

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20886

研究課題名（和文）鉄動態異常の是正効果に基づくHinokitiolの炎症性腸疾患への治療応用の試み

研究課題名（英文）Trial of Therapeutic Application of Hinokitiol to Inflammatory Bowel Disease Based on Corrective Effects of Iron Dynamics Abnormalities

研究代表者

北本 博規 (Kitamoto, Hiroki)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：80967901

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）：マウスのマクロファージ細胞株をLPS刺激を加える際にHinokitiolを用いることで、細胞内鉄と炎症惹起能が低下する傾向が確認された。また、細胞内鉄が低下した際にマクロファージの炎症惹起能が低下する分子メカニズムを解明するためにRNA-seqを行ったところ、鉄キレート群では糖代謝や酸化リン酸化など細胞内代謝に関わる遺伝子群の変化が確認された。その中で鉄キレート群で発現が亢進しているAMPK pathwayに着目し、AMPK阻害薬を用いると鉄キレート群の炎症惹起能が一部回復することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回Hinokitiolを用いた研究はin vitroでの検討までしか出来なかったが、マウスのマクロファージ細胞株でHinokitiolが抗炎症作用を発揮する可能性を確認できた。またマクロファージの細胞内鉄の多寡が糖代謝に影響を及ぼして炎症惹起能を調節しているメカニズムが示唆され、IBD治療の新たな切り口として開発できる可能性が示唆された。今後、IBDモデルマウスを用いたin vivoの実験系においても、ヒノキチオール（Hinokitiol）の抗炎症作用と安全性が検証出来れば、将来的に実臨床への応用の可能性も期待される。

研究成果の概要（英文）：A trend toward decreased intracellular iron and inflammation-inducing capacity was observed when mouse macrophage cell lines were treated with Hinokitiol during LPS stimulation.

RNA-seq was also performed to elucidate the molecular mechanism by which the inflammatory potential of macrophages is reduced when intracellular iron is lowered, and changes in genes involved in intracellular metabolism such as glucose metabolism and oxidative phosphorylation were identified in the iron-chelated group. We focused on the AMPK pathway, which is upregulated in the iron-chelate group, and found that the inflammatory potential of the iron-chelate group was partially restored by the use of an AMPK inhibitor.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 鉄 マクロファージ ヒノキチオール

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease : IBD) などの慢性炎症性疾患では、炎症による Hecpudin-Ferroportin system の亢進によってマクロファージ細胞内鉄の過剰蓄積が引き起こされる。さらにマクロファージの細胞内鉄は炎症性サイトカイン産生の調節因子の1つとして機能し、その増加によって炎症惹起能が亢進して、さらに炎症を悪化させる。

申請者はこのメカニズムに着目し、IBD モデルマウス (IL-10 KO マウス) の食餌鉄を制限することで、Hecpudin 産生の抑制を介して Ferroportin による腸管マクロファージの細胞内鉄の細胞外排出を促進することで腸炎が軽減することを明らかにした。

しかし、実臨床にこの成果を適応するために IBD 患者の食餌鉄を長期にわたって制限することは、鉄欠乏性貧血などの副作用の観点から現実的ではないと考えられた。

そこで、鉄動態異常の是正効果が近年明らかとなった Hinokitiol に着目して、IL-10 KO マウスにおけるマクロファージ鉄動態と炎症惹起能に与える影響を解析することで、食餌鉄制限に代わる治療法として Hinokitiol の臨床応用への可能性を検討するために本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では鉄動態異常是正作用を持つ Hinokitiol が慢性炎症環境下での腸管マクロファージの炎症惹起能に与える影響を鉄動態の観点から検証する。またマクロファージ細胞内鉄の多寡が炎症惹起能の変化に寄与する分子メカニズムについて検証する。

さらに IBD 患者への治療応用を目指して Hinokitiol の機能性・安全性を検証し、免疫抑制治療に依らない安全な IBD 治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

Hinokitiol がマクロファージの炎症惹起反応に及ぼす影響

マウスのマクロファージ細胞株に LPS 刺激を加えて培養液中に放出された炎症性サイトカイン量を比較するプロトコールにおいて、ヒノキチオールを加えて炎症惹起能が変化するか検討する。

細胞内鉄の減少がマクロファージの遺伝子発現に及ぼす影響

申請者は先行研究において、IL-10 KO マウスの食餌鉄を制限することで、Hecpudin-Ferroportin system を介して腸管マクロファージの細胞内鉄の過剰貯留を抑制し腸炎が軽減することを明らかにしたが、より詳細な分子メカニズムの追及のために IL-10 KO マウスの BMDM を control 群と鉄キレート群に分けて LPS 刺激を行い、RNA-seq で網羅的な遺伝子学的解析を行った。

マクロファージ細胞内鉄と AMPK pathway に着目した解析

の RNA-seq において差がみられた pathway の中で、鉄キレート群で発現が亢進していた AMPK pathway に着目し、IL-10 KO マウスの BMDM を用いた炎症惹起能の rescue 実験と、食餌鉄制限を行った IL-10 KO マウスにおける腸管マクロファージでの AMPK 発現について検証した。

4. 研究成果

Hinokitiol がマクロファージの炎症惹起反応に及ぼす影響

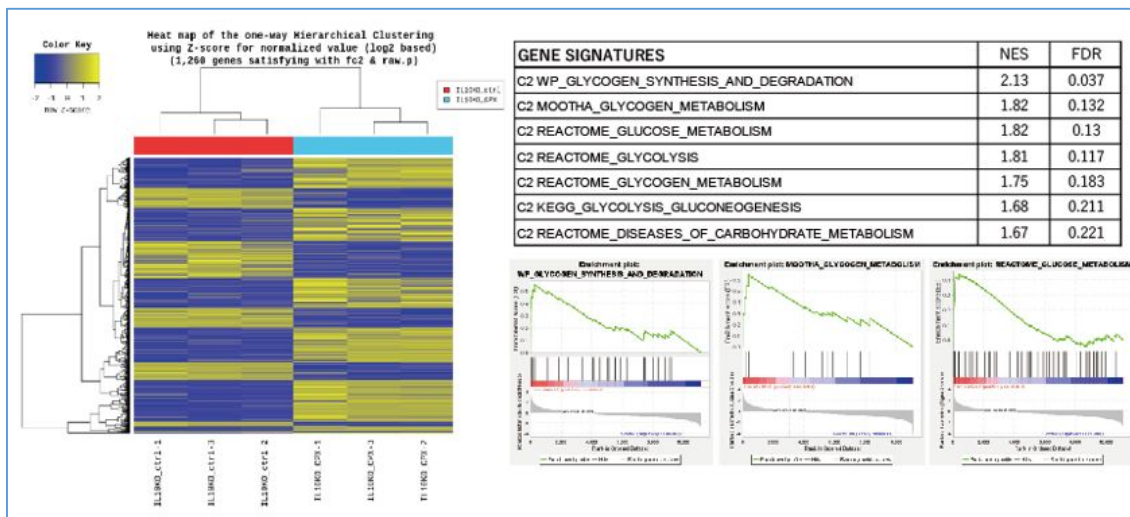
通常培地での条件下では細胞内鉄は一定の範囲内に維持されているため、細胞内に過剰な鉄貯留が生じず、Hinokitiol を用いても細胞外への鉄の移動がそれほど引き起こされないため、対象群と比較して有意な差を認めなかった。

これに対して、慢性炎症下の条件を再現するために、Hepcidin を培地に加えて pre-treatment して細胞内鉄を増やす工程を挟んでから Hinokitiol を投与して LPS 刺激を行った。Hepcidin を培地に加えて細胞内鉄を増やした後に、LPS 刺激のみを行った対照群と比較して、LPS と共に Hinokitiol を加えた群では細胞内鉄の減少に伴って、炎症性サイトカインの産生が低下する傾向が確認されたが、実験系の再現性を検証するための検討を行っている。

細胞内鉄の減少がマクロファージの遺伝子発現に及ぼす影響

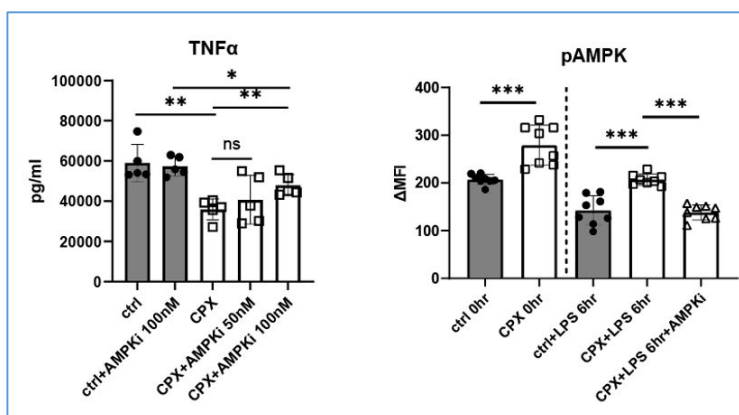
Control 群と鉄キレート群と 1260 の遺伝子発現に有意差を認め、鉄キレート群において 814 遺伝子が発現亢進し、446 遺伝子が発現低下していた。GSEA 解析により糖代謝に関わる遺伝子の発現が有意に変化していることが確認された。また、KEGG pathway 解析では、糖代謝に関わる遺伝子の亢進だけでなく、酸化リン酸化に関わる遺伝子の抑制も確認された。

これらのことからマクロファージ細胞内鉄の多寡により細胞内代謝に関わる遺伝子が変化し得ることが明らかになった。



マクロファージ細胞内鉄と AMPK pathway に着目した解析

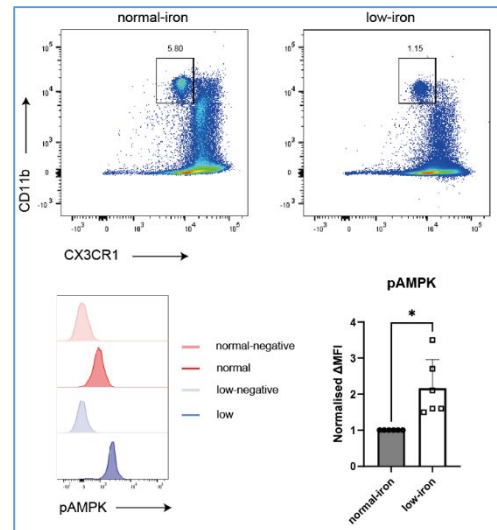
で得られた遺伝子発現結果を基に、マクロファージの炎症惹起能の低下に寄与する signaling pathway を解明するために、細胞内代謝と炎症に関りの深い AMPK、HIF-1、PI3K に着目して、IL-10KO マウスの BMDM で rescue 実験を行ったところ、鉄キレート群の LPS 刺



激時に AMPK 阻害薬を追加すると炎症惹起能が部分的に回復することが確認され、細胞内の pAMPK が control 群と同程度に低下していることを確認した。

また、IL-10KO マウスの腸管マクロファージにおける AMPK 発現を比較したところ、鉄制限群の腸管マクロファージでは pAMPK の発現が control 群に比べて亢進していることを確認した。

AMPK は細胞内でエネルギーの減少を感知して、ATP 産生の促進と、消費の抑制を促し、ATP のレベルを回復させる作用をしており、AMPK が活性化することで、糖や脂肪や蛋白質の合成は抑制され、ATP が産生されるようになる。鉄は細胞内で種々の代謝酵素にも利用されているため、細胞内鉄が少なくなると代謝が阻害されてエネルギー産生が低下し、AMPK が活性化している機序が考えられた。



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 |
|---------|---------|
|---------|---------|