

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460952

研究課題名(和文)炎症性腸疾患腸管粘膜におけるsmad7発現亢進のメカニズムと新規治療法の開発

研究課題名(英文)The mechanism of increased smad7 expression in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease and the exploitation of a new therapy

研究代表者

中村 和彦(Nakamura, Kazuhiko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00274449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスCD4+ T細胞を刺激、至適濃度のサイトカインを添加、ウエスタンブロットでsmad7蛋白の発現レベルを解析した。Smad7発現はIL-1、IFN-、TNF-添加により著明に低下、TGF-添加で増加した。消化管内視鏡下生検サンプルを用いてsmad7 mRNAの発現を定量的PCRで解析した。Smad7発現は潰瘍性大腸炎難治例活動期で発現低下していた。

IL-1、IFN-、TNF-などの炎症性サイトカインがsmad7発現抑制因子、TGF-が促進因子と考えられた。潰瘍性大腸炎難治例では炎症性サイトカイン過剰発現によりsmad7発現が低下している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mouse CD4+ T cells were stimulated with the addition of various cytokines. The expression level of smad7 protein was analyzed by western blot analysis. Smad7 expression was decreased by IL-1, IFN- and TNF- and increased by TGF-. Smad7 mRNA expression was analyzed by quantitative PCR using biopsy samples under gastrointestinal endoscopy. Smad7 expression was decreased in active phase of refractory ulcerative colitis patients. Proinflammatory cytokines such as IL-1, IFN- and TNF- were considered to be inhibitors and TGF- was considered to be a promoter of smad7 expression. In the refractory ulcerative colitis patients, smad7 expression might be downregulated by increased proinflammatory cytokines.

研究分野：消化器内科学

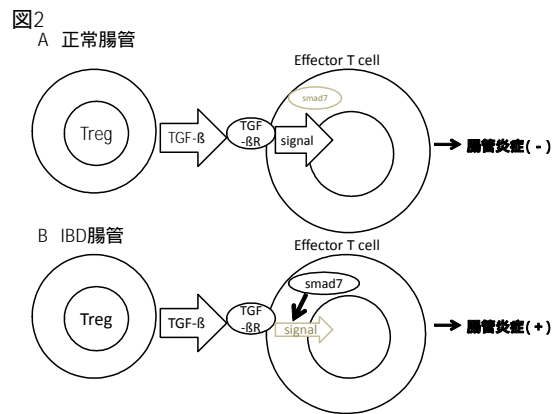
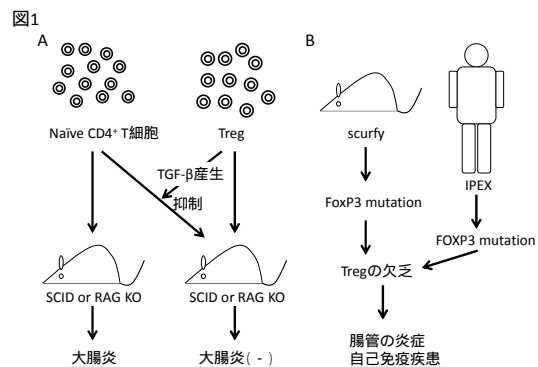
キーワード：炎症性腸疾患 smad7 炎症性サイトカイン TGF-

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(IBD)の成因は不明であるが、腸管粘膜における免疫応答制御機構の破綻が関与していると考えられる。この腸管免疫制御機構に最も重要な役割を担うのが CD4+CD25+FOXP3+制御性 T 細胞(Treg)である。Treg は広範な免疫応答を抑制する免疫調節性細胞であり、腸管での過剰な免疫応答を抑制し、恒常性維持に必須である。その根拠として以下の事実が挙げられる。ナイーブ CD4+ T 細胞を T、B 細胞が欠損した SCID マウスや RAG 欠損マウスに移入すると IBD 類似の慢性大腸炎が起こる。Treg を同時、または大腸炎発生後に移入すると、それぞれ大腸炎を予防、または治癒させる(*J Immunol* 170:3939,2003) (図 1A)。また、Treg の特異的転写因子 FOXP3 に mutation を持ち、Treg の分化が障害されているヒト (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: IPEX) とマウス (scurfy) で多彩な自己免疫疾患と高度の腸管炎症を認める (図 1B)。

我々は、Treg が抑制性サイトカイン TGF- β を高産生し(Nakamura et al. *J Exp Med* 194:629,2001)、大腸炎抑制作用には Treg から産生された TGF- β が必要であること(Nakamura et al. *J Immunol* 172:834,2004)を報告した。また、我々は潰瘍性大腸炎(UC)活動期において末梢血 Treg が、健常人、UC 非活動期と比較して有意に低下している事を報告した(Takahashi et al. *Dig Dis Sci* 51:677,2006)。一方、IBD 腸管では Treg はむしろ増加している (*J Immunol* 173:3119,2004, *Gastroenterology* 128:1868,2005)。IBD における末梢血 Treg の減少、腸管粘膜 Treg の増加は、

末梢血から腸管粘膜への Treg の動員増加によるものと考えられる。では IBD 腸管で Treg は増加しているのに何故、腸管炎症は抑制されないのか？それを説明する一つの仮説として effector 細胞が Treg 抑制への抵抗性を獲得している可能性が考えられる。近年、IBD 腸管粘膜 T 細胞で TGF- β 受容体シグナルを抑制する分子 smad7 の発現が上昇しており、effector T 細胞が Treg による抑制に抵抗性となっている事が報告されている (*Gastroenterology* 136:1308,2009) (図 2)。



2. 研究の目的

CD4+ T 細胞における smad7 発現抑制因子、促進因子を明らかにする。

3. 研究の方法

Balb/c マウスより脾臓を摘出し、Ficoll Paque centrifugation で単核球を分離した。マウス CD4+ T 細胞分離キット (Miltenyi Biotec) で CD4+ T 細胞を分離した。CD4+ T 細胞を固相化した抗マウス CD3 モノクロー

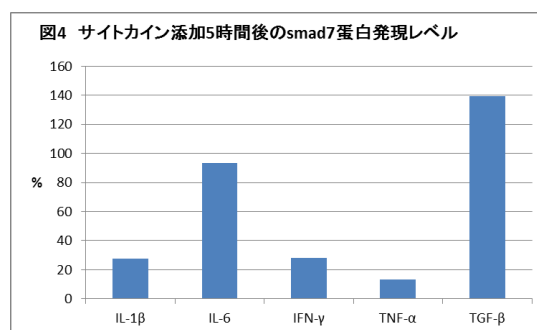
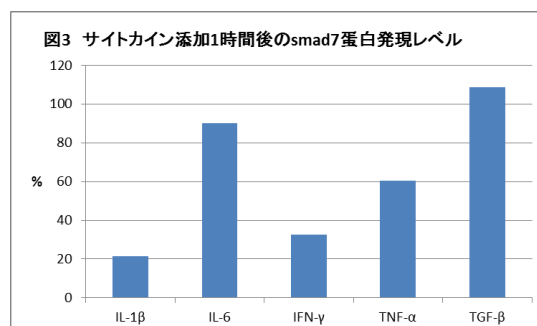
ナル抗体(BD Bioscience)(10 μ g/ml)と可溶性抗マウス CD28 モノクローナル抗体(BD Bioscience)(1 μ g/ml)で刺激した。至適濃度のリコンビナント IL-1 (10 ng/ml)、IL-6 (20 ng/ml)、IFN- γ (5 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml)、TGF- β (5 ng/ml) (全て eBioscience) をそれぞれ添加し、1 時間後、5 時間後に細胞を採取し lysate を作成した。Lysate を SDS-PAGE で電気泳動し、PVDF メンブレン(Hybond-P: GE Healthcare)に転写した。抗マウス smad7 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)でウェスタンブロットを行い、smad7 蛋白の発現レベルを解析した。内因性コントロールとして抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を用いた。

また smad7 発現と治療抵抗性との関係を検討するために、内視鏡下生検サンプルを用いて smad7 mRNA 発現を定量的 PCR で検討した。本研究は九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認を得て、全ての患者より文書による同意を得て行われた。大腸内視鏡検査下、ダブルバルーン小腸内視鏡検査下に UC とクローン病(CD)より炎症部、非炎症部より生検サンプルを採取した。対照として非 IBD 患者より非炎症部の生検サンプルを採取した。生検サンプルは採取後すぐに RNA later(Ambion)に入れられて 1~数日常温に保存された後、-30~-80 の冷凍庫に保存された。生検サンプルより total RNA を TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて抽出し、cDNA を QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)を用いて作成した。Smad7 mRNA 発現を FAM-labeled TaqMan Gene Expression Assay Reagent (Applied Biosystems)を用いた定量的 real-time PCR を用いて解析した。20ng の RNA に相当する cDNA、特異的 primer(Applied Biosystems gene expression assay number: Hs00998193_m1)、TaqMan Universal PCR Master Mix、No AmpErase UNG を加えて

容量を 20 μ l に調整し Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を用いて反応させた。反応の条件は 95 、10 分に引き続き、40 サイクルの 95 、15 秒と 60 、60 秒で行った。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。

4. 研究成果

Smad7 蛋白発現レベルはサイトカイン添加 1 時間後、コントロールとの比較で、IL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β の添加により、それぞれ 21.4%、90.2%、32.4%、60.3%、108.8% (図 3)、サイトカイン添加 5 時間後、それぞれ 27.6%、93.4%、28.0%、13.5%、139.6%となり(図 4)、IL-1、IFN- γ 、TNF- α により smad7 の著明な発現抑制が認められるとともに、TGF- β により smad7 発現亢進が認められた。



Smad7 mRNA の発現は、CD 炎症部、CD 非炎症部、UC 炎症部、UC 非炎症部、非 IBD 対照間で有意な差は認めなかった(図 5)。UC 難治例、非難治例での比較検討では、難治例炎症部は、難治例非炎症部($p=0.0269$)、非難治例非炎症部($p=0.0470$)、非 IBD 対照

($p=0.0253$)と比較して、smad7 発現は有意に低下していた(図6)

図5 CD、UC腸管粘膜におけるsmad7 mRNAの発現

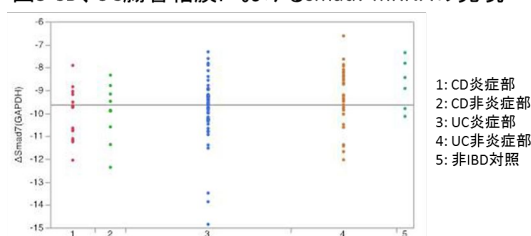
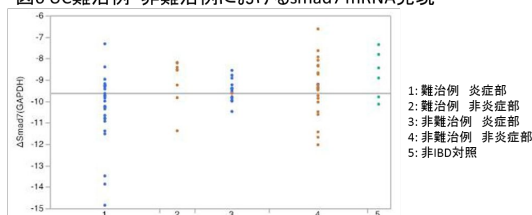


図6 UC難治例・非難治例におけるsmad7 mRNA発現



以上より、IL-1、IFN-、TNF-などのproinflammatory cytokineがsmad7発現抑制因子、TGF-がsmad7発現促進因子である事が示された。Proinflammatory cytokineのシグナルが入る際に、regulatory cytokineのシグナルが伝達されやすいように制御されていると考えられ、生体の恒常性を維持するメカニズムと考えられた。また、TGF-による制御が長期間持続すると、smad7の発現が亢進し、TGF-受容体シグナルが抑制されると考えられた。生検サンプルを用いたsmad7 mRNA発現解析では、今回、IBDにおけるsmad7発現亢進を確認できなかった。これは生検サンプル内にはリンパ球以外に多種多様な細胞が含まれるため、その差を示すことができなかった可能性や、smad7発現に転写後の制御が関与している可能性などが考えられた。また、UC難治例の炎症部でsmad7発現が低下していたことは、proinflammatory cytokine優位な状況にあり、上記のメカニズムでsmad7発現が抑制された結果である可能性が示唆された。

本研究によりsmad7を標的としたIBD治

療開発を検討するために有用な基礎的な知見が得られたと考えられる。

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](計2件)

1. Iboshi Y, Nakamura K, Ihara E, Iwasa T, Akiho H, Harada N, Nakamuta M, Takayanagi R. Multigene analysis unveils distinctive expression profiles of helper T-cell-related genes in the intestinal mucosa that discriminate between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20:967-977, 2014
2. Iboshi Y, Nakamura K, Fukaura K, Iwasa T, Ogino H, Sumida Y, Ihara E, Akiho H, Narada N, Nakamuta M. Increased IL-17A/IL-17F expression ratio represents the key mucosal T helper/regulatory cell-related gene signature paralleling disease activity in ulcerative colitis. *J Gastroenterol*, Published online: 13 May 2016

[学会発表](計2件)

1. Iboshi Y, Nakamura K, Harada N, Nakamuta M, Iwasa T, Fukaura K, Ihara E, Takayanagi R. Multigene analysis unveils helper T-cell-related genes expression in intestinal mucosa that correlates with endoscopic severity in ulcerative colitis. 22nd United European Gastroenterology Week, Vienna Oct 18-22, 2014.
2. Iboshi Y, Nakamura K, Fukaura K, Iwasa T, Ogino H, Sumida Y, Ihara E, Akiho H, Harada N, Nakamuta M. Key mucosal helper T cell-related gene signature paralleling disease activity in ulcerative colitis is underlain by different interactions between IL-17A and IL-17F with other helper T cell-related genes. 80th Annual Scientific Meetings of the American College of Gastroenterology. Honolulu, HI Oct 16-21, 2015

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 和彦 (NAKAMURA, Kazuhiko)
九州大学 大学病院 助教
研究者番号：00274449

(2) 研究分担者

伊原 栄吉 (IHARA, Eikichi)
九州大学 大学病院 助教
研究者番号：80612390

(3) 連携研究者

該当なし