

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08450

研究課題名(和文) 肥満細胞における小胞体ストレスを介した腸炎発症および腸管線維化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the Mechanisms of Enterocolitis Development and Intestinal Fibrosis Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress in Mast Cells

研究代表者

細見 周平 (Hosomi, Shuhei)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60554938

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)：LUVa細胞を用いたin vitro実験で、リコンビナントIL-12/23による刺激実験の結果、IL-12とIL-23の共刺激下のLUVa細胞の網羅的遺伝子発現解析により、ATP synthesis coupled electron transport、ATP synthesis coupled electron transportの発現亢進を認め、IgE非依存経路を介した肥満細胞活性化が生じている可能性が示唆される結果であった。IL-12/23阻害治療による狭窄抑制機序の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患の一つであるクローン病は、慢性・再発性の腸管炎症と、炎症による狭窄・穿孔が患者の生活の質や予後の影響する表現型として知られる疾患である。本研究の結果で、線維性狭窄形成に寄与することが知られる肥満細胞への小胞体ストレスの影響や、線維性狭窄予防に期待される、IL-12やIL-23パルスウェイ阻害治療のその分子生物学的機序に関わりうる基礎的結果を得ることができた。今後の新規治療や、線維性狭窄の予測因子同定などにつながりうる結果である。

研究成果の概要(英文)：We found that the gene for Amphiregulin (AREG) and the Amphiregulin protein were induced in LUVa cells, a mast cell line, via the endoplasmic reticulum stress responsive transcription factor ATF4 under endoplasmic reticulum stress stimulation. In addition, in vitro experiments using LUVa cells stimulated with recombinant IL-12/23 revealed that comprehensive gene expression analysis of LUVa cells under co-stimulation with IL-12 and IL-23 revealed the expression of ATP synthesis coupled electron transport, ATP synthesis coupled electron transport. This result suggested that IL-12/23 inhibition might contribute to the mechanism of mast cell activation and fibrotic stenosis via IgE-independent pathway.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：小胞体ストレス 肥満細胞 Amphiregulin interleukin-12 interleukin-23

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患と総称される潰瘍性大腸炎やクローン病は、大腸及び小腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍を引き起こす原因不明の難治性疾患であるが、多くの疫学的研究・基礎的研究成果から、遺伝的因子、腸内細菌や食餌等の環境因子、免疫異常など複数の因子が複雑に関わり合うことで生じる多因子疾患と考えられている。変性タンパク質の小胞体への蓄積で生じる小胞体ストレス (ER ストレス) は、種々の疾患の原因に関与することが知られ、炎症性腸疾患患者の腸管においても亢進していることが報告されている (Treton X, et al. *Gastroenterology* 2011)。腸内細菌構成の異常 (dysbiosis) や高脂肪食は、種々の細胞における ER ストレスを誘導することが知られており、欧米生活スタイルへの変化とともに増加傾向にある炎症性腸疾患の病因を理解する上で重要な因子であると考えられる。更に近年のゲノムワイド関連解析により、炎症性腸疾患の多数の疾患感受性遺伝子が報告されてきているなか (Mirkov MU et al. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017)、申請者が 2011 年から 2014 年まで在籍した Boston の Brigham and Women's Hospital の消化器科の研究グループは、ER ストレスセンサーの一つである Inositol requiring enzyme 1 (IRE1) 下流の核内転写因子 X-box-binding protein 1 (XBP1) の機能低下型変異を炎症性腸疾患の新たなリスク因子として同定した (Kaser A, et al. *Cell* 2008)。ER ストレスは主にタンパク合成の盛んな細胞に生じることが知られているが、腸管であれば上皮細胞の一つであるパネート細胞がそれに該当する。これら背景を裏付けるように、Xbp1 遺伝子を腸管上皮細胞またはパネート細胞特異的に欠損させたマウスにおいて、亢進した ER ストレスがパネート細胞の異常や自然発症小腸炎をもたらすことを見出し (Kaser A, et al. *Cell* 2008, Adolph TE, et al. *Nature.* 2013)、遺伝的要因もまた過剰な ER ストレスを介して炎症性腸疾患、特にクローン病の病因に強く関与していることが明らかとなりつつある。

本研究で注目した肥満細胞は、タンパク合成の盛んな細胞であることから、過剰な ER ストレスが生じていることが予測される。また、種々のメディエーターの産生を介して組織の線維性変化に関与する細胞である。実際、クローン病の線維性狭窄部には、平滑筋細胞増生とともに肥満細胞の集簇も認められることが報告されており (C Gelbmann, et al. *Gut.* 1999)、また、肥満細胞ノックアウトマウスによる研究から、肥満細胞が炎症性腸疾患の炎症促進因子であることが報告されている (Kurashima Y, et al. *Nat. Commun.* 2012)。

## 2. 研究の目的

炎症性腸疾患患者の腸管において亢進している ER ストレスは、肥満細胞において TNF 産生や線維芽細胞の増殖などに関与する Amphiregulin などの成長因子の産生を誘導することで、炎症惹起や線維化に強く関与していることが予測される。そこで、クローン病に特徴的な病態である腸管の線維性狭窄と ER ストレスの関連を明らかとすべく、クローン病の肥満細胞における小胞体ストレスの役割を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### A. 小胞体ストレス (ER ストレス) による肥満細胞活性メカニズム解析

ER ストレス応答性転写因子である ATF4 が AREG 誘導に重要な転写因子である可能性の前実験結果をふまえて、ATF4 産生プラスミド (pCMV3-ATF4) を作成し、ATF4 刺激下での Amphiregulin タンパク発現を ELISA 法にて測定した。

### B. 遺伝子改変マウスを用いた、小胞体ストレスによる AREG 関連分子発現解析

過剰な腸管小胞体ストレスと以前発症小腸炎モデル (Xbp1 腸管上皮特異的ノックアウトマウス) を用いて、小腸粘膜スクレイピングサンプルより RNA を抽出し、cDNA 作成後に microArray にて定量した。Areg 及びその関連分子 (STRING Interaction Network より) の遺伝子発現解析を評価した。

### C. 肥満細胞株に対する IL-12 及び IL-23 刺激の影響解析

肥満細胞株である LUVA 細胞を用いて、無刺激、IL-12 または IL-23 刺激、IL-12 と IL-23 の共刺激条件下での各種遺伝子発現変化を網羅的に評価した。網羅的評価には、刺激 24 時間後の細胞より抽出した RNA を用いて、RNA-seq により各種遺伝子発現を定量化した。結果の解析には GO エンリッチメント解析を用いた。

#### 4. 研究成果

##### A. 小胞体ストレス (ER ストレス) による肥満細胞活性メカニズム解析

各 pcDNA3-ATF4 プラスミド濃度下での Amphiregulin タンパク濃度を測定したが、いずれの条件においてもタンパク誘導を得られなかった。この結果から、小胞体ストレス下で誘導された Amphiregulin タンパク誘導は、転写因子 ATF4 のみによる誘導ではないことが明らかとなった。いくつかの追加実験においても、誘導に必要な他の分子同定にはいたらなかった。

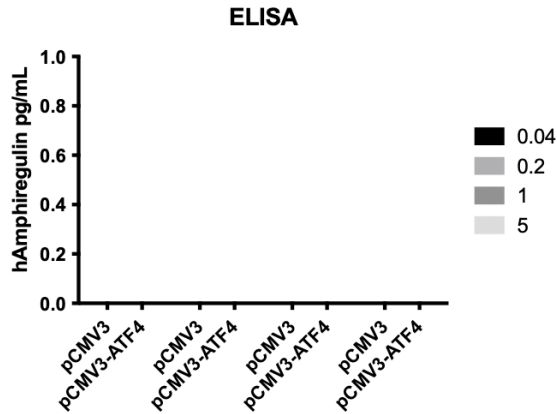


図 1

##### B. 遺伝子改変マウスを用いた、小胞体ストレスによる AREG 関連分子発現解析

AREG 関連分子として、STRING Interaction Network を参考 (図 2) とし、上位 5 つの遺伝子について注目し、各種遺伝子について、MicroArray データを評価した。

発現評価の結果、Areg 遺伝子を含む 5 つの遺伝子は全て、ER ストレス下に自然発症した小腸炎の粘膜において発現の亢進を確認した。特に、Amphiregulin の作用する受容体である EGFR と、主に線維芽細胞や上皮細胞において強く発現し、その活性化に関与することが報告されている A100A4 の発現が亢進していた (図 3)。

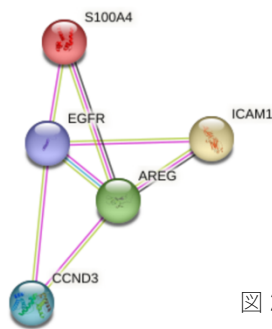


図 2

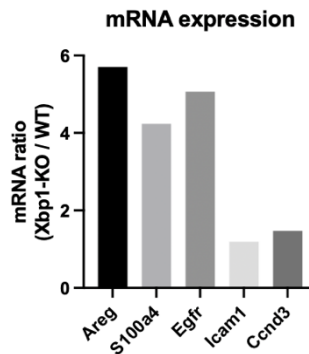


図 3

##### C. 肥満細胞株に対する IL-12 及び IL-23 刺激の影響解析

肥満細胞株である LUVA 細胞を用いて、無刺激、IL-12 または IL-23 刺激、IL-12 と IL-23 の共刺激条件下での各種遺伝子発現変化を網羅的に評価した。

mRNA を含む発現 Heatmap 結果は図 4 の通りであった。

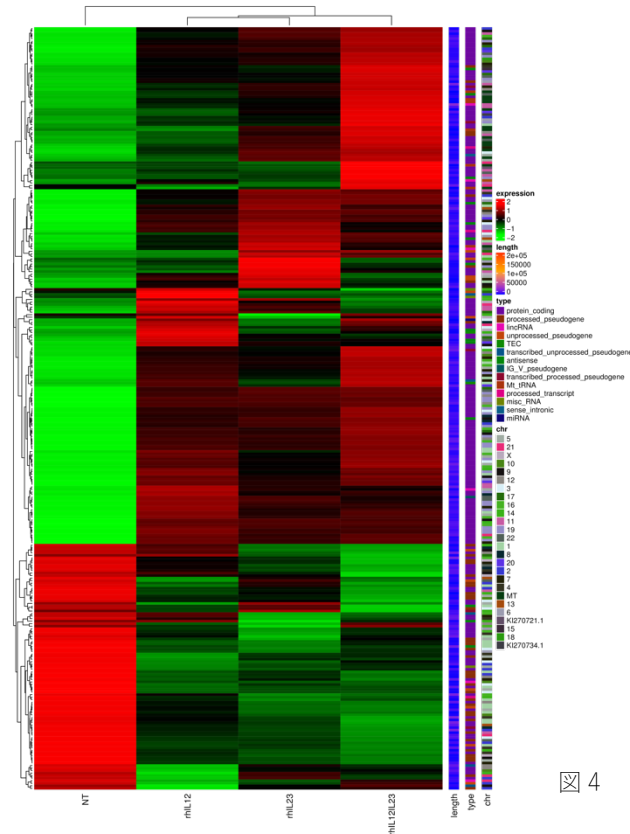


図 4

次に、遺伝子発現変化について、IL-12 刺激下 (rhIL12)、IL-23 刺激下 (rhIL23)、共刺激 (rhIL12IL23) 各条件下で比較すると、共刺激下においてその変化遺伝子数が多いことが明らかとなった (図 5)。

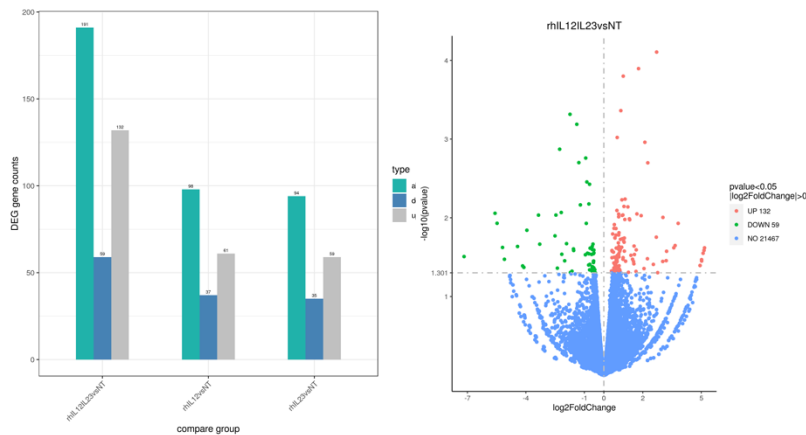
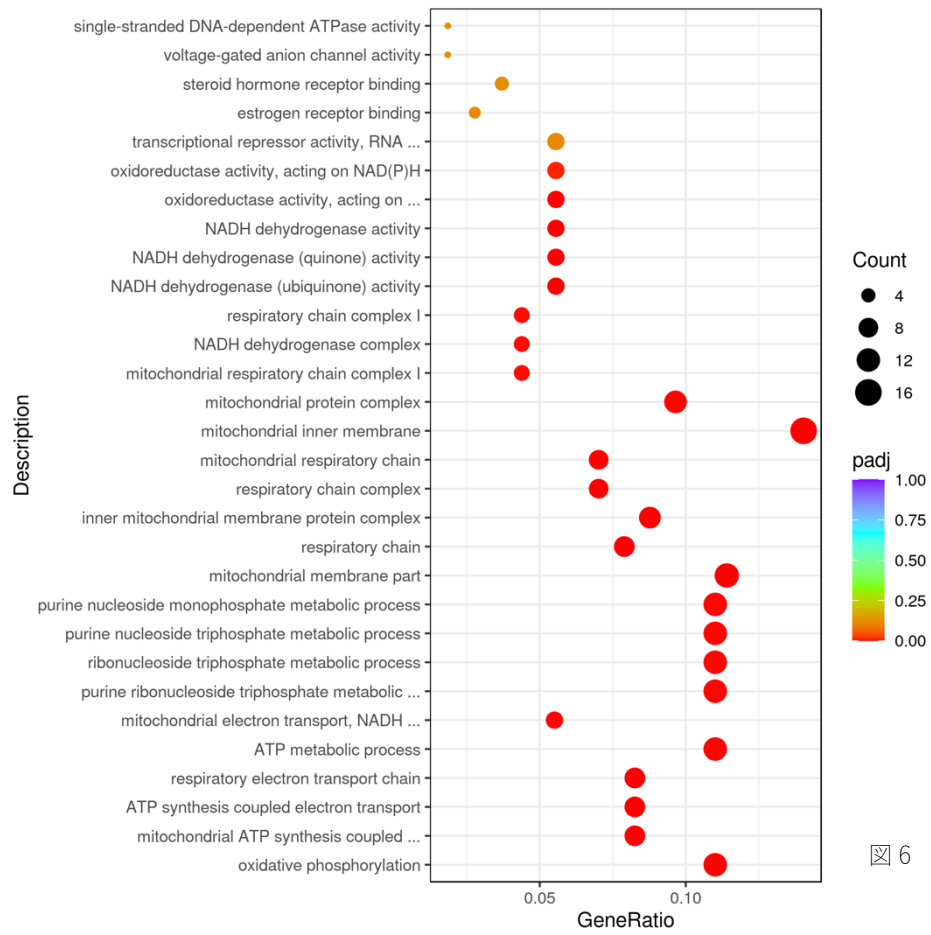


図 5

次に、IL-12・IL-23 の共刺激 (rhIL12IL23) 下の遺伝子発現結果を用いて、GO エンリッチメント解析を行い、IL-12・23 刺激と線維化への影響メカニズムの可能性について解析した。その結果、ATP synthesis coupled electron transport、ATP synthesis coupled electron transport の発現亢進を認め、IgE 非依存経路を介した肥満細胞活性化が生じている可能性が示唆される結果であった。IL-12/23 阻害治療による狭窄抑制機序の一助となる可能性が示唆された (図 6)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細見周平、藤本晃士、小林由美恵、中田理恵子、西田裕、鎌田紀子、藤原靖弘
2. 発表標題 TNF 阻害剤投与中のクローン病手術症例の術後再発予防治療の検討
3. 学会等名 第78回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 細見周平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

〔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
研究協力者	杉田 奈央子  (Sugita Naoko)	大阪公立大学大学院医学研究科 消化器内科学	

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