

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08455

研究課題名(和文) 自然免疫担当分子RIP2を標的とする炎症性腸疾患の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment targeting RIP2 in inflammatory bowel diseases

研究代表者

渡邊 智裕 (WATANABE, TOMOHIRO)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：40444468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：RIP2は自然免疫反応受容体であるTLR及びNOD2の下流分子として機能する。我々はマウス腸炎モデルを用いることにより、樹状細胞が腸内細菌を認識することによって、活性化されるTLRs-RIP2経路が実験腸炎の発症に病的な役割を果たすことを見出した。さらに、炎症性腸疾患患者の炎症局所のサンプルを用いることにより、RIP2の活性化が炎症性サイトカインの産生・疾患活動性と強い相関を示すことを明らかにした。以上の結果から、RIP2が炎症性腸疾患の新規治療標的として有望であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サイトカインを標的とする生物製剤の登場により、炎症性腸疾患患者の寛解導入率は向上した。しかしながら、現行の生物製剤を用いても、炎症性腸疾患の寛解導入成功率は約50%に留まっている。このように、炎症性腸疾患の新規治療法開発はUnmet medical needsの一つである。本研究では、RIP2というこれまで注目されていなかった分子に着目し、RIP2の活性化という視点から炎症性腸疾患の病態解明を試みた。その結果、RIP2の活性化が炎症性腸疾患の発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。この成果はRIP2を標的とする炎症性腸疾患の新規治療薬開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Receptor-interacting protein 2 (RIP2) is a downstream signaling molecule for toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2). In this study, we addressed whether activation of RIP2 play pathogenic roles in the development of IBD. We found that sensing of commensal intestinal bacteria by TLRs expressed in dendritic cells induces pro-inflammatory cytokine responses through activation of RIP2 and that excessive activation of RIP2 caused the development of experimental colitis. In studies utilizing colonic biopsy samples from IBD patients, activation of RIP2 was parallel to expression of pro-inflammatory cytokines and disease activity. These murine and human IBD studies strongly support that RIP2 can be a novel treatment target for IBD.

研究分野：消化器免疫学

キーワード：RIP2 炎症性腸疾患 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Receptor-interacting serine/threonine kinase 2 (RICK/RIPK2/RIP2)は自然免疫反応受容体である Toll-like receptor (TLRs)及び Nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2)の下流分子として機能する。NOD2 の機能消失型遺伝子変異はクローン病発症の最大の危険分子である。我々は「NOD2 変異がどのようなメカニズムにより、クローン病を引き起こすのか？」その解明に取り組んできた。その結果、以下の事実を見出した。

- (1) 腸内細菌由来分子である Muramyl dipeptide (MDP)は樹状細胞における NOD2 を活性化させる。
- (2) NOD2 の活性化は自然免疫反応の負の制御因子である Interferon regulatory factor 4 (IRF4)の発現を誘導する。
- (3) 上記の結果、誘導された IRF4 は TLR の下流分子である RIP2 のユビキチン化を制御し、TLR を介する炎症性サイトカイン反応を抑制する。

これらの結果から、腸内細菌により正常型 NOD2 が活性化されると、IRF4 の発現誘導を介して、腸内細菌によって活性化される TLR-RIP2 を介する炎症性サイトカイン反応が抑制され、腸炎の発症が防止されることが判明した。逆に、クローン病関連型 NOD2 変異の存在下では MDP による NOD2 の活性化と IRF4 の発現誘導がないため、TLR-RIP2 経路が過剰に活性化される結果、腸炎が誘導されることが明らかになった。しかしながら、TLR-RIP2 経路が腸炎の発症に果たす役割の詳細については明らかになっていない。

2. 研究の目的

TLR-RIP2 経路が炎症性腸疾患の発症に果たす役割について、実験腸炎モデルとヒト炎症性腸疾患サンプルの双方で検討する。これらの検討を介して、炎症性腸疾患の新規治療標的として RIP2 が有用かどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウス腸炎モデルを用いた検討
実験腸炎モデルマウスとして DSS 腸炎と TNBS 腸炎を用いた。RIP2 siRNA の投与が実験腸炎モデルの発症に及ぼす効果について検討した。
上記の検討を NOD2 欠損マウス・NOD1/NOD22 重欠損マウスにおいて行い、腸炎の発症に関わる RIP2 シグナル伝達経路の解明を目指した。
- (2) 炎症性腸疾患の検体を用いた検討
クローン病・潰瘍性大腸炎患者の生検組織サンプルを用いて、RIP2 及びそのシグナル伝達経路の活性化と炎症性サイトカイン・疾患活動性の関係を qPCR 法にて、解析した。
クローン病・潰瘍性大腸炎患者の手術サンプルを用いて、RIP2 及びそのシグナル伝達経路の活性化と炎症性サイトカイン・疾患活動性の関係を immunofluorescence 法にて解析した。
- (3) ATG16L1 と RIP2 の活性化に関する検討
ATG16L1 は NOD2 とともにクローン病疾患感受性遺伝子である。ATG16L1 が RIP2 の活性化を抑制するかどうかを以下の手法で検討した。
ATG16L1 が RIP2 と結合し、TLRs-RIP2 経路の活性化を抑制するかどうかを強制発現細胞モデルと内因性にこれらの分子を発現する樹状細胞で検討した。
クローン病・潰瘍性大腸炎患者の手術サンプルを用いて、ATG16L1 の発現が RIP2 シグナル伝達経路の活性化に及ぼす効果を immunofluorescence 法にて解析した。

4. 研究成果

- (1) マウス腸炎モデルを用いた検討
RIP2 siRNA の投与は TNBS 腸炎あるいは DSS 腸炎の発症を効率良く防止した。その効果は腸管免疫細胞の産生する炎症性サイトカイン (IL-6/TNF- α /IL-12p40) の産生抑制を伴っていた。
RIP2 siRNA の投与は NOD2 欠損マウス・NOD1/NOD22 重欠損マウスにおいても腸炎の発症を抑制し、TLRs-RIP2 経路が病的な役割を果たすことが明らかになった。

(2) 炎症性腸疾患の検体を用いた検討

RIP2 及びそのシグナル伝達経路 (cIAP1,2, TRAF6, TAK1) の活性化が炎症性サイトカイン (IL-6/TNF- α /IL-12p40) の発現及び疾患活動性と強い相関性を示した、クローン病・潰瘍性大腸炎患者の手術サンプルでは、RIP2-TAK1 あるいは cIAP-RIP2 の結合が炎症性サイトカインと強い相関を示すことを見出した。

(3) ATG16L1 と RIP2 の活性化に関する検討

ATG16L1 が RIP2 の Kinase domain と結合し、TLR-RIP2 経路の活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を低下させることを明らかにした。

クローン病・潰瘍性大腸炎患者の手術サンプルを用いて、ATG16L1 の発現が RIP2 シグナル伝達経路の活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を低下させることを見出した。

以上の結果から、樹状細胞における「TLRs-cIAPs-RIP2-TRAF6-TAK1 経路」が炎症性腸疾患の発症に病的な役割を果たすこと、RIP2 が炎症性腸疾患の治療標的として有望であることを明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaki Sho, Watanabe Tomohiro, Arai Yasuyuki, Sekai Ikue, Hara Akane, Kurimoto Masayuki, Otsuka Yasuo, Masuta Yasuhiro, Yoshikawa Tomoe, Takada Ryutaro, Kamata Ken, Minaga Kosuke, Yamashita Kouhei, Kudo Masatoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression levels of cellular inhibitor of apoptosis proteins and colitogenic cytokines are inversely correlated with the activation of interferon regulatory factor 4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cei/uxac005	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 Takada Ryutaro, Watanabe Tomohiro, Hara Akane, Sekai Ikue, Kurimoto Masayuki, Otsuka Yasuo, Masuta Yasuhiro, Yoshikawa Tomoe, Kamata Ken, Minaga Kosuke, Kudo Masatoshi	4. 巻 568
2. 論文標題 NOD2 deficiency protects mice from the development of adoptive transfer colitis through the induction of regulatory T cells expressing forkhead box P3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.068	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 Honjo Hajime, Watanabe Tomohiro, Arai Yasuyuki, Kamata Ken, Minaga Kosuke, Komeda Yoriaki, Yamashita Kouhei, Kudo Masatoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 ATG16L1 negatively regulates RICK/RIP2-mediated innate immune responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 91 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa062	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 Kamata K., Watanabe T., Minaga K., Hara A., Sekai I., Otsuka Y., Yoshikawa T., Park A. M., Kudo M.	4. 巻 202
2. 論文標題 Gut microbiome alterations in type 1 autoimmune pancreatitis after induction of remission by prednisolone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 308 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13509	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 Minaga Kosuke, Watanabe Tomohiro, Hara Akane, Kamata Ken, Omoto Shunsuke, Nakai Atsushi, Otsuka Yasuo, Sekai Ikue, Yoshikawa Tomoe, Yamao Kentaro, Takenaka Mamoru, Chiba Yasutaka, Kudo Masatoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of serum IFN- and IL-33 as novel biomarkers for type 1 autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71848-4	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 Minaga K, Watanabe T, Arai Y, Shiokawa M, Hara A, Yoshikawa T, Kamata K, Yamashita K, Kudo M	4. 巻 55
2. 論文標題 Activation of interferon regulatory factor 7 in plasmacytoid dendritic cells promotes experimental autoimmune pancreatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 565-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01662-2	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 Kamata Ken, Watanabe Tomohiro, Minaga Kosuke, Hara Akane, Yoshikawa Tomoe, Okamoto Ayana, Yamao Kentaro, Takenaka Mamoru, Park Ah-Mee, Kudo Masatoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Intestinal dysbiosis mediates experimental autoimmune pancreatitis via activation of plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 795 ~ 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz050	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 Watanabe Tomohiro, Minaga Kosuke, Kamata Ken, Sakurai Toshiharu, Komeda Yoriaki, Nagai Tomoyuki, Kitani Atsushi, Tajima Masaki, Fuss Ivan J, Kudo Masatoshi, Strober Warren	4. 巻 31
2. 論文標題 RICK/RIP2 is a NOD2-independent nodal point of gut inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 669 ~ 683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz045	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田隆太郎, 渡邊 智裕, 工藤 正俊
2. 発表標題 クローン病疾患感受性遺伝子 NOD2 の欠損は T 細胞依存性腸炎の発症を抑制する
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本庶元, 渡邊智裕, 工藤正俊
2. 発表標題 ATG16L1はRICK/RIP2シグナル伝達経路を抑制する
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe Tomohiro
2. 発表標題 RICK/RIP2 is a NOD2-independent nodal point of gut inflammation
3. 学会等名 International Congress of Mucosal Immunology
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	工藤 正俊	近畿大学・医学部・教授	
	(KUDO MASATOSHI)		
	(10298953)	(34419)	

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
---------	---------