

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20860

研究課題名（和文）炎症性腸疾患および肝炎の病態形成におけるケモカインMIP-1 の役割

研究課題名（英文）Role of chemokine MIP1-gamma in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and hepatitis

研究代表者

鹿子嶋 洋明（Kagoshima, Yomei）

大分大学・医学部・医員

研究者番号：50966687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、炎症性腸疾患と自己免疫性肝炎という消化器分野における難病の病態形成において、ケモカインMIP1- がどのような役割を担っているかを、病態モデルマウスを用いて解析することである。

炎症性腸疾患モデルとして用いたDSS腸炎では、MIP1- 遺伝子欠損マウスで腸炎が重症化している傾向が示され、MIP1- が何らかの免疫制御を行っている可能性が示唆された。自己免疫性肝炎モデルとして用いたCon A肝炎では、MIP1- 遺伝子欠損マウスで生存率が高い傾向が見られた。しかし、この実験系の特性上、個体間誤差が大きく、今後Con A肝炎に代わる肝炎モデルでの解析を検討していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患、自己免疫性肝炎は未だ原因不明の消化器疾患であり、様々な分子標的薬による治療が行われているが、治療抵抗性の症例も相当数存在する。本研究は、これらの難病の原因解明および新薬開発の一助となる可能性がある。今回、実験的大腸炎モデルにおいて、MIP1- 遺伝子欠損マウスが野生型マウスと比較して増悪する傾向が示された。そのため、今後マウスモデルを用いて増悪化の機序を解明し、臨床応用に向けた研究に繋げていきたい。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the role of the chemokine MIP1- in the pathogenesis of two intractable diseases in the field of gastroenterology, inflammatory bowel disease and autoimmune hepatitis, using mouse disease models.

MIP1- deficient mice showed severe intestinal inflammation in response to DSS, which is commonly used in studies for IBDs, suggesting an involvement of MIP1- in immune regulation. In Con A hepatitis, which was used as a model of autoimmune hepatitis, there was a trend toward greater survival in MIP1- -deficient mice. However, due to an experimental error, it is difficult to evaluate the precise role of MIP1- in autoimmune hepatitis. An alternative hepatitis model is required.

研究分野：消化器分野

キーワード：炎症性腸疾患 自己免疫性肝炎 ケモカイン MIP1-

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (UC)、クローン病 (CD) に代表される炎症性腸疾患 (IBD) や、時に肝硬変や肝癌への進行も危惧される自己免疫性肝炎(AIH)は、若年者や働きざかりの世代に好発し、しばしば難治例にも遭遇する、消化器分野の重大な難病である。いずれも自己免疫疾患として知られているが、その詳細な原因は不明なままであり、早急な原因究明が望まれる。これまで UC は IL-4 を主体とする Th2 型反応、CD と AIH は IFN- γ を主体とする Th1 型反応と考えられてきたが、近年、IL-17 を産生する Th17 細胞も IBD や AIH の病態形成に関与していることが示されている¹⁾²⁾。

今回我々が着目した macrophage inflammatory protein-1 gamma (MIP-1 γ)は CC ケモカインの一種で、腸管のパイエル板の follicle-associated epithelium (FAE)と呼ばれる上皮細胞によって産生される。そして、その受容体である CCR1 を発現する樹状細胞や T 細胞などの免疫細胞の誘引に働くと考えられているが、生体内での詳細な機能は証明されていない³⁾。

予備検討として、マウスの定常状態での各臓器の MIP-1 γ の発現量を測定したところ、肝臓において最も高い発現が見られ、腸管組織にも高い発現が認められた(図 1)。そのため、MIP-1 γ が腸管や肝臓で何らかの生理的機能を担っていることが予想されたが、MIP-1 γ の遺伝子欠損マウスについては未だ報告がなく、その生体内の機能については不明な点が多い。そこで、MIP-1 γ が IBD や肝炎のマウス病態モデルにおいて、その病態にどのように関連するのかを遺伝子欠損マウスを用いて解析することとした。

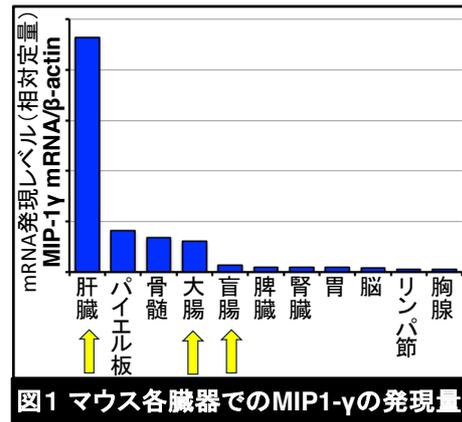


図1 マウス各臓器でのMIP-1 γ の発現量

2. 研究の目的

- (1) 炎症性腸疾患の病態形成におけるケモカイン MIP-1 γ の役割を解明する
- (2) 自己免疫性肝炎の病態形成におけるケモカイン MIP-1 γ の役割を解明する

3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患の病態形成におけるケモカイン MIP-1 γ の機能解明

本研究では、MIP-1 γ が腸炎の炎症部位に CCR1 発現細胞を誘導するため、MIP-1 γ 遺伝子欠損 (MIP-1 γ KO) マウスでは CCR1 発現細胞が誘引されず、野生型(WT) マウスと比較して腸炎が軽減するという仮説を立て、以下の実験を行った。

① 臨床所見における腸炎の重症度の比較

本実験では DSS を用いて腸炎を誘導した。飲料水に DSS を混ぜ、2.5%の濃度の DSS 溶液を作製した。これを WT と MIP-1 γ KO にそれぞれ 5 日間自由飲水させ、その後 7 日間は通常の飲料水に変更し、この間の体重推移と病態スコア(DAI スコア)を測定した。実験開始後 12 日目に犠死し、大腸病理組織の評価を行った。

② 腸炎誘導後の結腸におけるサイトカイン発現量の解析

DSS 腸炎の臨床所見が最重症となった実験開始後 8 日目にマウスを犠死し、結腸における炎症性サイトカインの発現を、リアルタイム PCR 法を用いて解析を行った。

(2) 自己免疫性肝炎の病態形成におけるケモカイン MIP-1 γ の機能解明

(1)と同様に、MIP-1 γ が肝炎の炎症部位に CCR1 発現細胞を誘導するため、MIP-1 γ KO マウスでは CCR1 発現細胞が誘導されず、肝炎が軽減するという仮説を立て、以下の実験を行った。

① AIH モデルマウスの確立

AIH モデルとして、マウスの尾静脈からコンカナバリン A(Con A)を静脈注射する、Con A 肝炎を用いた。各濃度で比較検討し、至適濃度を検証した。

② 臨床所見における肝炎の重症度の比較

Con A を1回静脈投与し Con A 肝炎を誘導した後、24 時間後の肝逸脱酵素(AST,ALT)を測定した。また、マウスの時間毎の生存率を 48 時間後まで観察した。

③ 肝炎誘導後の肝臓におけるサイトカイン発現量の解析

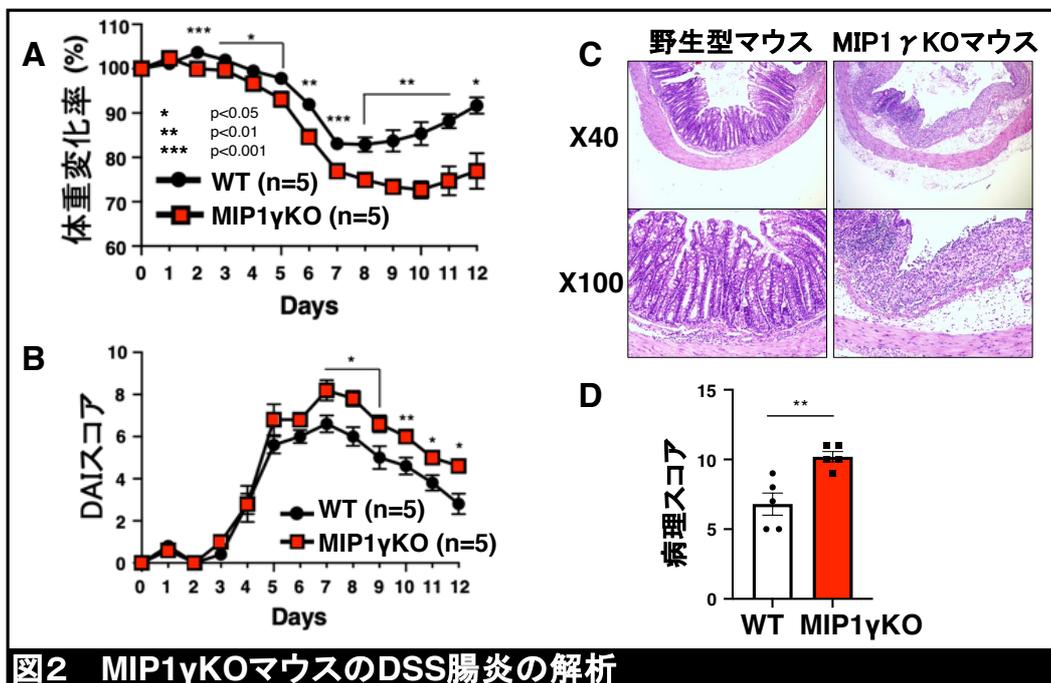
Con A 肝炎誘導後、8 時間後にマウスを犠死し、肝臓における炎症性サイトカインの発現を、リアルタイム PCR 法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 炎症性腸疾患の病態形成における MIP-1 γ の役割

① 臨床所見における腸炎の重症度の比較

WT マウスおよび MIP1 γ KO マウスに 2.5%DSS を 5 日間、飲料水を 7 日間投与し、DSS 腸炎を誘導した。体重減少は、MIP1- γ KO 群で顕著であり(図 2A)、病態スコアである DAI スコアも MIP1- γ KO 群で有意に増悪した(図 2B)。また、病理所見も MIP1- γ KO 群において炎症 細胞浸潤、粘膜下の浮腫、潰瘍形成などの所見が顕著となった(図 2C, D)。いずれの臨床所見も、当初の仮説に反して、MIP1- γ が欠損することで腸炎が増悪することを示唆していた。



② 腸炎誘導後の結腸におけるサイトカイン発現量の解析

同様に 2.5%DSS を 5 日間投与した後に飲料水に変更し、腸炎の臨床所見が最重症となる実験開始後 8 日目に、結腸における炎症性サイトカインの発現を解析した。IL-17A、IFN γ には差が見られなかったが、IL-1 β 、IL-6、IL-12p40 が MIP1- γ KO 群において高い傾向があり、自然免疫系の亢進が炎症増悪に関与している可能性が示唆された(図 3)。

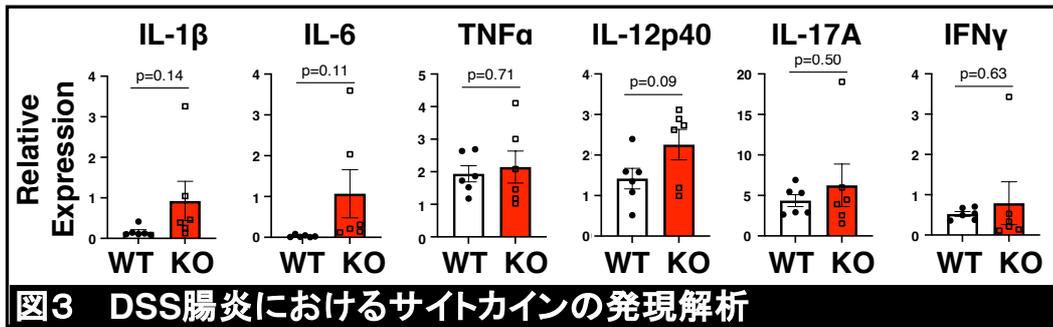


図3 DSS腸炎におけるサイトカインの発現解析

以上の結果から、MIP1-γがDSS腸炎の病態形成において、何らかの抑制的な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) 自己免疫性肝炎の病態形成におけるMIP1-γの役割

① AIHモデルマウスの確立

Con Aを静脈投与して24時間後に肝逸脱酵素を測定した。Con A濃度を15mg/kg、25mg/kg、35mg/kgおよび45mg/kgの4群に分けてそれぞれWTマウスに静脈投与した。Con A肝炎は、Con A濃度による肝逸脱酵素の上昇値が非常に大きく、濃度を高くすると個体差が非常に大きくなったため、我々も25mg/kgが最適の濃度と考えた(図4A)。

② 臨床所見における肝炎の重症度の比較

WTマウスおよびMIP1-γ KOマウスに25mg/kgのCon Aを1回静脈投与し、Con A肝炎を誘導した。まずCon A投与後24時間の肝逸脱酵素の値を比較したところ、AST,ALTともにWTマウスが高い傾向にあったが、数値の個体差が大きく、有意差は認められなかった(図4B)。一方、時間毎の生存率に関しては、48時間時点までWTマウスは全数死亡したものの(生存率0%)、MIP1-γ KOマウスでは5匹中2匹の個体が生存した(生存率40%)(図4C)。

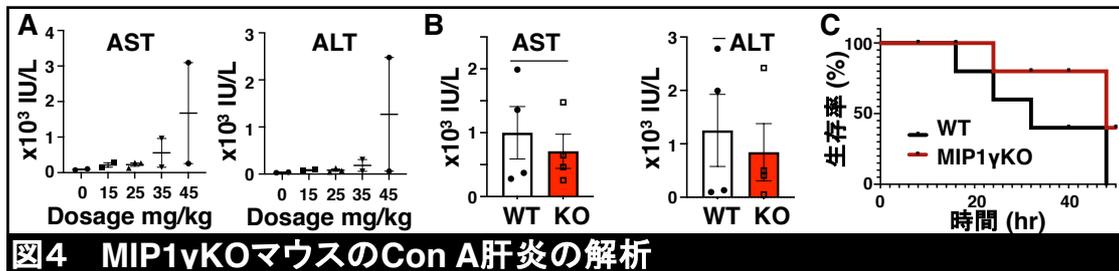


図4 MIP1γKOマウスのCon A肝炎の解析

③ 肝炎誘導後の肝臓におけるサイトカイン発現量の解析

Con A投与後、8時間時点での肝臓における炎症性サイトカインの発現を解析した。しかし、個体間でのばらつきも大きく、測定したいずれの炎症性サイトカインでも有意な差は見られなかった(図5)。

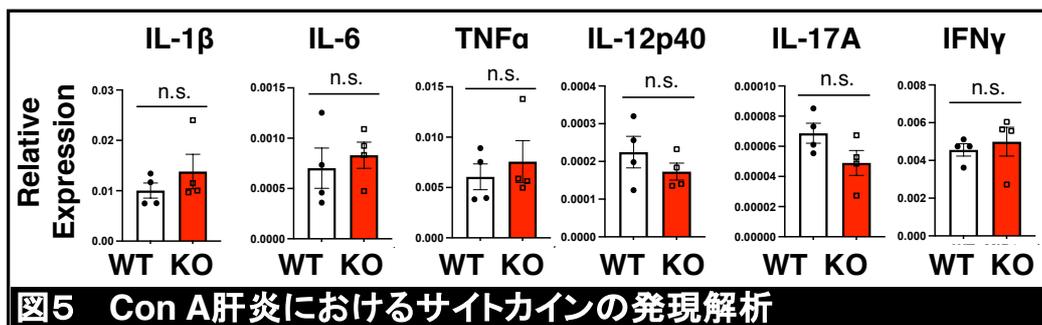


図5 Con A肝炎におけるサイトカインの発現解析

以上より、WT マウスと MIP1 γ KO マウスの 2 群間において、肝逸脱酵素や炎症性サイトカインの発現では、現時点で明らかな表現型の差は見られないが、生存率では WT マウスより MIP1 γ KO マウスの方が耐性を示す傾向が見られると言える。

しかし、Con A が非常に急速な肝障害を起こすので個体差がかなり大きくなってしまったり、Con A をマウス尾静脈から安定的に投与するには技術的な熟練が必要である点など今後の検討が必要である。

(3) 結語

本研究により、DSS 腸炎において MIP1 γ KO マウスが WT マウスと比較して腸炎が増悪することが分かった。これは研究開始当初の仮説とは反し、MIP1 γ が何らかの免疫抑制効果を持っていることを示唆するものであり、現在、我々はこのメカニズムの更なる解明に取り組んでいる。IBD の病態形成における重要なケモカインとその受容体を発現する免疫細胞の実態を明らかにできれば、IBD の分子標的治療薬の開発に貢献することができると考えられる。

また、今回の研究で Con A 肝炎が個体差が大きいことが判明したため、Con A 肝炎に代わる肝炎モデルを検討する必要がある。そこで、今後はマウスの脂肪肝炎モデル等を用いた実験などを試みる予定である。

参考文献 1. Gut. 2016;65(6):935-943. 2. Hepatol Res. 2011;41:350-357. 3. J Immunol. 2003;171(6):2797-2803.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dewayani A, Kamiyama N, Sachi N, Ozaka S, Saechue B, Ariki S, Goto M, Chalalai T, Soga Y, Fukuda C, Kagoshima Y, Maekawa Y, Kobayashi T.	4. 巻 613
2. 論文標題 TRAF6 signaling pathway in T cells regulates anti-tumor immunity through the activation of tumor specific Th9 cells and CTLs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 26-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.125.	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 Sachi N, Kamiyama N, Saechue B, Ozaka S, Dewayani A, Ariki S, Chalalai T, Soga Y, Fukuda C, Kagoshima Y, Ekronarongchai S, Kobayashi T.	4. 巻 641
2. 論文標題 CCL20/CCR6 chemokine signaling is not essential for pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 123-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.11.088.	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 Ariki S, Ozaka S, Sachi N, Chalalai T, Soga Y, Fukuda C, Kagoshima Y, Ekronarongchai S, Mizukami K, Kamiyama N, Murakami K, Kobayashi T.	4. 巻 28
2. 論文標題 GM-CSF-producing CCR2+ CCR6+ Th17 cells are pathogenic in dextran sodium sulfate-induced colitis model in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 267-276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13008.	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 Chalalai Thanyakorn, Kamiyama Naganori, Saechue Benjawan, Sachi Nozomi, Ozaka Sotaro, Ariki Shimpei, Dewayani Astri, Soga Yasuhiro, Kagoshima Yomei, Ekronarongchai Supanuch, Okumura Ryu, Kayama Hisako, Takeda Kiyoshi, Kobayashi Takashi	4. 巻 669
2. 論文標題 TRAF6 signaling in dendritic cells plays protective role against infectious colitis by limiting C.rodentium infection through the induction of Th1 and Th17 responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.059	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 Kamiyama Naganori, Saechue Benjawan, Sachi Nozomi, Dewayani Astri, Chalalai Thanyakorn, Ozaka Sotaro, Arika Shimpei, Soga Yasuhiro, Kagoshima Yomei, Ekronarongchai Supanuch, Hidano Shinya, Kobayashi Takashi	4. 巻 36
2. 論文標題 TRAF6 signaling in T cells is crucial for the pathogenicity of experimental autoimmune encephalomyelitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxad055	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 Ozaka Sotaro, Soma Ryusuke, Takahashi Haruhiko, Shimomori Yuta, Fukuda Masahide, Tsutsumi Koshiro, Hirashita Yuka, Fukuda Kensuke, Ogawa Ryo, Mizukami Kazuhiro, Kagoshima Yomei, Sachi Nozomi, Kamiyama Naganori, Hasegawa Hideo, Kobayashi Takashi, Kodama Masaaki, Murakami Kazunari	4. 巻 3388
2. 論文標題 Tapeworm Infection Diagnosed after Campylobacter jejuni-induced Enteritis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3388-23	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10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shimpei Arika, Sotaro Ozaka, Nozomi Sachi, Yomei Kagoshima, Thanyakorn Chalalai, Naganori Kamiyama, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 Identification of pathogenic Th17 cells in gastrointestinal tract using chemokine receptor deficient mice
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sotaro Ozaka, Shimpei Arika, Yomei Kagoshima, Naganori Kamiyama, Nozomi Sachi, Thanyakorn Chalalai, Astri Dewayani, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 Secretory leukocyte protease inhibitor ameliorates murine experimental colitis by protecting the intestinal epithelial barrier
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Nozomi Sachi, Naganori Kamiyama, Sotaro Ozaka, Shimpei Arika, Thanyakorn Chalalai, Yomei Kagoshima, Takashi Kobayashi
2. 発表標題	Physiological function of chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in multiple sclerosis in mice
3. 学会等名	第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Naganori Kamiyama, Thanyakorn Chalalai, Sotaro Ozaka, Shimpei Arika, Yomei Kagoshima, Nozomi Sachi, Takashi Kobayashi
2. 発表標題	Zika virus induces pathogenic T cell-attracting chemokines in the central nervous system and exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis
3. 学会等名	第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Thanyakorn Chalalai, Naganori Kamiyama, Shimpei Arika, Sotaro Ozaka, Nozomi Sachi, Yomei Kagoshima, Ryu Okumura, Kiyoshi Takeda, Takashi Kobayashi
2. 発表標題	Physiological relevance of TRAF6 signaling in dendritic cells in controlling C. rodentium infection
3. 学会等名	第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	鹿子嶋 洋明, 小坂 聡太郎, 神山 長慶, 佐知 望美, 曾我 泰裕, Supanuch Ekronarongchai, 水上 一弘, 村上 和成, 小林 隆志
2. 発表標題	柴苓湯のマウス腸内細菌叢に及ぼす影響とLeaky gut改善作用の解析
3. 学会等名	第13回癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 神山 長慶, 上野 真愛, 佐知 望美, 小坂 聡太郎, Thanyakorn Chalalai, 曾我 泰裕, 鹿子嶋 洋明, Supanuch Ekronarongchai, 小林 隆志
2. 発表標題 CCR2欠損マウスを用いた先天性トキソプラズマ症の新規予防戦略の構築
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐知 望美, 鹿子嶋 洋明, Supanuch Ekronarongchai, 曾我 泰裕, 小坂 聡太郎, 神山 長慶, 小林 隆志
2. 発表標題 ゲノム編集マウスを用いたケモカインCCL9の多発性硬化症における生理的機能の解析
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 曾我泰裕, 神山長慶, ThanyakornChalalai, 佐知望美, 小坂聡太郎, 鹿子嶋洋明, Supanuch Ekronarongchai, 小林 隆志
2. 発表標題 脂質メディエーターpalmitoylethanolamide (PEA)のT細胞への影響: in vitroおよびin vivo解析
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Supanuch Ekronarongchai, Natsuki Ito, Nozomi Sachi, Yomei Kagoshima, Yasuhiro Soga, Thanyakorn Chalalai, Sotaro Ozaka, Naganori Kamiyama, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 Investigating the Role of CCL20 on IMQ-Induced Psoriatic Inflammation Using CCL20 Deficient Mice
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------