

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06698

研究課題名(和文) 腸管マクロファージのIL-10産生亢進作用をもつ炎症性腸疾患の新たな治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapeutic Medicines for Inflammatory Bowel Disease with Enhancement of IL-10 Production in Intestinal Macrophages

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症性腸疾患(IBD)治療において再燃を予防し、長期寛解維持を実現する有用な治療戦略を提示することを目的に、腸管粘膜に存在する腸管マクロファージでのインターロイキン(IL)-10産生を亢進させる薬物のスクリーニングから見出した生薬由来化合物ベルベリンの薬理作用の解明を行った。

本研究結果から、ベルベリンはIBD再燃モデルに対して有効であり、その作用機序には腸管マクロファージでのfatty acid synthase活性化を介したIL-10産生の亢進による傷害腸管粘膜の修復促進の関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患(IBD)に対する治療薬開発は、過剰な炎症を抑制して寛解に導くことをコンセプトに行われてきたが、現在では再燃させることなく、長期間寛解を維持させることが最大の目標とされている。また、これまで有用なIBD再燃モデルは開発されておらず、候補薬物が再燃を予防し、長期寛解維持を実現するかの臨床予測性は困難であった。よって、本研究にて得られた成果は、IBD治療において選択肢の少ない寛解維持療法の開発研究を推進する波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have proposed that the enhancement of interleukin (IL)-10 production in the intestinal macrophages has the potential to be a novel therapeutic mechanism for maintaining the remission of inflammatory bowel disease (IBD) and found berberine as a candidate compound for IL-10 enhancer. In the present study, we developed a useful experimental animal model to evaluate the relapse phase of IBD and investigated the effect of berberine on this model. Berberine significantly attenuated colitis symptoms during the relapse phase of IBD relapse model. Furthermore, we detected fatty acid synthase (FAS) as a candidate target protein. FAS inhibitor suppressed the IL-10 production of macrophages enhanced by berberine in a concentration-dependent manner. This study suggests that FAS activators such as berberine may be useful in developing a novel therapeutic strategy aimed at preventing relapse in IBD.

研究分野：薬理学、粘膜免疫学、幹細胞生物学

キーワード：炎症性腸疾患 腸管マクロファージ IL-10 Fatty acid synthase 再燃予防 粘膜治癒 上皮細胞

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、腸管における病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。絶えず細菌叢や食事抗原などの外界と接している腸管粘膜では、“寛容と排除”という両極端の反応を支配する腸管粘膜粘液システムを中心とした粘膜バリアが高度に発達している。IBD の病態形成には、腸管粘膜免疫システムの異常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 は再燃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を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 治療薬の選択肢は多く、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する症例も多いため、現在の IBD 治療では再燃させることなく長期間、寛解を維持させることが最大の目標とされている。よって、長期の寛解維持を可能とする有用で新規な治療法および治療薬の創出が強く求められている。

近年、速やかに炎症を収束させ、さらに炎症により傷害された腸管粘膜の修復を積極的に促し、腸管粘膜バリアを出来るだけ早くかつ正確に再構築することにより、再燃を繰り返す悪循環を断ち切り、長期寛解維持を目指す IBD 治療の新規コンセプトが提唱され、世界的に注目されている。腸管粘膜免疫システムでは、免疫細胞を始めとして上皮細胞、間質細胞や神経細胞などの多様な細胞が連携して腸管粘膜の恒常性を維持している。特に、腸管マクロファージは抗炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -10 の主要な産生細胞として働いており、腸管粘膜の恒常性維持において中心的な役割を担うことが知られている。

これまで報告者らの研究グループは、腸管マクロファージを除去したマウスでは、炎症により傷害された腸管粘膜の修復が遅延することを見出している。さらに、腸管マクロファージが IL-10 を介して腸管粘膜バリアの再構築に寄与することも近年報告されている。

そこで報告者は、腸管マクロファージでの IL-10 産生を亢進させる薬物は、炎症によって傷害された腸管粘膜の修復を促し、腸管粘膜バリアを再構築するため、長期寛解維持を実現する有用な新規コンセプトをもつ IBD 治療薬となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、「腸管マクロファージの IL-10 産生を亢進させる薬物が IBD 病態において再燃を予防し、長期寛解維持を可能とする」というコンセプトの実証を目的にして、臨床予測性の高い IBD 再燃モデルの開発およびベルベリンの有効性について検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 骨髄造血幹細胞由来マクロファージ (BMDMs) の作製

骨髄造血幹細胞由来マクロファージ (BMDMs) は、C57BL/6 マウスの脛骨および大腿骨から採取した骨髄造血幹細胞を macrophage colony-stimulating factor 存在下で 7 日間培養し作製した。

(2) Drug affinity responsive target stability (DARTS) 法

BMDMs の細胞ライセートをベルベリンと反応させた後、タンパク質分解酵素である thermolysin で処理し、サンプルを準備した。サンプルを SDS-PAGE にて分離後、ゲルを銀染色し、溶媒処理群と比較してベルベリン処理群で濃いバンドをゲルから切り出した。nonoLC-MS/MS を行い、切り出したゲルに含まれるタンパク質を同定した。

(3) IBD 再燃モデルの作製

炎症惹起物質デキストラン硫酸ナトリウム (DSS; 36-50 kDa) の 3% 水溶液を C57BL/6 マウスに 5 日間自由飲水させて大腸炎を誘発した後、9 日間の回復期間をおき、再び 2% DSS 水溶液を 6 日間自由飲水させることで作製した。ベルベリン (100 mg/kg/day) は 9 日間の回復期間中のみ経口投与し、ベルベリン投与終了時点である 14 日目と実験最終日である 20 日目に大腸組織を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色による病理学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) BMDMs をリポ多糖 (LPS; 100 ng/mL) で 4 時間刺激後、回収した培養上清中の IL-10 タンパク質の濃度を測定した。ベルベリン (1-10 μ M) は、LPS 刺激 1 時間前に加えた。ベルベリンは、BMDMs の IL-10 分泌を濃度依存的かつ有意に増加させた。また、ベルベリンは、BMDMs での IL-10 mRNA 発現を有意に上昇させた。

(2)ベルベリンがマクロファージにおいて直接結合するタンパク質を探索するため、DARTS 法を行い、fatty acid synthase (FAS) を候補タンパク質として同定した。FAS 阻害薬セルレニン、BMDMs でのベルベリンによる IL-10 産生の亢進を濃度依存的かつ有意に抑制した。

(3)ベルベリン (100 mg/kg/day) の 3 日間経口投与は、マウス大腸組織での IL-10 mRNA 発現を溶媒投与群に比べて有意に上昇させた。

(4)IBD 再燃モデルに対するベルベリンの効果を検討したところ、ベルベリンの経口投与は、再燃期間における大腸炎症状の再発を有意に抑制した。さらに、再燃期間前のベルベリン投与終了時点にて、ベルベリン投与群では溶媒投与群と比較して大腸粘膜構造の病的変化が改善されており、ベルベリンが炎症によって傷害された大腸粘膜の修復を促すことが示唆された。

以上の研究成果は、ベルベリンが IBD 再燃モデルにおける大腸炎症状の再発を抑制し、腸管粘膜構造の病理学的異常を改善することを示している。その作用機序には、腸管マクロファージでの FAS の活性化を介した IL-10 産生の亢進による腸管粘膜の修復促進が示唆された。従って、ベルベリンを含む FAS を活性化させる薬物は、長期寛解維持を目的とした IBD の治療薬開発において有用なリード化合物になることが期待される。

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 5件）

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 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 ~ 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 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 Koizumi Keiichi, Oku Makito, Hayashi Shusaku, Inujima Akiko, Shibahara Naotoshi, Chen Luonan, Igarashi Yoshiko, Tobe Kazuyuki, Saito Shigeru, Kadowaki Makoto, Aihara Kazuyuki	4. 巻 2020
2. 論文標題 Suppression of Dynamical Network Biomarker Signals at the Predisease State (Mibyō) before Metabolic Syndrome in Mice by a Traditional Japanese Medicine (Kampo Formula) Bofutsushosan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/9129134	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	4. 巻 140
2. 論文標題 Unraveling the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Search for New Therapeutic Medicines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 123~128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00164	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 Koizumi Keiichi, Oku Makito, Hayashi Shusaku, Inujima Akiko, Shibahara Naotoshi, Chen Luonan, Igarashi Yoshiko, Tobe Kazuyuki, Saito Shigeru, Kadowaki Makoto, Aihara Kazuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Identifying pre-disease signals before metabolic syndrome in mice by dynamical network biomarkers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45119-w	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 林 周作, 小川雄大, 山本 武, 門脇 真.
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 小川雄大, 林 周作, 山本 武, 門脇 真.
2. 発表標題 腸管マクロファージでのIL-10 産生を亢進させ るベルベリンは炎症性腸疾患モデルにおける再燃を抑制する.
3. 学会等名 富山薬学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川雄大, 若林ののか, 林 周作, 山本 武, 門脇 真
2. 発表標題 腸管マクロファージでのIL-10産生亢進作用を有するベルベリンの新規炎症性腸疾患治療薬としての可能性
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi S., Wakabayashi N., Kadowaki M.
2. 発表標題 Berberine Chloride Suppresses the Development of Murine Acute Colitis due to the Enhancement of IL-10 Production in Macrophages.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 周作, 門脇 真.
2. 発表標題 腸管マクロファージのIL-10産生を亢進する薬物の炎症性腸疾患の治療への応用. シンポジウム「炎症性疾患の病態薬理研究と創薬のための標的分子の提案」.
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 周作.
2. 発表標題 炎症性腸疾患の病態解明と新たな治療薬の探索研究. 学術奨励賞受賞講演.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第130回例会
4. 発表年 2018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		
米国	University of Michigan		