

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17061

研究課題名(和文)炎症性腸疾患の粘膜治癒過程における浸透圧変化の影響

研究課題名(英文)Osmotic change in the mucosal healing process of inflammatory bowel disease

研究代表者

清島 亮 (SEISHIMA, Ryo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10573412

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): IBD腸管の粘膜治癒過程における粘膜微小環境の浸透圧変化と免疫系細胞の動きに注目し、両者を関連付ける分子としてtonicity-responsive enhancer-binding protein (tonEBP)の働きに注目し、粘膜治癒をエンドポイントとする新しいIBD治療の開発を目的とした。本研究により、粘膜での浸透圧変化によりtonEBPをはじめとした浸透圧応答タンパクが間質に存在するマクロファージにおいて活性化することを見出し、かつその活性化が粘膜治癒過程と相関することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBDは原因不明の難治性腸炎であり、下痢・血便などの症状の他、腸管の穿孔をも引き起こす重篤な疾患であるにも関わらず、根治治療が確立されていないため、その予防・治療法の確立が急務である。根本的な治療法が確立していない原因として、本疾患の病態発症メカニズムが依然不明である点が考えられる。本研究により、腸管粘膜における浸透圧変化が炎症惹起と関わりがあることが初めて示された。この知見をさらに発展させ、浸透圧応答タンパクが腸管免疫および上皮再生に与える具体的な影響を明らかにしていくことが望まれる。

研究成果の概要(英文): This study focused on osmotic changes in the mucosal microenvironment and the dynamics of immune system cells during the mucosal healing process of the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease (IBD), and focused on the function of tonicity-responsive enhancer-binding protein (tonEBP) as a key molecule that links the two. The aim of this study was to develop a new IBD treatment with mucosal healing as the endpoint. In this study, we found that osmotic pressure-responsive proteins such as tonEBP are activated in macrophages in the interstitial space by osmotic pressure changes in the mucosa, and that the activation is correlated with the mucosal healing process.

研究分野：消化器

キーワード：炎症性腸疾患 浸透圧変化 粘膜治癒

1. 研究開始当初の背景

基本的な炎症性腸疾患 (IBD) 治療は現在、5-ASA 製剤とステロイドを基本とした治療介入がまず行われ、難治症例に対して抗 TNF 製剤やカルシニューリン剤などを用いることで活動期の治療戦略が立てられる。さらに近年、そこに JAK 阻害剤や抗インテグリン抗体などの新薬も臨床応用されるようになり、炎症を制御する多くの治療オプションが選択できるようになった。しかしながら、実際の臨床現場では薬剤の選択が体系化されるには至っていないのが現状である。これらの問題の背景には、これまで疾患活動性の評価が臨床症状を中心に行われていたことが挙げられる。IBD 治療のエンドポイントはこれまで、血便や下痢など患者の臨床症状の軽減に設定されてきた。臨床症状を評価するスコアシステムもいくつか存在し、有用であるとされてきた。しかしながら、それらのスコアと、実際の内視鏡的に観察を行った場合の評価との間には大きな乖離があることが近年わかってきた (Schoepfer AM, et al. *Am J Gastroenterol*, 2010)。また、内視鏡所見さえも病理学的な炎症所見と必ずしも一致しないこともわかってきた (Riddell RH, *Nat Rev Gastroenterol & Hepatol* 2017)。そこで重要視されるようになってきたのが、粘膜治癒の病理学的評価である。粘膜治癒の程度が長期成績と強い関連があることは数々の報告で証明されてきた (Frolkis AD et al. *Gastroenterology*, 2013)。現存する抗 IBD 治療薬の問題点を解決するには、この粘膜治癒を真のエンドポイントとし、これを治療する薬剤を開発していくことが IBD の根治につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

病理学的な粘膜治癒を達成するために本研究では、浸透圧調節因子であり、炎症反応の増悪とも深く関与している転写因子 tonicity-responsive enhancer-binding protein (tonEBP) に注目した。炎症反応の惹起にサイトカインが必須であることは既知の事実であるが、IBD の活動期には腸管粘膜における IL-1、IL-6、IL-18、TNF- α といったサイトカイン分泌が上昇する (Sartor RB, *Gastroenterology*, 1994)。またこれらの分泌量は粘膜の炎症やリンパ球浸潤の程度と良く相関することもわかっている。一方、IBD に関連する IL-1、IL-6、IL-18 などのサイトカインが tonEBP によって発現・分泌制御されていることが報告されている (Lopez-Rodriguez C, et al. *Immunity*, 2001, Neuhofer W. *Current Genomics*, 2010)。また、tonEBP は細胞が高浸透圧に晒されるとその発現・作用が上昇するが、潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の便汁中の浸透圧は、健常者に比べて有意に高値を示すことも報告されており (Vernia P, et al. *Dig Dis Sci*, 1988) IBD 患者の粘膜の微小環境において、細胞が高浸透圧に晒され、tonEBP 発現が亢進している可能性が考えられた。そこで本研究では、「粘膜における高浸透圧状態が NFAT5 を増加させ、これが粘膜の炎症を惹起している」という仮説を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト検体を用いた検討

ヒト検体の中から、粘膜の炎症部位と正常部位とを採取し、灰化蛍光法を用いて浸透圧の比較を行った。次いで各種免疫染色を行って tonEBP の発現状況等を確認した。

(2) マウスモデルを用いた検討

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルは、腸管粘膜のみの炎症を誘発するため UC モデルとして汎用されているため、これを採用した。DSS 投与マウスから採取した腸管粘膜と、正常マウスから採取した腸管粘膜における浸透圧の比較を行った。また、これらに加えて生理的食塩水を投与したマウスモデルも作成し、3 種類の腸管粘膜における各種浸透圧応答タンパクの発現状況を調べるため免疫染色を行った。

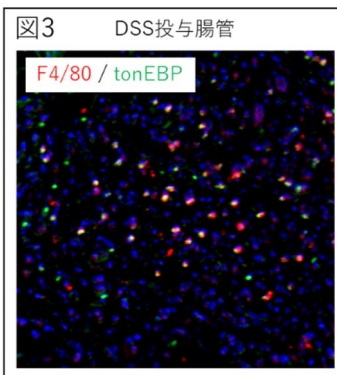
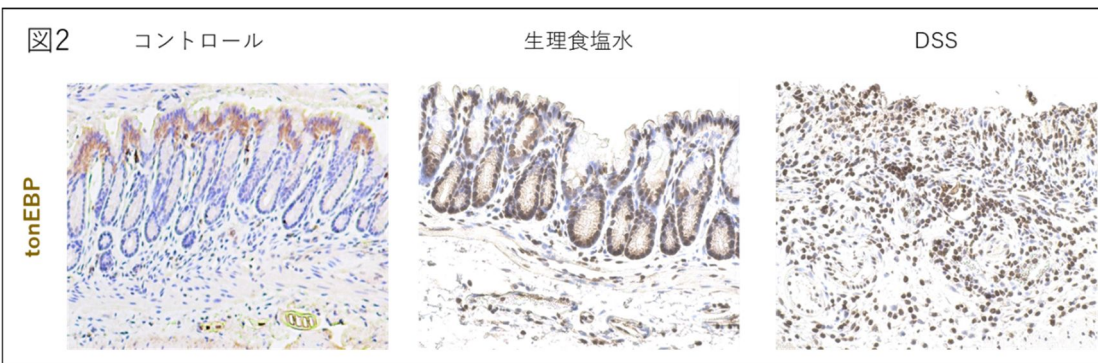
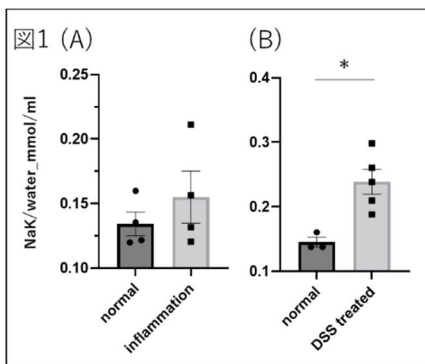
4. 研究成果

図 1A に示すように、ヒト検体における炎症性粘膜は正常粘膜に比べて組織浸透圧が高いことが示唆された。また、DSS 投与マウス腸管における浸透圧は、正常マウス腸管と比べて有意に上昇が認められた (図 1B)。

次に tonEBP 発現に関して免疫染色を行って評価した。図 2 に示すように、マウスの正常腸管粘膜(コントロール)では上皮腺構造の表層細胞の細胞膜に tonEBP 発現が見られる(非活性化状態)のに対して、生理食塩水を飲ませ腸管内浸透圧を弱く上昇させた腸管粘膜においては tonEBP 発現が表層細胞の核に移動している(活性化状態)ことが分かった。また、組織幹細胞などが存在する腺底部(クリプト)の核にも発現が見られ活性化されていた。一方で、間質細胞における発現はごくわずかであった。DSS を投与して強く炎症を惹起し組織浸透圧をさらに上昇させたマウス腸管粘膜においては、上皮細胞での tonEBP 活性化に加えて間質内の炎症細胞での発現上昇を認めた。マクロファージのマーカである F4/80 との共染色では、ほとんどの細胞が tonEBP を発現していることが分かり (図 3)、ヒト検体でも同様の所見を得た。

さらにフローサイトメトリー(FACS)でマクロファージをマウス正常腸管および DSS 投与腸管からソートし、qPCR で CX3CR1 発現を比較したところ、DSS 投与腸管由来マクロファージは低発現であった。このことから、浸透圧の上昇した腸管においては骨髄由来の炎症性マクロファージが tonEBP を強く発現していることが示唆された。

以上より、腸管浸透圧上昇により tonEBP が発現上昇、活性化するという現象を捉えることができた。浸透圧上昇の程度により上皮細胞と炎症性マクロファージとが異なるタイミングで tonEBP 活性化を起こすことは非常に興味深く、両細胞における浸透圧応答タンパクの活性化が免疫応答にどう影響を与えるか、明らかにしたいと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------