炎症性腸疾患に対してより効率的な治療法となりえるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的はEPOのIBDに対する新規治療の可能性の検討することにある。

3. 研究の方法

(1)実験動物としてはSPF環境下のオスのBALB/Cマウス(8-12W,体重22-30g)を用いた。腸炎モデルマウスの作成にはデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)(M.W36000-50000)を用いた。また、EPO治療群には遺伝子組み換えヒトEPO(rhEPO;エポエチンベータ)を用いた。EPOの抗炎症効果および再生効果をみるための炎症モデルの発症およびEPOの治療法には2つのプロトコルを用いた。1つは3.0%DSSを5日間投与し、治療群はrhEPOを150E、コントロール群は蒸留水を投与(皮下注射)するプロトコル。これにより急性炎症に対する抗炎症効果を検討した。もう1つは3.0%DSSを4日間投与し、治療群は5日目よりrhEPO、コントロール群は蒸留水を投与する

プロトコル。これにより緩徐な腸炎発症に対する再生効果を検討した。

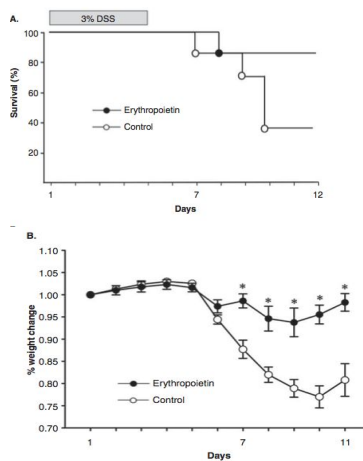
(2)種々のサイトカイン(IFN, TNF), 接着因子(Eselectin), T細胞の発現はRT-PCRを用いて行った。また細胞増殖分析にはヒト大腸上皮細胞株であるHT29とCaco2を用いて検討した。

またUCおよびCD患者の腸管パラフィン切片を用いEPO受容体(EPO-R)の発現を検討した。

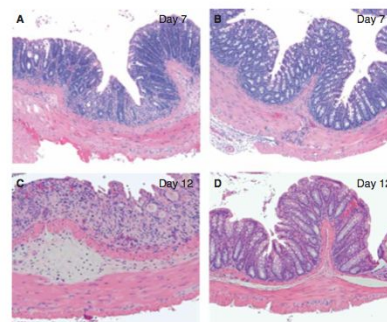
4. 研究成果

(1)DSS腸炎マウスに対するEPOの保護効果
まずはDSSを5日間投与し、腸炎モデルを作成、DSS投与と同時にそれぞれ治療を開始し、DSS投与後12日目の生存率を比較したところ、コントロール群は38%の生存率に対し、EPO投与群は85%と有意に生存率を改善した($p < 0.02$)(図1-A)。また体重変化率もEPO投与群が有意に高かった(図1-B)。DSS開始後7日目および12日目の腸管組織のHE染色ではEPO投与群が明らかに炎症細胞浸潤や粘膜肥厚が軽度であった(図2)。これらのことからEPOが明らかに炎症腸管に抗炎症作用を有することが示唆された。

(図1)



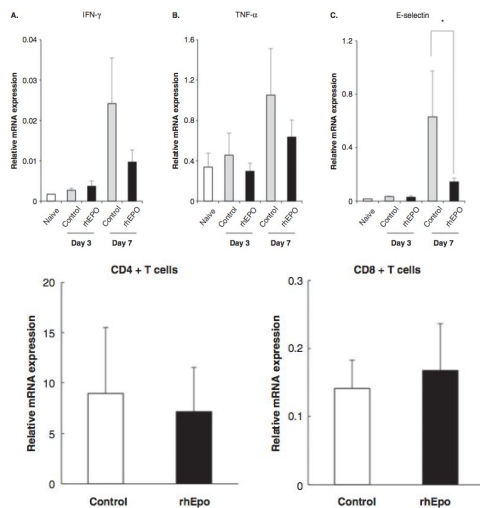
(図2)



(2)EPOの腸管局所の免疫応答およびT細胞上記メカニズムを検討するため腸管局所の免疫活性をRT-PCRにて検討したところ治療開始後7日目の腸管局所の免疫活性にて、

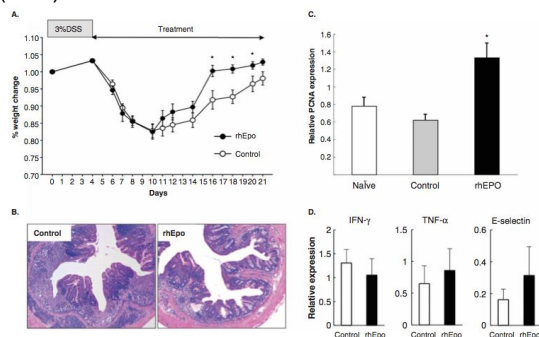
EPO 投与群がコントロール群に対し、炎症性サイトカインである IFN γ や TNF α , 接着因子である Eselectin の有意な活性の低下を認めた(p<0.05). また T 細胞活性の検討も行ったが CD4 および CD8 には有意な差は認めなかった(図 3).

(図 3)



(3)DSS 腸炎マウスに対する EPO の再生効果次に EPO の炎症腸管に対する再生作用を見るため前述の如く DSS4 日投与による炎症モデルマウスを用いた. 炎症惹起後 5 日目より治療を開始しコントロール群と体重変化率を検討したところ EPO 投与群が有意に体重変化率の改善を認めた(図 4-A). 腸管の病理組織学的検討ではやはり EPO 投与群が有意に炎症細胞浸潤が軽度で粘膜の残存を多く認めた(図 4-B). 組織の増殖核抗原(PCNA)を検討したところ EPO 投与群が有意に発現の増加を認めた(図 4-C). 腸管局所の免疫活性には有意差は認めなかった(IFN γ , TNF α , Eselectin)(図 4-D). 以上の事より EPO により組織再生が促進されている可能性が示唆された.

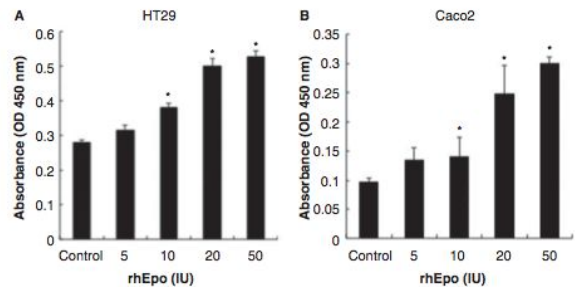
(図 4)



(4)ヒト大腸上皮細胞株を用いた増殖効果 EPO のヒト腸管上皮に対する効果を見るためヒト大腸上皮細胞株(HT29, Caco2)を用い検討したところいずれの細胞株においても EPO 投与群が濃度依存性に有意な増殖効果を認

めた. これにより EPO はヒト大腸上皮細胞に対し増殖効果を有することが示唆された(図 5-A,B).

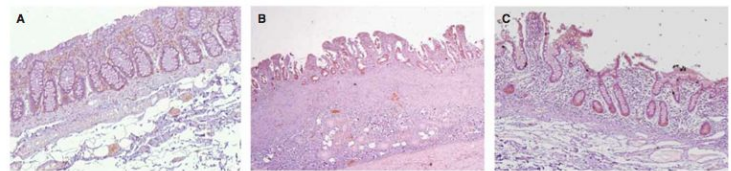
(図 5)



(5)ヒト IBD 大腸組織に対する EPO 受容体の発現

最後にヒト UC および CD 大腸組織に対し EPO 受容体(EPO-R)の存在を免疫組織にて確認したところ, 粘膜上皮の基底細胞や神経組織に発現を認めた. これにより EPO は正常腸管(図 6-A)のみならず UC(図 6-B)や CD(図 6-C)等の腸管に対しても作用する可能性が示唆された.

(図 6)



5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文]

candinavian Journal of Gastroenterology. 2015; Early Online, 1-9 (計 1 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 信治(NAKAMURA Shinji)
奈良県立医科大学消化器・総合外科 助教
研究者番号: 30423924

(2)研究分担者

庄 雅之(SHO Masayuki)
奈良県立医科大学消化器・総合外科 准教授
研究者番号: 50364063

小山 文一(KOYAMA Fumikazu)

奈良県立医科大学中央内視鏡・超音波部 准教授
研究者番号: 40316063

植田 剛(UEDA Takeshi)
奈良県立医科大学消化器・総合外科 医員
研究者番号: 40526810

錦織 直人(NISHIGORI Naoto)
奈良県立医科大学消化器・総合外科 医員
研究者番号: 70570977

井上 隆(INOUE Takashi)
奈良県立医科大学消化器・総合外科 医員
研究者番号: 60623478

中本貴透(NAKAMOTO Takayuki)
奈良県立医科大学消化器・総合外科 医員
研究者番号: 70646091

藤井 久男(FUJII Hisao)
奈良県立医科大学中央内視鏡・超音波部
教授
研究者番号: 40156823

中島 祥介(NAKAJIMA Yoshiyuki)
奈良県立医科大学消化器・総合外科 教授
研究者番号: 00142381

(3)研究協力者

吉川 周作(YOSHIKAWA Syusaku)

稲次 直樹(INATSUGI Naoki)