

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05409

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における神経ペプチドシグナルの制御機構解明と疾患治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of regulation mechanism for neuropeptide signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases and its application to the therapy

研究代表者

武富 紹信 (Taketomi, Akinobu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70363364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：in vitro培養実験及びDSS誘発大腸炎マウスモデルを作成し、STAT1と神経ペプチド、ニューロキニンAの受容体NK2Rを介した神経ペプチドシグナルによる炎症性腸疾患の制御メカニズムを解析した。その結果、樹状細胞やマクロファージを介した過剰な炎症反応や病態の重篤化にはSTAT1の活性化を介したケモカイン・ケモカイン受容体の発現誘導の関与を初めて見出した。さらに潰瘍性大腸炎、クローン病等の炎症性腸疾患患者の切除組織においてSTAT1やNK2Rが過剰発現することを見出した。従って、STAT1の活性化とその下流標的分子の制御は難治性炎症性腸疾患の治療に有望な戦略となることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進国・日本において潰瘍性大腸炎、クローン病などの難治性・慢性炎症性腸疾患が年々増加している。抗炎症・免疫抑制剤により患者のQOLが以前よりは改善されたものの、病態の改善・治療のための基礎・臨床研究は依然として重要である。本研究は、病態の重篤化の新たな要因を見出したことに意義がある。今後、STAT1の活性とその下流標的分子の制御が難治性炎症性腸疾患の治療法としてさらに精査されることが望まれる。単一の治療法で強い効果が得られなくても、治療法の選択肢が増えれば、併用による相乗効果等も期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the precise roles of STAT1 and neuropeptide signaling through NK2R, a receptor of neurokinin A, in inflammatory bowel disease (IBD) involving with inflammation and immune responses by using a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model and in vitro experiments. We found that NK2R expression levels of macrophages and dendritic cells were augmented by type-1 IFN stimulations and involved in the inflammation and immune responses in a STAT-1-dependent manner. Next, we revealed that STAT1-mediated induction of a chemokine and its receptor were related to disease state of DSS-induced colitis model. Furthermore, we confirmed STAT1 activation and NK2R expression in lesion and inflammation areas of patients with IBD such as ulcerative colitis and Crohn's diseases. Based on these findings we speculate that regulation of STAT1 and neuropeptide signaling and the downstream molecules may be a promising strategy in the development of effective therapy for IBD.

研究分野：炎症性腸疾患、消化器外科

キーワード：炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、神経ペプチド、神経ペプチド受容体、STAT1、マクロファージ、樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先進国・日本において、潰瘍性大腸炎、クローン病などの難治性・慢性炎症性腸疾患が年々増加している。従って、その発症機序解明と病態の改善・治療を目指した基礎・臨床研究の実施は社会的なニーズの一つとなっている。

現在、本邦において潰瘍性大腸炎・クローン病に対しては、インフリキシマブ(抗 TNF- 抗体)などの生物学的製剤を使用され、ステロイド剤やアザチオプリン、タクロリムス、5-アミノサリチル酸などの抗炎症・免疫抑制剤の使用がなされ、大幅に患者の QOL の改善がなされたが、長期に渡り慢性的な苦痛をとめない、劇症化により外科的切除の必要な症例も多数存在している。

これまで申請者らはステロイド抵抗性好中球浸潤型の難治性気道炎症モデルマウスを作出し、神経ペプチドの一つ、ニューロキニン A の受容体である NK2R の拮抗阻害薬の投与が IFN- 刺激による気道過敏性の上昇を有意に抑制することを見出した。この発見は、NK2R を介した神経ペプチドシグナルが感染などにより惹起される過剰な免疫応答や慢性炎症反応に密接に関与することを明らかにした。また IFN- / や IFN- などの Type 1 サイトカインおよび LPS や polyI:C など TLR リガンド刺激による転写活性化因子、STAT1 依存的な Type 1 免疫応答において、マウスおよびヒト樹状細胞における NK2R の発現レベルが著しく上昇すること、さらにニューロキニン A/NK2R シグナルカスケードが樹状細胞を介した T 細胞応答を増強する、神経系と免疫系とのクロストーク機構の存在を確認した。

従って、本研究において、炎症性腸疾患の改善・克服を目指し、炎症・免疫細胞における STAT1 及び神経ペプチド受容体を介した神経ペプチドシグナルの活性化と免疫賦活メカニズムの解明を行なうとともに、慢性炎症性腸疾患患者や大腸癌の臨床検体、およびマウス大腸炎モデルを使用して、生体内での神経ペプチドシグナルの作用機序と疾患症状との関連を明らかにすることとした。

本研究の遂行により、神経ペプチド受容体を介した過剰な炎症・免疫応答が引き起こす難治性の慢性炎症性腸疾患の改善、さらに大腸癌の発生予防における新しい治療ターゲットの創出に繋ぐ、新しい科学的エビデンスを提供することが可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、STAT1 及び神経ペプチドであるサブスタンス P・ニューロキニン A の受容体(NK1R および NK2R)を介した炎症性腸疾患のシグナル伝達経路の活性化による新しい炎症・免疫制御メカニズムの解明を健康人末梢血単球や *in vitro* で誘導したマクロファージ・樹状細胞などの各種免疫担当細胞を使用して証明することを目指した。

さらに、神経ペプチドシグナルと慢性炎症性疾患の発症や大腸癌の発生との関連性について、ヒト炎症性腸疾患臨床検体およびマウス生体モデルを使用して検証することで、その詳細な生体内作用機序を明らかにし、新たな慢性炎症性腸疾患の改善・治療法の確立に資する科学的エビデンスを得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに同意を得られた健康人より末梢血を採取し、*in vitro* 培養系にてマクロファージ・樹状細胞(MoDC)、あるいは抗原特異的ヘルパー・キラー T 細胞を誘導し、各種刺激およびミミック分子や阻害剤などの存在下で共培養を行ない、各種サイトカイン産生に及ぼす効果を検証した。

さらに神経ペプチドシグナルを介した炎症反応・免疫制御機構を明らかにするため、IFN- / 、IFN- 、IL-6 や TNF- などのサイトカインや自然免疫系の受容体のアゴニストである、LPS や polyI:C などを用いてヒト単球、マクロファージ・樹状細胞を刺激した時の神経ペプチド(サブスタンス P やニューロキニン A)の産生レベルおよびそれらの受容体(NK1R・NK2R)の発現レベルを確認するとともに、単球、マクロファージ・樹状細胞について、炎症反応・免疫応答に関与する HLA クラス I、HLA クラス II、副刺激分子の発現レベル、さらにケモカイン、タイプ I サイトカインあるいは炎症性サイトカインの産生能を評価した。さらに、これらの機能制御分子群が、STAT1、NK1R あるいは NK2R の阻害剤添加で変動するかどうかを確認した。

また、ヒト末梢血単核球(PBMC)、炎症細胞、T 細胞とマクロファージ・樹状細胞との共培養を実施し、NK2R のアゴニストあるいは阻害剤添加で、エフェクター・パソジェニック細胞の分化・増殖に及ぼす効果やケモカイン・サイトカイン産生プロファイルが変動するかどうかを検証した。

これまで申請者が作出したマウス DSS 誘発大腸炎モデルについて、神経ペプチドシグナルの阻害剤を投与し、病態の改善・治療効果をより詳細に検証する。本治療モデルにおいて、マクロファージや樹状細胞のリポソーム封入薬剤投与による除去、また NK1.1、CD4 あるいは CD8 に対する抗体を用いて、NK 細胞、ヘルパー T 細胞やキラー T 細胞を除去した場合について、病態の変化を検証することで、神経ペプチドシグナルのエフェクター・パソジェニック細胞の同定を試みた。さらに、炎症性サイトカインあるいはケモカインに対する抗体や阻害剤を投与してその作用効果を確認し、本モデルの病態の発症・重篤化に関するエフェクターサイトカイン・ケモカインの特定を行なった。

以上の研究データをもとに、難治性の慢性炎症性腸疾患において、STAT1 の活性化及び神経ペプチドシグナルの亢進による炎症反応・免疫応答が病態の発症あるいは重篤化に關与することを検証した。

4. 研究成果

本研究において、健康人末梢血より単球を回収し、ヒト樹状細胞を誘導した。この単球由来樹状細胞における STAT1 阻害剤の添加、また神経ペプチド受容体 NK1R および NK2R の阻害あるいはノックダウンにより、サイトカイン産生能や抗原提示能が抑制されることを確認し、STAT1 の活性化及び神経ペプチドシグナルを介した樹状細胞の機能制御が、その後の炎症応答や抗原特異的 T 細胞免疫の賦活に重要であることを見出した。

また、ヒト臨床検体を用いた免疫組織染色による検討の結果、クローン病および潰瘍性大腸炎の患者腸組織において、免疫担当細胞の浸潤と神経ペプチド受容体(NK1R・NK2R)が発現されること、また STAT1 が活性化していることを見出した。また大腸癌患者腫瘍組織においても NK2R の発現が亢進していることも確認した。

さらに申請者らはマウス DSS 誘発大腸炎モデルを構築し、STAT1 欠損マウスを使用した場合や NK1R および NK2R の阻害剤を投与し、その作用効果を確認した。その結果、マウス DSS 誘発大腸炎モデルにおいて、神経ペプチドシグナルの阻害では病態はあまり改善しなかったが、病変に集積する炎症・免疫担当細胞群の集積が低減することを見出した。また、神経ペプチドの下流のシグナルの一つである STAT1 について、STAT1 欠損マウスでは、大腸炎における体重減少の軽減や病理組織学的検討で炎症所見の改善など、病態が改善していることがわかった。

そこで炎症を起こしている大腸組織より各種免疫担当細胞を単離し、遺伝子発現について検討したところ、STAT1 欠損マウスでは野生型マウスに比べて炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- α の遺伝子発現が低下していることを確認した。また樹状細胞やマクロファージを除去した条件では、大腸炎の病態が軽減することも確認した。さらにある種のケモカインとそれに対応するケモカイン受容体が、STAT1 欠損マウスの大腸組織において野生型マウスに比べて低下することを確認し、マウス DSS 誘発大腸炎モデルにおいてケモカイン受容体に対するアンタゴニストを投与したところ、大腸炎の病態が改善することを見出した。

さらに申請者らは、野生型マウスと STAT1 ノックアウトマウスから回収した脾臓細胞や腹腔内浸潤マクロファージ、あるいは骨髄より誘導した樹状細胞を用いた *in vitro* 培養系でも、LPS や IFN の刺激でケモカイン受容体の遺伝子発現の上昇が野生型マウスに比べて STAT1 ノックアウトマウスで抑制されるデータも得た。

これらの研究データから、STAT1 欠損条件下での大腸炎の病態改善には、マクロファージの質的な変化やケモカイン・ケモカイン受容体の発現抑制が關与していることが考えられた。従って、マクロファージにおける STAT1 の活性化およびその下流・關連分子であるケモカイン-ケモカイン受容体は、潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患や、その重篤化が起因となって発生する大腸がんの予防、改善及び治療における有望な創薬ターゲットとなりうる可能性があると考えた。

従って、本研究の実施により、最終的にヒト臨床応用が見込まれる、非常に有望な成果・エビデンスが得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Ohno Yosuke, Toyoshima Yujiro, Yurino Hideaki, Monma Norikazu, Xiang Huihui, Sumida Kentaro, Kaneumi Shun, Terada Satoshi, Hashimoto Shinichi, Ikee Kazuho, Homma Shigenori, Kawamura Hideki, Takahashi Norihiko, Taketomi Akinobu, Kitamura Hidemitsu, Lack of IL-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy、Cancer Science、査読有、108、2017、1959-1966
DOI : 10.1111/cas.13330.

Kitamura Hidemitsu, Ohno Yosuke, Toyoshima Yujiro, Ohtake Junya, Homma Shigenori, Kawamura Hideki, Takahashi Norihiko, Taketomi Akinobu, IL-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy、Cancer Science、査読有、108、2017、1947-1952
DOI : 10.1111/cas.13332.

北村 秀光、血清マイクロ RNA による免疫体質判定法の確立とコンパニオン診断薬への応用、化学工業、査読有、67、2016、27-33
DOI : なし

[学会発表](計13件)

木井 修平、北村 秀光、岡田 尚樹、項 慧慧、杉山 昂、川俣 太、大野 陽介、市川 伸樹、吉田 雅、柴崎 晋、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、DSS 誘発大腸炎モデルの病態発症における STAT1 シグナルの關与、第 119 回 日本外科学会定期学術集会(一般

演題) 2019

木井 修平、北村 秀光、項 慧慧、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、大野 陽介、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、DSS 誘発性大腸炎モデルにおける STAT1 シグナルの関与、第 73 回日本大腸肛門病学会学術集会 (一般演題) 2018

Shuhei Kii, Hidemitsu Kitamura, Yujiro Toyoshima, Naoki Okada, Huihui Xiang, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, STAT1 signal pathway is associated with inflammatory bowel disease, 13th scientific and annual meetings of the European society of coloproctology (国際学会) 2018

Xiang Huihui, Toyoshima Yujiro, Hashimoto Shinichi, Ikee Kazuho, Kobayashi K, Homma Shigenori, Kawamura Hideki, Takahashi Norihiko, Taketomi Akinobu, Kitamura Hidemitsu, Neuropeptide signaling through NK2R regulates tumorigenesis of colon cancer cells in vivo, The 37th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会) 2018

木井 修平、北村 秀光、項 慧慧、橋本 真一、池尾 一穂、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、大野 陽介、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、炎症性腸疾患における STAT1 の活性化を介したシグナルカスケードの関与、第 118 回 日本外科学会定期学術集会 (一般演題) 2018

木井 修平、北村 秀光、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、項 慧慧、寺田 聖、大野 陽介、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、炎症性腸疾患における STAT1 の関与、第 72 回日本大腸肛門病学会学術集会 (一般演題) 2017

北村 秀光、項 慧慧、豊島 雄二郎、木井 修平、橋本 真一、池尾 一穂、小林 博也、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、神経ペプチド受容体を介した腫瘍形成メカニズムの解明と新規がん治療法への応用、第 21 回 日本がん免疫学会総会 (一般演題) 2017

Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikee, Hiroya Kobayashi, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura, Neuropeptide signaling through NK2R is related to tumorigenesis in vivo, The 36th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会) 2017

木井 修平、北村 秀光、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、項 慧慧、寺田 聖、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、炎症性腸疾患における STAT1 の活性化を介したシグナルカスケードの関与、第 117 回 日本外科学会定期学術集会 (一般演題) 2017

Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hiroya Kobayashi, Hidemitsu Kitamura, Neuropeptide signaling through NK1R and NK2R is related to inflammation and tumorigenesis in vivo, 第 45 回 日本免疫学会学術集会 (一般演題) 2016

Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hiroya Kobayashi, Hidemitsu Kitamura, Neuropeptide signaling through NK1R and NK2R of cancer cells is required for promotion of tumorigenesis in vivo, 第 75 回 日本癌学会学術総会 (一般演題) 2016

北村 秀光、大竹 淳矢、寺田 聖、項 慧慧、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、木井 修平、大野 陽介、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、血清マイクロ RNA による抗腫瘍免疫応答の判定と個別化がん免疫治療への応用、第 8 回 血液疾患免疫療法学会 (一般演題) 2016

項 慧慧、豊島 雄二郎、寺田 聖、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、小林 博也、北村 秀光、神経ペプチドシグナルによる腫瘍形成促進メカニズムの解明と新規がん治療法への応用、第 20 回 日本がん免疫学会総会 (一般演題) 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高橋 典彦
ローマ字氏名：TAKAHASHI, Norihiko
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学病院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：30399894

研究分担者氏名：本間 重紀
ローマ字氏名：HOMMA, Shigenori
所属研究機関名：北海道大学
部局名：医学研究院
職名：講師
研究者番号（8桁）：30533674

研究分担者氏名：北村 秀光
ローマ字氏名：KITAMURA, Hidemitsu
所属研究機関名：北海道大学
部局名：遺伝子病制御研究所
職名：准教授
研究者番号（8桁）：40360531

研究分担者氏名：谷野 美智枝
ローマ字氏名：TANINO, Mishie
所属研究機関名：旭川医科大学
部局名：病院病理部
職名：教授
研究者番号（8桁）：90360908

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。