

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2022

課題番号：17KK0166

研究課題名（和文）炎症性腸疾患において腸管マクロファージが腸管粘膜の損傷を修復するメカニズムの解明

研究課題名（英文）A Research of Epithelium-Immune Interaction during Mucosal Repair in Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

林 周作（Hayashi, Shusaku）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：10548217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,700,000円

渡航期間： 33ヶ月

研究成果の概要（和文）：炎症でダメージを受けた大腸粘膜では、上皮細胞と免疫細胞とのクロストークを中心とする粘膜治癒により粘膜が再生されるが、粘膜治癒は複雑なイベントであり、未だ不明な点が多い。そこで、粘膜治癒のメカニズムを解明するために、ミシガン大学医学部との国際共同研究を実施し、これまで炎症性メディエーターとして認識されていたロイコトリエンB4とその受容体BLT1によって調節される粘膜治癒の新たなメカニズムを発見した。すなわち、大腸上皮細胞がBLT1を発現しており、炎症下ではその発現が上昇することで、大腸上皮細胞のBLT1が傷害後の粘膜治癒を促進する役割を担うことを細胞レベルおよび生体レベルにて証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大腸上皮細胞に発現するBLT1によって調節される大腸粘膜での粘膜治癒の新たなメカニズムを示した。粘膜治癒の調節には、炎症反応と修復反応のバランスが重要である。従来、もっぱら炎症を惹起するとされてきたロイコトリエンB4-BLT1経路が粘膜治癒を促すことを証明した本研究成果は、複雑な粘膜治癒イベントの解明に貢献するもので、粘膜治癒の達成が再燃予防の鍵となる炎症性腸疾患に対する有用な新規コンセプトを持つ治療戦略の創出への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）： Damaged colonic mucosa by inflammation is regenerated through mucosal repair centered on crosstalk between epithelial cells and immune cells, however mucosal repair is a complex event and details are still unknown. Therefore, in order to clarify mechanisms of mucosal repair, we conducted an international joint research with the University of Michigan School of Medicine. As a result, we discovered a new mechanism of mucosal repair regulated by leukotriene B4 and its receptor BLT1, which have been recognized as inflammatory mediators. In other words, we demonstrated for the first time at the cellular and biological levels that colonic epithelial cells express BLT1, its expression is elevated under inflammation, and that BLT1 in colonic epithelial cells plays a role in promoting mucosal repair after injury.

研究分野：粘膜薬理学

キーワード：粘膜治癒 大腸上皮細胞 遊走 BLT1 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease; IBD) は、潰瘍性大腸炎とクローン病を指し、腸管における原因不明の慢性炎症疾患である。また、厚生労働省の指定難病の中で患者数が最も多い。腸内細菌に代表される外界と常に接している大腸粘膜では、“寛容と排除”という両極端の反応を支配する粘膜免疫システムを中心とした粘膜バリア機構が高度に発達している。IBD の原因は不明であるが、IBD 病態の形成には、粘膜バリア機構の破綻によって引き起こされる過剰な炎症反応が必須であると考えられている。また、IBD は活動期と寛解を繰り返す慢性炎症疾患であるため、これまで IBD に対する治療薬開発は、過剰な炎症を抑制し寛解に導くことをコンセプトに行われてきた。よって、寛解導入に用いられる IBD 治療薬の選択肢は比較的多く、IBD 患者の症状に合わせた寛解導入が可能となってきている。しかし、既存の薬剤では導入に成功しても寛解を長期間維持することが出来ず再燃してしまう症例も多く、寛解維持や再燃予防を目的に開発された IBD 治療薬は存在しない。

近年、速やかに炎症を収束させ、炎症により傷害された大腸粘膜の治癒を積極的に促し、粘膜バリア機構を出来るだけ早くかつ正確に再生することによって、再燃を繰り返す悪循環を断ち切り、長期寛解維持を実現する IBD の治療コンセプトが世界的に注目されている。報告者は、長期寛解維持を実現するために、粘膜治癒を標的とした IBD に対する有用な新規治療薬の創出を目指して、粘膜治癒を制御するメカニズムを明らかにする病態生理学的研究を行っている。

粘膜治癒は、上皮細胞と好中球、単球やマクロファージなどの免疫細胞ならびに間質細胞などがサイトカインや脂質メディエーターを介して、時空間的にクロストークすることで精巧かつ複雑に調節されている。報告者は、大腸粘膜治癒における上皮細胞と免疫細胞とのクロストークを解明するために、本分野をリードする研究者の一人であるミシガン大学医学部の Asma Nusrat 教授との国際共同研究を開始した。

国際共同研究の過程で好中球の除去が傷害後の粘膜治癒を遅延させることを観察し、好中球が粘膜治癒において重要な役割を担うと考え、好中球と上皮細胞とのクロストークに着目した。好中球は、脂質メディエーターであるロイコトリエン B₄ (LTB₄) を分泌し、LTB₄ はその受容体 BLT1 に結合して炎症環境への好中球を含む免疫細胞の遊走を促す。これまでに IBD 患者の大腸粘膜において LTB₄ レベルの上昇が観察されることから、LTB₄-BLT1 経路の活性化は、大腸での炎症病態の形成に関与すると推察されてきた。一方、炎症反応と密接に関連する粘膜治癒では、これまで主に炎症を惹起すると認識されてきた因子が、上皮細胞に作用して治癒を促すことが明らかにされてきている。しかし、傷害後の粘膜治癒における LTB₄-BLT1 経路の病態生理学的意義については、大腸上皮細胞での BLT1 の発現を含めて不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、国際共同研究を実施し、炎症によって傷害された大腸粘膜の治癒における BLT1 の役割を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には、C57BL/6 マウスおよび BLT1 を欠損した遺伝子組換えマウス (BLT1 欠損マウス) を使用した。すべての実験は、実験動物の管理と使用に関する指針に従い、ミシガン大学または富山大学の動物実験委員会の承認を受けて実施した。

(2) 大腸オルガノイド

ヒト 3D 大腸オルガノイドは、ミシガン大学の Translational Tissue Modeling Laboratory から提供されたものを維持し、実験に用いた。マウス 3D 大腸オルガノイドは、C57BL/6 マウスまたは BLT1 欠損マウスから単離した大腸クリプトを 3D 培養して作製した。2D 大腸オルガノイドは、ヒトまたはマウス 3D 大腸オルガノイドから作製し、実験に用いた。

(3) RNAscope (高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション)

ヒトまたはマウス大腸粘膜の凍結組織切片を用いた。In situ ハイブリダイゼーションは、RNAscope Multiple Fluorescent Reagent Kit v2 のプロトコルに従い行った。画像は、共焦点顕微鏡で取得し、Qupath を用いて BLT1 mRNA の発現レベルを定量した。

(4) 大腸粘膜治癒の解析

In vivo モデル：生体内での大腸粘膜治癒は、マウスの大腸粘膜に生検鉗子で傷を作製後、傷害 1 日後と 3 日後に大腸内視鏡で傷を観察し、傷害 1 日後と 3 日後の傷の大きさを測定することで評価した。

In vitro モデル：ヒトまたはマウス 2D 大腸上皮単層あるいは大腸上皮細胞株 SKCO-15 を培養し、ピペットチップで傷を作製後、1 時間ごとに傷害部を撮影し、傷の大きさを測定することで大腸上皮の治癒を評価した。

(5) 上皮細胞の遊走の解析

ヒトまたはマウス 2D 大腸上皮単層に傷を作製後、30 分ごとに傷害部をタイムラプス撮影し、傷害部先端の細胞を追跡した。DiPer プログラムで細胞遊走に関するパラメーターを解析した。

4. 研究成果

ヒトおよびマウスの大腸粘膜における BLT1 mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析したところ、大腸上皮細胞および粘膜固有層の免疫細胞が BLT1 mRNA を発現していた。

大腸粘膜での治癒における BLT1 の役割を検討するために、生検によるマウス大腸粘膜傷害の治癒過程での BLT1 mRNA の発現および局在を解析した。傷害部では、正常粘膜に比べて傷害後 24 時間および 48 時間に BLT1 mRNA の発現が有意に上昇していた。傷害 48 時間後の大腸粘膜では、傷害底部および傷に隣接した上皮細胞において BLT1 mRNA の発現が上昇していた。

ヒト IBD 患者の大腸粘膜のクリプトでは、炎症を認めない対照サンプルに比べて BLT1 mRNA の発現が上昇していた。

よって、大腸粘膜では炎症や傷害によって上皮細胞での BLT1 の発現が上昇することが明らかとなった。

傷害された大腸上皮の治癒における LTB₄-BLT1 経路の役割を明らかにするために、大腸上皮細胞株 SKCO-15 を用いた *in vitro* モデルでの LTB₄ の効果を評価した。LTB₄ は濃度依存的に治癒を促進し、BLT1 阻害薬の前処理は LTB₄ による治癒の促進効果を抑制した。

また、ヒトおよびマウス 2D 大腸オルガノイドにおいても同様に、LTB₄-BLT1 経路は大腸上皮の治癒を促した。さらに、BLT1 欠損マウス由来の 2D 大腸オルガノイドでは、野生型マウスに比べて、傷害後の治癒が遅延しており、LTB₄ による治癒促進効果は認められなかった。

現在、傷ついた粘膜の炎症環境が上皮の治癒反応を調節することが認識されている。そこで、炎症性サイトカインである TNF- α と IFN- γ が、大腸上皮細胞における BLT1 の発現に与える影響を解析した。TNF- α と IFN- γ の同時処置は、ヒト 3D および 2D 大腸オルガノイドでの BLT1 mRNA 発現を上昇させた。さらに TNF- α と IFN- γ の同時処置は、LTB₄ による大腸上皮の治癒促進効果を増強させ、この作用は BLT1 阻害薬の前処理により濃度依存的に抑制された。

傷害後の治癒は上皮細胞の遊走と増殖によって制御されるため、BLT1 の活性化が治癒過程における大腸上皮細胞の遊走を促進するかについて調べた。DiPer プログラムで細胞遊走に関するパラメーターを解析した結果、LTB₄ の刺激は、傷害後の野生型マウス由来 2D 大腸オルガノイドの遊走パラメーター (mean square displacement、方向性の持続性および速さ) を亢進させた。一方、BLT1 欠損マウス由来 2D 大腸オルガノイドでは野生型マウスに比べて遊走パラメーターが低下しており、LTB₄ 刺激は何ら影響を与えなかった。すなわち BLT1 の活性化は、大腸上皮細胞をより早くかつストレートに遊走させることが示された。

また、BLT1 の活性化は、傷害後の大腸上皮細胞での Src および FAK のリン酸化タンパク質の発現を上昇させており、LTB₄-BLT1 経路が、大腸上皮細胞での細胞接着斑のリモデリングを制御することが示唆された。

さらに、LTB₄-BLT1 経路による治癒促進には、大腸上皮細胞の増殖亢進が関与することも観察された。

生体レベルでの大腸粘膜治癒における BLT1 の役割を明らかにするため、大腸粘膜を生検鉗子で傷害し、その後の粘膜治癒を評価した。BLT1 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて傷害後 3 日目において粘膜治癒が遅延していた。大腸上皮細胞および免疫細胞はどちらも BLT1 を発現していることから、どちらの細胞に発現する BLT1 が粘膜治癒に寄与するのかを検討するため、骨髄キメラマウスを作製した。骨髄キメラマウスは、実験的にレシピエントの骨髄細胞をドナー由来の骨髄細胞と交換したマウスで、造血細胞がドナー由来、非造血細胞がレシピエント由来の性質を有する。骨髄キメラマウスを用いた結果、生体レベルにおいて傷害された大腸粘膜の治癒には、造血細胞 (免疫細胞) に発現する BLT1 および上皮細胞を含む非造血細胞に発現する BLT1 が寄与することが示された。

以上の結果は、大腸上皮細胞の BLT1 が傷害された大腸粘膜の治癒を促進する役割を担うことを示している。また、炎症環境下において、大腸上皮細胞での BLT1 の発現が上昇し、BLT1 の活性化は大腸上皮細胞の遊走を促進することが明らかとなった。

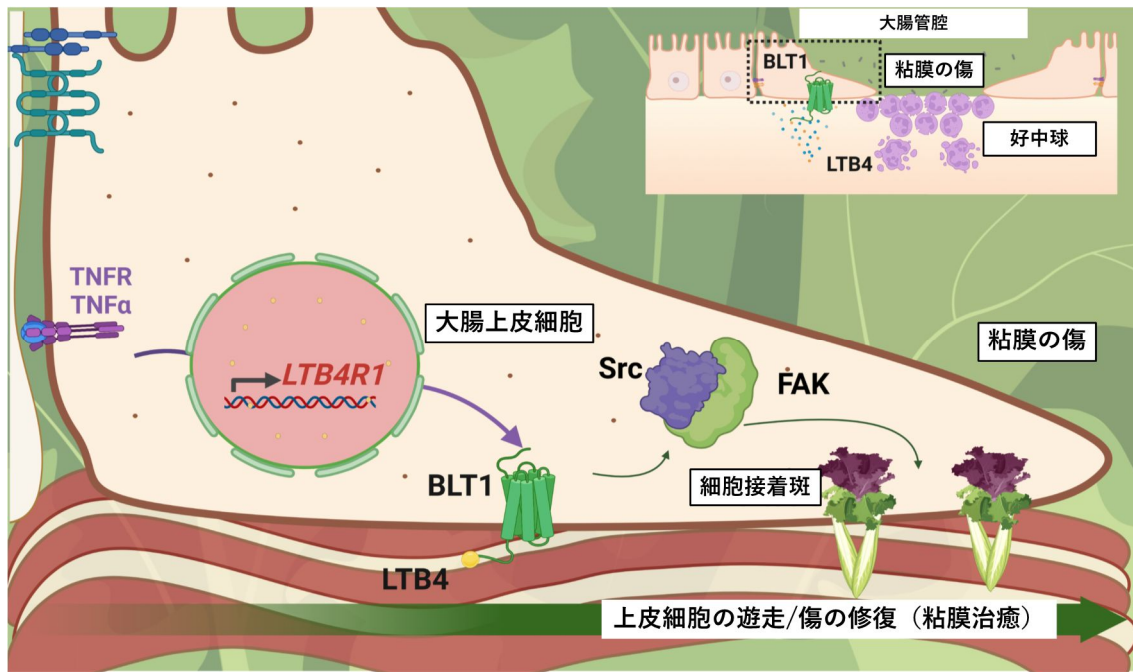


図. 大腸上皮細胞は BLT1 受容体を発現しており、炎症環境下 (TNF α /TNFR 刺激) で BLT1 発現が上昇する。LTB $_4$ による BLT1 の活性化は、細胞接着斑のリモデリングを介して大腸上皮細胞の遊走を亢進し、大腸粘膜の傷の修復 (粘膜治癒) を促す。

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 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hertati Ai, Hayashi Shusaku, Ogata Hanako, Miyata Kana, Kato Ryo, Yamamoto Takeshi, Kadowaki Makoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Morphological elucidation of short-chain fatty acid receptor GPR41-positive enteric sensory neurons in the colon of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e05647	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 該当する
1. 著者名 Hertati Ai, Hayashi Shusaku, Ogawa Yudai, Yamamoto Takeshi, Kadowaki Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-4 Receptor Subunit Deficiency Alleviates Murine Intestinal Inflammation In Vivo Through the Enhancement of Intestinal Mucosal Barrier Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 573470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.573470	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 該当する
1. 著者名 Zhang Yue, Yamamoto Takeshi, Hayashi Shusaku, Kadowaki Makoto	4. 巻 141
2. 論文標題 Suppression of plasmacytoid dendritic cell migration to colonic isolated lymphoid follicles abrogates the development of colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.111881	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 Yashiro Tomoe, Ogata Hanako, Zaidi Syed Faisal, Lee Jaemin, Hayashi Shusaku, Yamamoto Takeshi, Kadowaki Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathophysiological Roles of Neuro-Immune Interactions between Enteric Neurons and Mucosal Mast Cells in the Gut of Food Allergy Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10071586	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 Kanauchi Yuya, Yamamoto Takeshi, Yoshida Minako, Zhang Yue, Lee Jaemin, Hayashi Shusaku, Kadowaki Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates murine experimental Th2-type colitis by suppressing the migration of plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04154-2	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 Kadowaki Makoto, Yamamoto Takeshi, Hayashi Shusaku	4. 巻 71
2. 論文標題 Neuro-immune crosstalk and food allergy: Focus on enteric neurons and mucosal mast cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 278 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.03.004	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 Hayashi Shusaku, Muraleedharan Chithra K., Oku Makito, Tomar Sunil, Hogan Simon P., Quiros Miguel, Parkos Charles A., Nusrat Asma	4. 巻 7
2. 論文標題 Intestinal epithelial BLT1 promotes mucosal repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e162392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.162392	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shusaku Hayashi, Yudai Ogawa, Takeshi Yamamoto, Makoto Kadowaki
2. 発表標題 炎症性腸疾患において再燃予防を実現する治療戦略の提案
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashi Shusaku, Quiros Miguel, Oku Makito, Parkos Charles A., Nusrat Asma
2. 発表標題 腸管上皮BLT1は腸管粘膜の創傷治癒において重要な役割を担う
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ヌスラ アスマ (Nusrat Asma)	ミシガン大学・Department of Pathology・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	パークス チャールズ (Parkos Charles)	ミシガン大学・Department of Pathology・Professor	

6. 研究組織（つづき）

	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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	キロス ミゲル (Quiros Miguel)	ミシガン大学・Department of Pathology・Research Assistant Professor	

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			
アメリカ合衆国	University of Michigan			