

令和元年6月19日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15935

研究課題名(和文)炎症性腸疾患治療薬5-ASAの作用機序の解析

研究課題名(英文)The analysis of new action mechanism of IBD treating medicine 5-ASA

研究代表者

林 杏子(大岡)(HAYASHI (OH-OKA), Kyoko)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・研究員

研究者番号：50569019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノサリチル酸(5-ASA)は、炎症性腸疾患(IBD)の基本薬剤として幅広く使用されている。しかしながら、5-ASAのIBDを寛解させるメカニズムは未だ曖昧な部分が多く、本研究では、これまでに着目されていない方向から解析を行った。

マウスに5-ASAを経口投与する事で、大腸粘膜固有層のTreg細胞が顕著に増加した。5-ASAが、大腸の造血系細胞のAhR(Aryl hydrocarbon receptor)経路を活性化し、活性型TGF- β を増加するためである事を示した。また、大腸粘膜固有層のTreg細胞が増加する事で、DSS腸炎、食物アレルギーの病態が減弱する事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、既にIBDの治療薬として広く使われている5-ASAの薬理について新たな視点を提唱した。

今回、5-ASAがAhRの活性化を介して大腸粘膜固有層のTreg細胞の割合を増加させIBDを抑制している事を示した事で、IBDにおけるTreg細胞の抑制的役割がよりクローズアップされ、バイオマーカーや治療薬の新規開発への助け(Treg数のフォローやAhR活性化薬など)になる事が期待される。また、今後、大腸粘膜固有層のTreg細胞を増加させることで、5-ASAがIBDだけでなく、アレルギーの治療薬としても使えるdrug repositioningの可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：5-aminosalicylic acid(5-ASA) is a first-line drug for treatment of inflammatory bowel diseases (IBD). However, its mechanisms are not fully understood.

Treatment of wild-type mice with 5-ASA increased the accumulation of Treg cells in the colon. We elucidated that the 5-ASA induced the Treg cells via the AhR (aryl hydrocarbon receptor) pathway, followed by TGF- β activation.

Furthermore, mice pretreated with 5-ASA acquired resistant to dextran sodium sulfate-induced colitis and food allergy.

研究分野：免疫学

キーワード：腸管免疫 炎症性腸疾患 アレルギー 芳香族炭化水素受容体

1. 研究開始当初の背景

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は、ダイオキシンのような芳香族化合物が生体内に取り込まれ結合すると、核内に移行し、DNA 中の Xenobiotics Responsive Elements (XRE) 配列に結合することで、ターゲット因子の発現を誘導する転写因子である。申請者らはこれまでに、AhR を活性化することで、DSS 腸炎の病態が減弱することを示した (Fukumoto et al., 2014)。この XRE 配列の 3'側に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を導入した培養細胞に化合物ライブラリーを添加し、安全で AhR 経路活性化能の高いリガンドのスクリーニングを行ったところ、IBD の治療薬である 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) が AhR シグナルを強く活性化することを明らかにした。

5-ASA は、腸の炎症を抑制する効果があり、かつ非常に安全性が高い薬剤であることから、炎症性腸疾患の基本薬剤として寛解導入治療から寛解維持治療まで幅広く使用されている。5-ASA が腸の炎症を抑制するメカニズムとして、抗酸化作用、活性酸素の除去 (Nielsen et al., 1998)、IL-1 β や TNF- α 、プロスタグランジン、ロイコトリエンの産生抑制 (Mahida et al., 1991)、NF- κ B の抑制 (Dubuquoy et al., 2003)などが示唆されている。しかしながら 5-ASA の IBD を寛解させるメカニズムは未だ曖昧な部分が多く、十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、5-ASAのIBDを寛解させるメカニズムをAhRに着目して明らかにする事を目的とする。このメカニズムを明らかにする事は、5-ASAの炎症性腸疾患を寛解させる効果を増強させたり、他疾患の治療薬として使用できる可能性や、新たな炎症性腸疾患の治療薬の探索につながると考えられる。

3. 研究の方法

Treg 細胞は、CD4 陽性 T 細胞のサブセットのひとつであり、宿主にとって有害な過剰免疫応答の抑制にはたらく必須の細胞である。IBD 患者の血中の Treg 細胞の割合が健康な人と比較して顕著に低く (Pedros et al., 2016)、Treg 細胞が、炎症性腸疾患の抑制に重要な役割を果たしている可能性があると考えられている。そこで、5-ASA が Treg 細胞の数や機能に影響を与えているのではないかという仮説をたて以下の研究を行った。

(1) 5-ASA が AhR を活性化することで大腸粘膜固有層の Treg 細胞の割合を増加させるか明らかにした。

野生型マウス、AhR 欠損マウスに 5-ASA を 2 週間経口投与し、様々な臓器の T 細胞中の Th1 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞の割合を flow cytometry (FCM)を用いて解析した。

(2) 5-ASA が造血系、非造血系どちらの細胞の AhR を活性化することで大腸粘膜固有層の Treg 細胞を増加させるか明らかにした。

野生型マウスに X 線照射し、野生型マウス、あるいは AhR 欠損マウスの骨髓細胞を移入した骨髓キメラマウスを作製し、5-ASA を 2 週間経口投与し大腸粘膜固有層の Treg 細胞の割合を FCM を用いて解析した。

(3) 5-ASA が造血系細胞の AhR を活性化することで、どのように大腸粘膜固有層の Treg 細胞が増加するか明らかにした。

5-ASA 投与により AhR が活性化される事で変化する因子の探索を Q-PCR や ELISA を用いて網羅的に解析した。

(4) 5-ASA が大腸粘膜固有層の Treg 細胞の割合を増加させることで病態を抑制できるか明らかにした。

野生型マウス、AhR 欠損マウスに5-ASAを2週間経口投与後、DSS腸炎、卵白アルブミンを用いた食物アレルギーを誘導し、病態の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 5-ASA が AhR を活性化することで大腸粘膜固有層の Treg 細胞の割合を増加させるか明らかにした。

野生型マウスに 5-ASA を 2 週間経口投与したところ、大腸粘膜固有層で、CD4 陽性 T 細胞中の Treg 細胞の割合が増加した (図 1)。他のサブセットである Th1 細胞や Th17 細胞の割合は増加しなかったことから、5-ASA が Treg 細胞のみに影響を与えていることが示された。5-ASA 投与による Treg 細胞の割合の増加は、AhR 欠損マウスでは見られなかった。

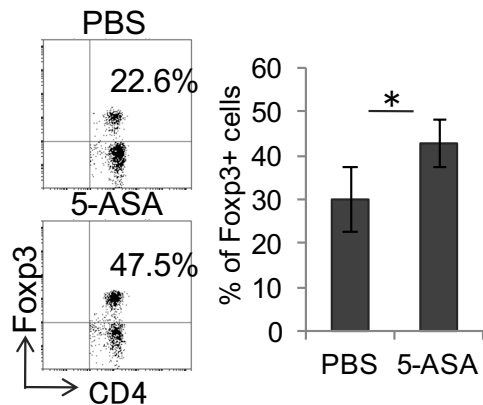


図1. 5-ASAが大腸粘膜固有層のCD4陽性 T細胞中のTreg細胞の割合を増加させた

(2) 5-ASA が造血系、非造血系どちらの細胞の AhR を活性化することで大腸粘膜固有層の Treg 細胞を増加させるか明らかにした。

野生型マウスに X 線照射し、野生型マウス、あるいは AhR 欠損マウスの骨髄細胞を移入した骨髄キメラマウスを作製し、5-ASA を 2 週間経口投与したところ、野生型マウスの骨髄細胞を移入したキメラマウスでは大腸粘膜固有層の Treg 細胞が顕著に増加したのに対し、AhR 欠損マウスの骨髄細胞を移入したキメラマウスでは増加が見られなかった。この結果から、5-ASA によって造血系細胞の AhR が活性化される事で Treg 細胞が増加する事が示された。

(3) 5-ASA が造血系細胞の AhR を活性化することで、どのように大腸粘膜固有層の Treg 細胞が増加するか明らかにした。

5-ASA 投与により AhR が活性化されると、腸管において活性型 TGF-β が増加する事を見出した (図 2)。

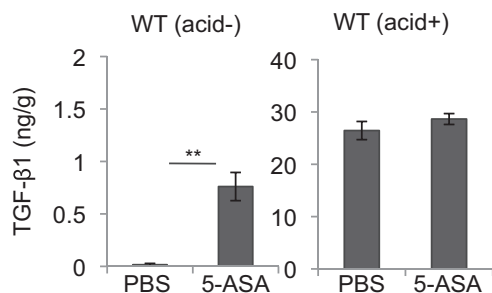
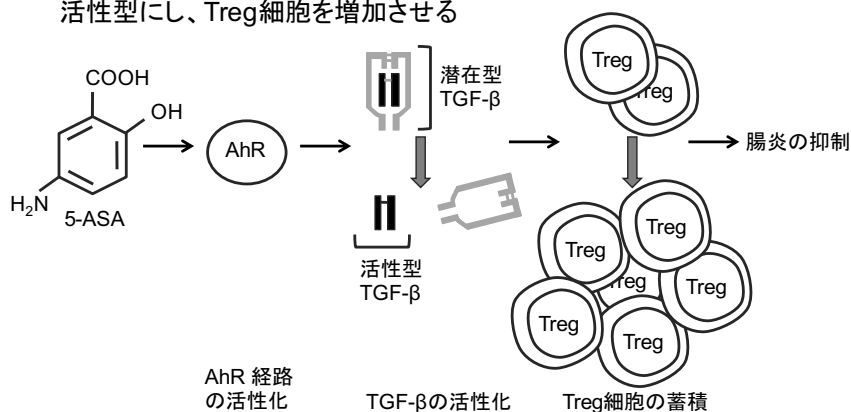


図2. 5-ASA投与によりAhRが活性化されると、腸管において活性型TGF-βが増加する事を見出した

5-ASA 投与による腸管の Treg 細胞の増加は、TGF-β 受容体の 活性化阻害剤である GW788388 を同時に投与する事で消失した事から、5-ASA による活性型 TGF-β の増加が大腸粘膜固有層の Treg 細胞の増加に寄与している事が示唆された。Q-PCR を用いて様々な因子を網羅的に解析したところ、活性型 TGF-β を増加させる因子の一つである integrin α V が 5-ASA 投与によって大腸で増加し、この増加は AhR 欠損マウスでは見られなかった。これらの結果から 5-ASA 投与によって大腸の造血系細胞の AhR が活性化され、integrin α V が誘導され、活性型 TGF-β が増加する事によって Treg 細胞が増加している事が示唆された。以上の内容は国際誌で報告した (図 3, Oh-oka K. et al., C.M.G.H., 2017)。

図3. 5-ASAは大腸の造血系細胞のAhR経路を活性化することでTGF-βを活性型にし、Treg細胞を増加させる



(4) 5-ASA が大腸粘膜固有層の Treg 細胞の割合を増加させることで病態を抑制できるか明らかにした。

マウスに5-ASAを2週間経口投与し、大腸粘膜固有層のTreg細胞の割合が増加したことを確認した上でDSS腸炎を誘導したところ、5-ASA投与によってDSS腸炎が減弱する事を示した。また、卵白アルブミンを用いた食物アレルギーモデルマウスに関しても、5-ASA投与によって食物アレルギーの病態が減弱した。これらの病態の減弱は、大腸粘膜固有層のTreg

細胞の割合が増加しないAhR欠損マウスでは見られなかった。この結果は、IBD治療薬として使われている5-ASAをアレルギー治療薬としても期待できる、いわゆるdrug repositioningの可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. Thu Le HP, Nakamura Y, Oh-Oka K, Ishimaru K, Nakajima S, Nakao A: The frequency of Th17 cells in the small intestine exhibits a day-night variation dependent on circadian clock activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 490 (2), 290-295, 2017 （査読有り）

2. Oh-oka K, Kojima Y, Uchida K, Yoda M, Ishimaru K, Nakajima S, Hemmi J, Kano H, Fujii-Kuriyama Y, Katoh R, Ito H, Nakao A: Induction of colonic regulatory T cells by 5-aminosalicylic acid (5-ASA) by activating the aryl hydrocarbon receptor. Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol. 4 (1), 135-151, 2017 （査読有り）

[その他]

ホームページ <http://immuno-tsukuba.com/index.html>

6. 研究組織

※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。