

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17702

研究課題名（和文）脂質メディエーターを介したリンパ管新生による炎症性腸疾患制御

研究課題名（英文）Lipid mediators regulate inflammatory bowel diseases via lymphangiogenesis

研究代表者

古城 憲（KOJO, KEN）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：20525414

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）：潰瘍性大腸炎モデルを用いて、急性腸炎後の組織修復にリンパ管新生が関与するかどうかが、またその制御機構を調べた。リンパ管内皮受容体VEGFR3遮断薬投与はリンパ管新生抑制とともに大腸炎を増悪させた。プロスタグランジンE2(PGE2)受容体サブタイプEP4シグナルを増強すると集積するマクロファージが新生拡張リンパ管を形成し、ドレナージ機能を亢進することで炎症収束と組織修復が促進された。潰瘍性大腸炎修復期にEP4受容体シグナルを活性化することにより、潰瘍性大腸炎寛解導入の治療にむすびつく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

炎症性腸疾患を制御するには炎症だけでなく、粘膜修復も考慮しなければならないことが本研究からみえてきた。この修復には新生リンパ管形成とそのドレナージ機能を活用することが重要である。本研究において、炎症性腸疾患における組織修復においてリンパ管新生の果たす意義と制御機構の解明が寛解導入治療につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Using a model of ulcerative colitis, we investigated underlying mechanisms by which lymphangiogenesis is involved in tissue repair after acute intestinal inflammation. Administration of a lymphatic endothelial receptor VEGFR3 inhibitor exacerbated colitis as well as suppressed lymphangiogenesis. Prostaglandin E2 (PGE2) receptor subtype EP4 signaling promoted inflammatory resolution and tissue repair by enhancing drainage function through the formation of new and expanded lymphatic vessels by accumulating macrophages. Our results suggest that activation of EP4 receptor signaling during the repair phase of ulcerative colitis may lead to treatment of ulcerative colitis remission induction.

研究分野：消化器

キーワード：炎症性腸疾患 プロスタグランジン リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病を含む炎症性腸疾患は難治性疾患であり、患者数は年々増加している。腹痛、下血、発熱などの炎症症状が慢性的に持続したり、急性増悪することがしばしばあり、炎症持続や急性増悪は患者の QOL を低下させる。このため、有効な治療が望まれている。これまでの治療はメサラジン製剤や副腎皮質ホルモン製剤などを主とする治療薬が使用され、炎症を抑制することが主眼であった。炎症性腸疾患の原因は未だに不明であるが、免疫細胞の関与が示唆されることから、近年では治療薬は免疫抑制が主体となるように変わってきた。免疫調節薬のほか、免疫細胞から産生されるサイトカインを阻害する生物学的製剤が使用されるようになっている。このように炎症性腸疾患の炎症制御が免疫制御に治療の主体が変わってきているが、炎症後の粘膜修復や再生に関する機序については未解明である。

炎症性腸疾患における上皮組織傷害は、上皮再生と間質組織反応による組織応答・修復によって治癒する。間質組織にはリンパ組織が備わっており、組織液の維持や免疫担当細胞の動員などに関わる。しかし炎症時に新生するリンパ管が、腸炎回復期にどのような役割を果たすのかは理解されていない。

リンパ管新生の制御機構については十分明らかではないが、我々は炎症時に産生されるアラキドン酸代謝産物である脂質メディエーターのひとつプロスタグランジン E2 が血管新生に重要な役割を果たすことをこれまで報告してきた。さらに、PGE2 は創傷治癒過程におけるリンパ管新生にも関与し、創傷治癒を促進する作用があることを見いだした。さらにプロスタグランジン E2 には 4 つの受容体サブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) がある。このなかで EP4 受容体シグナルがリンパ管新生に寄与する可能性をみいだした。炎症性腸疾患に関しては、PGE2 受容体サブタイプのなかで、EP4 受容体サブタイプが実験的潰瘍性大腸炎モデルに関与する可能性を先行研究で見いだしている。

以上の研究背景から炎症性腸疾患における炎症期では EP4 受容体シグナルが関与することから、修復期における関与と組織修復に重要なリンパ管新生にも関与するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)経口投与により誘導される潰瘍性大腸炎モデルを用いて腸炎回復期におけるリンパ管新生の機能的役割とプロスタグランジン(PGE2)・EP4 受容体シグナルを介した組織修復制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物には 8 週令の雌性野生型マウス C57BL/6 マウスおよび EP4 受容体ノックアウトマウスを用いた。2%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 5 日間飲水投与して大腸炎を誘発し、その後通常飲水で 14 日目まで飼育した。また、通常飲水期間中、EP4 選択的アゴニスト、EP4 選択的アンタゴニスト、コントロールとして生理食塩水を投与した。実験期間中に、体重変化、Disease activity index (DAI) (体重減少、便性、下血の有無をスコア化する)、結腸長を評価する。また結腸組織をヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的スコア化して比較検討する。さらにリンパ管新生をリンパ管内皮マ

カーである LYVE-1 抗体で染色して、リンパ管密度とリンパ管占有面積で評価する。また結腸組織内の遺伝子発現を定量的リアルタイム PCR 法で解析しリンパ管新生について検討する。さらにリンパ管新生の役割をしらべるためにリンパ管新生因子 VEGF-C, VEGF-D の受容体である VEGFR3 阻害薬を投与して検討する。またリンパ管新生に関与する免疫細胞としてマクロファージに焦点をあてて、集積マクロファージについて検討する。さらにリンパ管新生の機能的役割を明らかにするために、直腸粘膜下に蛍光色素を注入して、腸管リンパ節に取り込まれる蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

EP4 シグナル欠損は DSS 腸炎を悪化させる

DSS 腸炎における EP4 受容体シグナルの役割をしらべるために、WT マウスと EP4 受容体ノックアウトマウスに 2 %DSS を経口投与した。その結果、WT マウスは全例生存したが、EP4 受容体は下血、体重減少、脱水などの症状をきたす症例が多く、EP4 シグナルは DSS 腸炎に保護的に作用することがわかった。しかしながら、炎症持続、体重減少持続などがあり大腸粘膜修復過程を検討するにはふさわしくないモデルであった。このため、DSS を 5 日間投与し、その後自由飲水させるときに EP4 シグナル阻害または刺激する方法を採用することとした。

選択的 EP4 アゴニストまたは EP4 アンタゴニスト後投与の DSS 腸炎に及ぼす効果

選択的 EP4 アゴニストまたは EP4 アンタゴニストは DSS 投与 5 日後終了してから自由飲水に変更するときから連日 9 日間（初回 DSS 投与後から 14 日目まで）皮下投与した。対照として vehicle（生食）を投与した。その結果、生食投与群では体重は 7 日目に前値の 85% まで減少し、その後 14 日目には 95% まで回復した。EP4 アンタゴニストを投与すると減少した体重はさらに 80% まで減少し、その後も低値を推移した。EP4 アゴニスト投与では体重の回復が生食投与よりも有意に早く回復した。14 日目に採取した結腸の長さを比較すると EP4 アンタゴニスト投与は生食投与よりも短く、EP4 アゴニストは生食よりも長かった（図 1）。

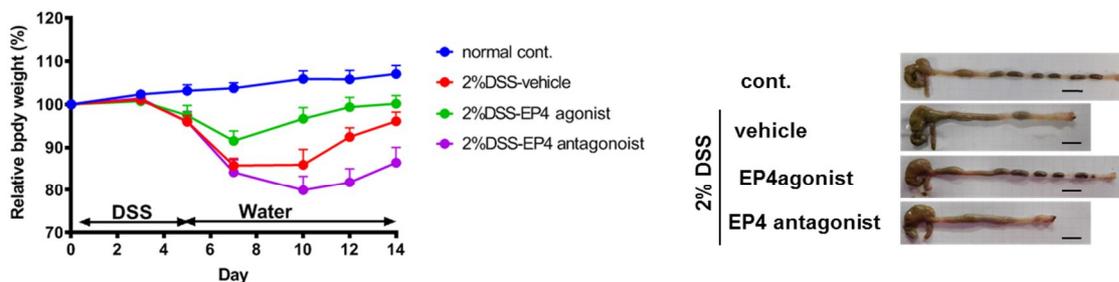


図1. EP4アゴニスト、EP4アンタゴニストのDSS誘導腸炎にもたらす効果

また、疾患スコアや組織学的スコアは生食投与によって増加（病勢が悪化）した。EP4 アゴニスト投与ではこれらスコアは低下したが、EP4 アンタゴニスト投与では、さらにスコアが増加した。これらの結果から DSS 誘導急性腸炎後からの回復には EP4 受容体シグナルが関与する可能性が示唆された。

リンパ管新生とその役割

DSS 腸炎の修復期（14日目）の結腸組織におけるリンパ管新生を検討した。リンパ管内皮マーカー、LYVE-1免疫染色により、リンパ管密度とリンパ管占有面積を定量化することによりリンパ管新生をカウントした。その結果、生食投与では未処置に比べてリンパ管密度には差はなかったが、リンパ管占有面積が増加した。EP4 アゴニスト投与では生食投与と比較してリンパ管密度に差はなかったが、リンパ管占有面積は増加した。一方、EP4 アンタゴニスト投与では生食投与と比較してリンパ管密度は増加し、占有面積は減少した（図2）。この結果から、腸炎修復期では拡張したリンパ管が出現するが、EP4 受容体シグナルを刺激すると、さらに拡張したリンパ管が出現し、逆にEP4 受容体シグナルを遮断すると、径に小さなリンパ管が増殖することが分かった。

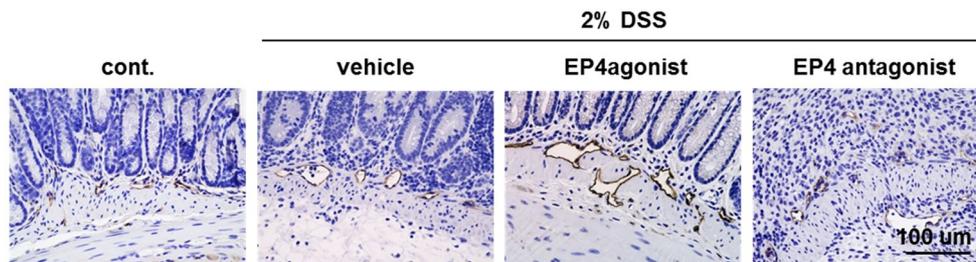


図2. EP4アゴニスト、EP4アンタゴニストのリンパ管新生にもたらす効果

さらにリンパ管内皮マーカー LYVE-1, VEGFR3, Prox1 などやリンパ管新生促進因子 VEGF-C, VEGF-D の発現は生食投与と比較して EP4 アゴニスト投与で増加したが、EP4 アンタゴニスト投与では差はなかった。リンパ管新生が粘膜修復に関与する可能性を明らかにするために VEGF-C, VEGF-D の受容体 VEGFR3 シグナル阻害薬を投与した。すると、DSS 誘導腸炎による体重減少が増悪し、結腸長の短縮、病勢スコアや組織学的スコアの増加があり、DSS 腸炎修復が遅延した。また、リンパ管密度には変化はなかったが、リンパ管占有面積が減少し、リンパ管内皮マーカー発現も減弱した。よって、リンパ管新生は腸炎修復に重要な役割をはたしていることが考えられた。

集積マクロファージによるリンパ管新生

リンパ管新生には免疫細胞であるマクロファージが関与する可能性を我々は報告してきた。そこで、マクロファージ集積について検討した。マクロファージマーカーである CD11b を用いて免疫染色で集積を評価すると、生食投与によって増加したマクロファージは、EP4 アゴニスト投与で減少したが、EP4 アンタゴニスト投与では増加した。マクロファージの表現形式を検討すると、EP4 アゴニスト投与では炎症性マクロファージ関連マーカーが減少し、修復性マクロファージ関連マーカーが増加した。一方、EP4 アンタゴニスト投与では症性マクロファージ関連マーカーが増加した。マクロファージは EP4 を発現すること、さらにマクロファージからリンパ管新生促進因子 VEGF-C, VEGF-D が発現することを確認した。培養骨髄マクロファージを使用すると、EP4 受容体シグナルは修復性マクロファージ偏奇に関与する可能性を見いだした。また EP4 はリンパ管には直接発現していないことを確認したことから、EP4 受容体シグナルは直接リンパ管を増殖して新生リンパ管を形成するのではなく、マクロファージ

由来の VEGF-C, VEGF-D の産生を介してリンパ管を新生しているものと考えられた。さらに修復期にみられる新生リンパ管機能をドレナージ機能の観点から検討した。直腸粘膜下に蛍光色素を注入し 40 分後の腸間膜リンパ節を採取して、蛍光強度を測定した。その結果、EP4 アゴニスト投与では腸間膜リンパ節での蛍光強度は増加し、EP4 アンタゴニスト投与では変化がなかった(図3)。この結果から、EP4 アゴニスト投与で形成されたリンパ管は大腸粘膜下のリンパ管を介してドレナージ機能を増強させていることが示唆された。

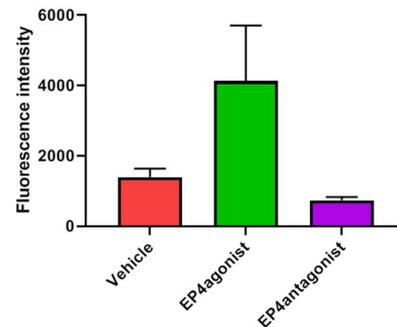


図3. EP4アゴニスト、EP4アンタゴニストのリンパ管ドレナージ効果

これらの結果から腸炎症症期から修復期に入るときに、EP4 シグナルを活性化してリンパ管新生を増強することは粘膜修復作用を増強することにつながり、炎症性腸疾患の寛解導入に活用できる可能性がある。さらに粘膜修復には EP4 シグナルに依存した拡張した機能的リンパ管新生が必要である可能性が考えられる。しかしながら、炎症が持続しているときに、EP4 受容体アゴニストを投与すると、EP4 シグナルを介したリンパ管新生作用が逆に炎症をさらに助長して、腸炎の回復につながらないことにもなる。従って、疾患活動性を多面的に評価することにより、投与時期を見極めることが必要となり、画一的な投与は逆効果となる可能性があることに留意しなければならない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamanashi T, Miura H, Tanaka T, Watanabe A, Yokoi K, Kojo K, Niihara M, Yamashita K, Sato T, Kumamoto Y, Hiki N, Naitoh T	4. 巻 -
2. 論文標題 Short-term outcomes of robot-assisted versus conventional laparoscopic surgery for mid and low rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy: a propensity score-matched analysis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Robot Surg.	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) 10.1007/s11701-022-01498-3	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 Yamanashi T, Miura H, Tanaka T, Watanabe A, Goto T, Yokoi K, Kojo K, Niihara M, Hosoda K, Kaizu T, Yamashita K, Sato T, Kumamoto Y, Hiki N, Naitoh T	4. 巻 15
2. 論文標題 Comparison of short-term outcomes of robotic-assisted and conventional laparoscopic surgery for rectal cancer:	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian J Endosc Surg	6. 最初と最後の頁 753-764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.13075	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 Yokoi K, Tanaka T, Kojo K, Miura H, Yamanashi T, Sato T, Yamashita K, Kumamoto Y, Hiki N, Naitoh T	4. 巻 13
2. 論文標題 Skeletal Muscle Changes Assessed by Preoperative Computed Tomography Images Can Predict the Long-Term Prognosis of Stage III Colorectal Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 386-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12532	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 Otaka F, Ito Y, Goto T, Kojo K, Tanabe M, Hosono K, Majima M, Koizumi W, Amano H	4. 巻 35
2. 論文標題 Recovery of Liver Sinusoidal Endothelial Cells Following Monocrotaline-induced Liver Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2577-2587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12540.	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 Hosono Kanakako, Kojo Ken, Narumiya Shuh, Majima Masataka, Ito Yoshiya	4. 巻 128
2. 論文標題 Prostaglandin E receptor EP4 stimulates lymphangiogenesis to promote mucosal healing during DSS-induced colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 110264 ~ 110264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2020.110264	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 Nakamoto Shuji, Ito Yoshiya, Nishizawa Nobuyuki, Goto Takuya, Kojo Ken, Kumamoto Yusuke, Watanabe Masahiko, Majima Masataka	4. 巻 23
2. 論文標題 Lymphangiogenesis and accumulation of reparative macrophages contribute to liver repair after hepatic ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angiogenesis	6. 最初と最後の頁 395 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10456-020-09718-w	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 Nakamoto Shuji, Ito Yoshiya, Nishizawa Nobuyuki, Goto Takuya, Kojo Ken, Kumamoto Yusuke, Watanabe Masahiko, Narumiya Shuh, Majima Masataka	4. 巻 34
2. 論文標題 EP3 signaling in dendritic cells promotes liver repair by inducing IL 13 mediated macrophage differentiation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5610 ~ 5627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901955R	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 0件)

1. 発表者名 古城 憲 佐藤 武郎, 三浦 啓寿, 横井 圭吾, 田中 俊道, 細田 圭, 海津 貴史, 田島 弘, 仙石 紀彦, 加藤 弘, 山下 継史, 田中 潔, 比企 直樹, 隈元 雄介, 三階 貴史, 内藤 剛
2. 発表標題 進行直腸癌に対するWatch-and-wait approachに内視鏡所見は有用か ~ 術前化学放射線治療後のHigh risk所見 ~
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中本 修司、伊藤 義也、後藤 卓也、西澤 伸恭、古城 憲、隈元 雄介、馬嶋 正隆
2. 発表標題 樹状細胞のEP3シグナル伝達はマウスの虚血再灌流障害後の肝修復を促進する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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