

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17408

研究課題名(和文)腸管粘膜傷害におけるプロスタグランジン輸送タンパク(SLC02A1)の役割の検討

研究課題名(英文)A study of the role of Slco2a1 in intestinal mucosal injury

研究代表者

西田 裕(Nishida, Yu)

大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：60804705

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)：DSS腸炎モデルでは、Slco2a1^{-/-}マウスで腸炎が悪化した。DSS腸炎の炎症を評価したところ、Slco2a1^{-/-}マウスにおいて、NLRP3などの蛋白発現が亢進しており、インフラマソームが活性化していることが示唆された。MCC950をマウスに投与したところ、MCC950を投与したSlco2a1^{-/-}マウスと野生型マウスの炎症の程度はほぼ同程度となった。腸炎モデルにおける腸管のPGE2とPG関連のmRNAを測定し、Slco2a1^{-/-}マウスでは、組織内にPGE2が貯留した。Slco2a1欠損が原因で、PGE2の細胞内への輸送が障害され、マクロファージ周囲のPGE2濃度が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、Slco2a1の欠損によりPGE2の代謝が低下すると、マクロファージ周囲のPGE2の濃度が上昇することで、NLRP3インフラマソームが活性化し、腸炎が悪化することが示唆され、CEASの発症機序に關与する可能性があると考えられた。CEASの潰瘍形成のメカニズムは不明であることから現在承認された治療薬は存在せず、本研究の結果によりNLRP3インフラマソームの抑制やPGE2の産生抑制などの新たな治療ターゲットが明らかとなった。CEASの病態解明や治療薬探索への一助となったと考える。

研究成果の概要(英文)：Slco2a1^{-/-} mice were more susceptible to DSS-induced colitis. The nucleotide-binding domain, leucine-rich repeats containing family, pyrin domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome was more strongly upregulated in colon tissues of Slco2a1^{-/-} mice administered DSS and in macrophages isolated from Slco2a1^{-/-} mice than in the WT counterparts. Concentrations of PGE2 in colon tissues and macrophages from Slco2a1^{-/-} mice were significantly higher than those of WT mice. Blockade of inflammasome activation suppressed the exacerbation of colitis. These results indicated Slco2a1-deficiency increases the PGE2 concentration, resulting in NLRP3 inflammasome activation in macrophages, thus exacerbating intestinal inflammation. ing of PGE2 and elevated PGE2 concentrations around macrophages.

研究分野：Gastroenterology

キーワード：SLC02A1 非特異性多発性小腸潰瘍症 プロスタグランジン マクロファージ NLRP3インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 非特異性多発性小腸潰瘍症と遺伝子変異

非特異性多発性小腸潰瘍症は、若年からの潜・顕出血に伴う鉄欠乏性貧血や低蛋白血症を特徴とする難治性小腸潰瘍症であり、これまでも遺伝性疾患である可能性が示唆されていたにもかかわらず、原因が同定されていなかった。2015年に梅野らによって、本疾患患者で4箇所のSLC02A1遺伝子点変異が発見され、これらの点変異はコードされる蛋白質の発現・機能低下をもたらすことが確認された (Umeno J. *PLoS Genetics* 2015)。本疾患患者と健常者・クローン病患者の遺伝子解析の結果から、本疾患の責任遺伝子がSLC02A1であることが同定され、本疾患への新たな光明となった。また、時期を同じくして、2015年1月1日より施行された“難病の患者に対する医療等に関する法律”の対象となる指定難病に指定され、更に疫学や患者背景が明らかになると思われるが、SLC02A1遺伝子変異による潰瘍形成のメカニズムは不明で、有効な治療法が確立されていない。

(2) SLC02A1とPGE₂輸送

PGE₂はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)-1/2とPGEシンターゼ(PGES)により、様々な細胞の細胞質で生合成され、MRP4などのトランスポーターを介して細胞外へ分泌され、細胞膜受容体であるEPに結合して作用する。腸管粘膜においては、特にEP4を介した粘膜保護作用・腸炎抑制作用が報告されており (Lejeune M. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010, Kabashima K. *J Clin Invest.* 2002) 実際にCOX阻害剤である非ステロイド性抗炎症薬の投与がPGE₂産生を阻害して胃・小腸・大腸にびらんや潰瘍を引き起こす。SLC02A1はこのPGE₂を主な基質とするトランスポーターをコードする遺伝子として同定され (Kanai N. *Science* 1995) 主に細胞内への再取り込みを行い、PGE₂の代謝酵素である15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)と共にPGE₂の代謝に重要な役割を果たすとされてきた。一方で気管上皮細胞と大腸癌細胞においてはSLC02A1のPGE₂の細胞外への分泌能も報告されており (Shirasaka Y. *J Endocrinol.* 2013, Kasai T. *Exp Cell Res.* 2016) 腸管上皮細胞におけるSLC02A1によるPGE₂代謝に関して一定の見解が得られていない。これまでの我々の研究から、腸管上皮特異的SLC02A1ノックアウトマウス (*Slco2a1*^{IEC}マウス) (*Slco2a1*^{fllox/fllox}; *Villin-cre*^{Tg/-})では自然発生腸炎は認めなかったが、DSS腸炎モデルでは、野生型マウスと比較し炎症が軽度であった。一方、全身性SLC02A1ノックアウトマウス (*Slco2a1*^{-/-}マウス)においては、自然発生腸炎は認めなかったが、DSS腸炎モデルでは野生型マウスと比較し、体重減少率が大きく、腸管でのインターロイキン(IL)-1、TNF- α 、IL-6のmRNA発現が高値となり、腸炎が増悪した。これらの結果から、DSS誘発腸炎において、免疫細胞などの非上皮におけるSLC02A1が腸管恒常性維持に重要な因子であることが示唆された。

近年になりマクロファージがPGE₂の濃度上昇によりIL-1 β を産生する (Zbigniew Zaslona, *J Immunol* 2017) という報告や、マクロファージがリソソームを介してPGE₂を放出している Shimada.H *et al*, *Biochemical Pharmacol* 2016) との報告がありマクロファージとPGE₂の関連性が指摘されている。そのため *Slco2a1*^{-/-}マウスで腸炎が悪化した原因としてマクロファージとPGE₂の関連に着目し『SLC02A1欠損によりPGE₂のバランスの変化の影響を受けたマクロファージが、インフラマソームの活性化を介して腸炎を悪化させる』と仮説をたてた。

2. 研究の目的

SLC02A1 の PGE₂ 代謝に関連した研究や、PGE₂ の腸管上皮細胞への保護作用を証明した研究はあまたく、これらの研究結果からは SLC02A1 欠損が腸管 PGE₂ 濃度の上昇と腸炎保護に働くことが予測され、SLC02A1 遺伝子変異による発現・機能低下による小腸潰瘍形成の機序は不明である。その為、非特異性多発性小腸潰瘍症の病態理解や新規治療法探索には、腸管恒常性維持における SLC02A1 の役割解明が必要である。本研究では、これまでに SLC02A1 の全身ノックアウトマウスと腸管上皮特異的ノックアウトマウスを用いることで、非上皮の SLC02A1 が腸管恒常性維持に重要であることを見出した。SLC02A1 欠損による、マクロファージが腸炎の増悪因子なりうることに注目し、非特異性多発性小腸潰瘍症の病態解明に迫ることを目的としている。SLC02A1 の発現・機能低下による腸炎発症の新たな機序の発見だけでなく、ノックアウトマウスを用いて、新規治療ターゲットの探索も可能となることが予測される。また、SLC02A1 の発現調整や作用を解明することは、腸管恒常性維持における SLC02A1 の生理的役割の解明につながることが期待できるだけでなく、クローン病を含む炎症性腸疾患への新たな治療薬開発につながることも期待できる。

3. 研究の方法

(1) SLC02A1 欠損による DSS 腸炎悪化の原因の解析

1. *Slco2a1*^{-/-}マウスと野生型マウスの DSS 腸炎モデルの大腸より、炎症や創傷治癒に関与する分子の遺伝子発現やタンパク発現を real-time PCR や Western blotting で測定・解析する。またマイクロアレイ解析にて腸炎の悪化に関わる遺伝子発現を網羅的に解析する。

(2) 腸炎発症におけるマクロファージと SLC02A1 の役割

a. Lysozyme M (*LysM*) 特異的 SLC02A1 ノックアウトマウスに腸炎モデルを作成

1. *LysM* (成熟したマクロファージに最も発現する) 特異的ノックアウトマウス (*Slco2a1*^{MP} マウス) (*Slco2a1*^{lox/lox}; *LysM-cre*^{Tg/+}) に DSS 腸炎モデルを作成する。

2. *Slco2a1*^{MP} マウスにおいて DSS 腸炎誘発後、大腸を摘出し炎症の程度を野生型マウスと比較する。大腸の HE 染色と、RNA や蛋白を抽出し、炎症性サイトカインや制御性サイトカインなどを測定・解析を行う。

(3) 腸管上皮細胞における SLC02A1 の PGE₂ の代謝における役割

1. *Slco2a1*^{IEC} マウス、*Slco2a1*^{-/-} マウスおよび野生型マウスで DSS 腸炎モデルを作成し腸管上皮細胞内外の PGE₂ の濃度を ELISA にて測定し、SLC02A1 の機能を評価する。

2. *Slco2a1*^{-/-} マウスおよび野生型マウスで DSS 腸炎モデルに、PGE₂・インドメタシン・COX2 阻害剤・インフラマソーム阻害剤などの投与を行い、腸炎の評価、体重変化や腸管の HE 染色・RNA や蛋白を抽出し、サイトカインなどを測定・解析し、新規治療薬探索も行う。

4. 研究成果

DSS 腸炎モデルでは、*Slco2a1*^{-/-} マウスが野生型マウスに比べ腸炎が悪化した。それらの腸管組織のマイクロアレイ解析の結果から、NLRP3 に焦点を当て DSS 腸炎の炎症を評価したところ、*Slco2a1*^{-/-} マウスにおいて、mature-IL-1、cleaved-caspase-1、NLRP3 の蛋白発現が亢進しており、インフラマソームが活性化していることが示唆された。また、マイクロアレイのデータからもマクロファージの関与が示唆されたため、また骨髄マクロファージ (BMDMs) を分離後、1µg/ml の LPS で 4 時間刺激したところ、mature-IL-1、cleaved-caspase-1、NLRP3 の蛋白発現が亢進した。インフラマソームの阻害薬である MCC950 をマウスに投与したところ、MCC950 を投与した *Slco2a1*^{-/-} マウスと野生型マウスの炎症の程度はほぼ同程度となり、インフラマソームが腸炎悪

化に關与することを確認した。

Lysozyme M (*LysM*)特異的 *SLCO2A1* ノックアウトマウス(*Slco2a1^{fllox/fllox}; LysM-cre^{Tg/-}*)と野生型マウス(*Slco2a1^{fllox/fllox}; LysM-cre^{-/-}*)の DSS 腸炎モデルを作成したところ、前者で腸炎が悪化したことから、マクロファージの *Slco2a1* が炎症に重要な因子であることが示唆された。

*Slco2a1^{-/-}*マウスと野生型マウスの、DSS 腸炎モデルにおける腸管の PGE₂ と PG 関連の mRNA を測定し、*Slco2a1^{-/-}*マウスでは、組織内に PGE₂ が貯留し、代謝できていない結果を得た。またマクロファージでも PGE₂ や関連する mRNA の結果も合わせると、*Slco2a1* 欠損が原因で、PGE₂ の細胞内への輸送が障害され、PGE₂ の代謝が低下し、マクロファージ周囲の PGE₂ 濃度が上昇していることがわかった。

1mg/kg のインドメタシンを *Slco2a1^{-/-}*マウスと野生型マウスの DSS 腸炎モデルに投与したところ、*Slco2a1^{-/-}*マウスにおいてインドメタシンの投与で炎症が改善した。さらに BMDMs に LPS で刺激を行う前に、1μM または 10μM の PGE₂ と 10μM のインドメタシンを投与したところ、*Slco2a1^{-/-}*マウスの BMDMs では PGE₂ の添加濃度に従って、mature-IL1b と Cleaved-caspase-1 の発現が亢進し、インドメタシン投与するとこれらの発現が低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata Rieko, Nakamura Yoshinobu, Hosomi Shuhei, Okuda Hiroaki, Nishida Yu, Sugita Naoko, Itani Shigehiro, Nadatani Yuji, Otani Koji, Tanaka Fumio, Kamata Noriko, Taira Koichi, Nagami Yasuaki, Tanigawa Tetsuya, Watanabe Toshio, Yamagami Hirokazu, Nakanishi Takeo, Fujiwara Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Slco2a1 deficiency exacerbates experimental colitis via inflammasome activation in macrophages: a possible mechanism of chronic enteropathy associated with SLC02A1 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-61775-9	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 Nishida Yu, Hosomi Shuhei, Yamagami Hirokazu, Fujimoto Koji, Nakata Rieko, Itani Shigehiro, Nadatani Yuji, Fukunaga Shusei, Otani Koji, Tanaka Fumio, Nagami Yasuaki, Taira Koichi, Kamata Noriko, Watanabe Toshio, Iseki Yasuhito, Fukuoka Tatsunari, Shibutani Masatsune, Nagahara Hisashi, Ohfuji Satoko, Fujiwara Yasuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Novel prognostic biomarkers of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis: Neutrophil-to-lymphocyte ratio	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0241322	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 細見 周平, 中田 理恵子, 奥田 博朗, 古瀬 味澄, 西田 裕, 鏑谷 成弘, 鎌田 紀子, 永見 康明, 谷川 徹也, 渡辺 俊雄, 中村 吉伸, 中西 猛夫, 藤原 靖弘
2. 発表標題 腸炎モデルマウスを用いたSlco2a1の役割の検討
3. 学会等名 第57回日本小腸学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rieko Nakata, Shuhei Hosomi, Yoshinobu Nakamura, Naoko Sugita, Yu Nishida, Shigehiro Itani, Koji Otani, Fumio Tanaka, Yasuaki Nagami, Noriko Kamata, Koichi Taira, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Takeo Nakanishi, Ikumi Tamai, Yasuhiro Fujiwara
2. 発表標題 Slco2a1 deficiency exacerbates experimental colitis via inflammasome activation in macrophages
3. 学会等名 Digestive disease week (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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