

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791501

研究課題名（和文） 各種プロテアーゼ活性による炎症性腸疾患の病態制御機構の解明

研究課題名（英文） Plasmin inhibition protects against dextran sulfate sodium-induced colitis

研究代表者

小見山 博光 (KOMIYAMA HIROMITSU)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：30348982

研究成果の概要（和文）：

クローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)の病態には、炎症性サイトカインの重要性が広く認知されており、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)などの蛋白分解酵素がその活性化調節に関与していることが報告されている。研究代表者らは、MMPの活性化を制御している線維素溶解系(線溶系)因子群に着目し、線溶系阻害剤を投与することによる病態制御—炎症性サイトカインの分泌抑制、そして白血球の組織中への動員抑制を試みた。デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)大腸炎モデルマウスを作製し、さらに線溶系阻害剤を投与することにより、血液中の MMP 活性の抑制、サイトカイン濃度の低下が認められること、白血球の腸管粘膜への浸潤抑制、腸管構造の維持、炎症抑制に効果があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Treatment of ulcerative colitis is generally effective in relieving symptoms, but is not curative. Typically, this disease evolves with a relapsing and remitting course. Tissue remodeling by proteases like matrix metalloproteinases (MMP) have been described as a component of inflammatory bowel disease. There is mounting evidence that MMPs are the predominant proteinases expressed in the gut mucosa during active ulcerative colitis. Others and we showed that plasmin can activate several MMPs.

Here, we investigated the function of MMP9 and plasminogen in a DSS (Dextran sulfate sodium) induced animal model of acute colitis. Pharmacological inhibition, an active-center-directed inhibitor or targeted gene deletion of Plg or MMP9 prevented increased morbidity of wildtype mice during DSS colitis. This was associated with a reduced inflammatory cell infiltration in colon tissues and correlated with impaired colonic cytokine level elevation. In summary, our data show that the absence of Plg and MMP9 strongly inhibits the inflammatory response in acute colitis, which is associated with alleviation of the course of the disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：炎症性腸疾患、マトリックスメタロプロテアーゼ、TNF $\alpha$ 、線維素溶解系、炎症性サイトカイン、潰瘍性大腸炎、クローン病

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) は、小腸、大腸の粘膜または全層に炎

症を認め、びらんや潰瘍も引き起こす難治性腸疾患である。再発を繰り返すため、外科的な手術が依然として必要な症例が多い。薬物

治療には免疫抑制剤以外にもレミケードなどに代表される特定のサイトカインに対する抗体療法(レミケードの場合はTNF- $\alpha$ が標的)の開発が進んでいるが、これらにの治療に抵抗性の症例も多く、このことは、この疾患が単一のサイトカインの抑制では不十分であることを端的に示唆していると言えよう。

IBD に関与するサイトカインとしては、TNF- $\alpha$  以外にも Fas-ligand (Ueyama H et al., Gut. 43:48-55, 1998)、CD40-ligand (Ludwiczek O et al., Int J Colorectal Dis. 18:142-147, 2003)、最近では Toll 様受容体のリガンド類の関与が示唆されている(Yi Liu et al., Gastroenterology 25:209-214, 2006)。近年の研究で、これらの炎症性サイトカインは いずれも細胞外微小環境(細胞外マトリックス)の構成分子を基質とするマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)あるいは ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーと呼ばれる金属要求性蛋白分解酵素群による細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)によって産生が調節されていることが解ってきた(English WR et al., J Biol Chem. 275:14046-55, 2000, Hattori K et al., Leuk Lymphoma. 38:553-61, 2000)。最近になって、IBD の腸管内皮傷害と MMP 活性の相関についても論じられており (Pedersen G et al., Clin Exp Immunol., 155:257-65, 2009)、こうした研究成果は MMP の活性化が炎症性サイトカインの産生を介して IBD 病勢を制御している可能性を示唆していると言える。

代表者らのグループの研究で、炎症や生体因子の投与による末梢血、組織中への白血球の動員または浸潤過程において、各種 MMP・ADAM が活性化されることが判明している (Heissig B et al. Cell 2002, Heissig B et al. J Exp Med 2005)。代表者らは、これら各種のプロテアーゼの活性が、人為的に作製した末梢の虚血壊死性病変に集簇する白血球、そして顆粒球の動員を制御していることを明らかにした(Ohki Y et al. FASEB J 2005, Jin DK et al. Nature Medicine 2006)。IBD 等の炎症反応に応じて傷害部位に集簇する白血球が、細胞外マトリックスを構成する組織構造蛋白を分解し組織内に侵入する上で、これらの各種プロテアーゼが、重要な役割を担っていることは容易に推測できる。最近、IBD に対し、活性化した白血球を除去する白血球除去療法、顆粒球除去療法の有効性が確認(有効率 60%)しているが、このことは MMP が、炎症性サイトカインのプロセッシングを制御する以外に、白血球の循環血液中への動員や組織内浸潤にも関与している可能性を示唆している。リンパ球を含む白血球は、炎症性サイトカインの産生自体を担っている細胞も含んでおり、これらの知見から代表者らは、各種 MMP・ADAM 活性の制御は、白血球に

代表される炎症性細胞浸潤とサイトカイン分泌の両面に作用することにより、IBD で展開される免疫反応、炎症反応の抑制に寄与するとの仮説に至った。

しかしながら、かなり以前から癌治療薬として世界的に研究開発が進められている MMP 阻害剤については、これまで筋骨格系疼痛や関節炎(Levitt NC, et al., Clin Cancer Res., 7:1912-22, 2001)などの重篤な副作用の影響で、米国での臨床治験も暗礁に乗り上げた状況にある。近年、代表者らは、主にセリンプロテアーゼに属する線維素溶解系(線溶系)因子の代表であるプラスミンが、潜在型酵素 ProMMP から MMP への変換—MMP の活性化を制御していることを明らかにした(Heissig B et al., Cell Stem Cell., 1:658-670, 2007)。さらに最近、組織プラスミノゲンアクチベータを使用した線溶系の亢進が、MMP の活性化を介して、末梢組織中への白血球動員と一部の炎症性サイトカインの分泌を促進すること明らかにした(Ohki M, Komiyama H et al., Blood. 2010)。これらの代表者らの研究成果及び実験結果は、前出の代表者らの仮説を裏付けるものであり、線溶系を起点とした IBD 病態の制御という本研究の着想に至った経緯である。

## 2. 研究の目的

代表者らは、これまでの研究成果を通じて、IBD の病態に関与されるとする多くのサイトカインの産生分泌、そして白血球及び顆粒球の末梢組織中への動員が、各種 MMP・ADAM 等の活性によって制御されていることを示唆した。さらに、主にセリンプロテアーゼに属するプラスミンに代表される線溶系因子による潜在型酵素 ProMMP からの MMP の活性化機構を解明した。これらの研究成果を基礎として、代表者らは、線溶系因子群の活性が、上流から MMP 活性を制御することにより、顆粒球を主とした白血球に代表される炎症性細胞浸潤とサイトカイン分泌の両面に作用し、IBD で展開される免疫反応、炎症反応の抑制に寄与するとの仮説に至った。本研究の主目的はこの仮説の検証にある。また、線溶系阻害剤—プラスミン阻害剤による炎症性サイトカインの分泌抑制効果の検証、および IBD 治療効果の検証に基づく新規 IBD 治療法開発の基盤形成までをその目的の範疇とする。

具体的には、1) 腸炎モデルマウスを用いてプラスミン阻害剤の炎症抑制効果を確認し、さらに、2) 各種炎症性サイトカインの産生分泌抑制効果を評価すること、3) 消化管上皮組織に対する白血球の浸潤抑制効果を評価することを主な細目とし、プラスミン阻害剤による IBD 病態改善効果を総合的に

明らかにすることを中心に研究を進める。

### 3. 研究の方法

#### ①プラスミン(Plg)、MMP9 各ノックアウトマウスを用いた腸炎モデルの作製と、炎症の評価

- 1) Plg, MMP9 各ノックアウトマウスに対して、2%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を飲水させて DSS 腸炎モデルを作製する。
- 2) 1) の処理後に各群マウスの体重変化、生存率、下痢、下血等の所見を観察する。
- 3) 1) の処理後の各群マウスより消化管を摘出する。同時に末梢血を採取する。
- 4) 3) で採取した各群マウスの消化管より病理組織標本を作製し、組織学な所見について調べる。
- 5) 3) で採取した各群マウスの消化管をホモジナイズして lysate を調製し、TNF $\alpha$  等のサイトカインの活性について調べる。

#### ②プラスミン阻害剤 YO-2 による炎症抑制効果の評価

- 6) 野生型マウス (C57BL/6) を用いて DSS 腸炎モデルを作製する。プラスミン阻害剤である YO-2 の皮下投与(4mg/kg/day 連日)群と溶媒(PBS)のみ投与の対照群をそれぞれ作製する。
- 7) ①2~5) 同様に解析を行い、プラスミン阻害剤 YO-2 の効果について評価する。サイトカイン類の活性測定に加えて、MMP9 等プロテアーゼ、線溶系因子群の発現量や活性について検討する。
- 8) 作製した組織標本を用いて、組織内への白血球浸潤の評価を免疫蛍光染色法により行い、炎症との関係性および阻害剤の効果について調べる。
- 9) 採取した各群マウスの末梢血中の白血球数について、FACS による解析を行う。

### 4. 研究成果

#### ①プラスミン(Plg)、MMP9 各ノックアウトマウスを用いた腸炎モデルの作製と、炎症の評価

Plg, MMP9 各ノックアウト(-/-)マウスを用いて DSS 腸炎モデルを作製し、体重、下痢、下血、生存率の経時変化を検討した。MMP9-/-群は対照群と比較して体重減少が有意に抑制され、観察期間を通じて生存率も有意に高かった。下痢、下血については、その発症が対照群と比較して優位に遅延した。また、Plg-/-マウスを用いた DSS 腸炎モデルにおいても同様の結果が得られた。

DSS 腸炎に対して MMP9-/-マウスが有意に抵抗性を示したことから、腸管構造が維持さ

れているか確認するために、DSS 投与から 7 日目で解剖して組織切片を作製した。MMP9-/-群においては粘膜層 (mucosa) が維持されていたが、対照群は mucosa の欠落が認められた。

さらに、炎症性サイトカインの分泌について評価するために、血清ならびに消化管組織中の TNF $\alpha$  分泌量を ELISA 法により測定した。MMP9-/-群は全観察期間を通じて血清、消化管組織いずれの TNF $\alpha$  量も低値であるのに対し、対照群は有意に高値を示した。

以上の結果から、DSS 投与に対する MMP9-/-マウスの炎症抵抗性が示唆された。

#### ②プラスミン阻害剤 YO-2 による炎症抑制効果の評価

C57BL/6 マウスを用いて DSS 腸炎モデルを作製し、プラスミン阻害剤(YO-2)投与群と対照(PBS)群に分けて、①同様の解析手法により、炎症の評価を行った。

体重、下痢、下血、生存率の経時変化を調べた結果、YO-2 投与群は対照群と比較して体重減少が有意に抑制され、観察期間を通じて生存率も有意に高かった。下痢、下血については、その発症の遅延ならびに頻度の減少が確認された。

DSS 腸炎において YO-2 投与によって腸管構造が維持されるのか、病理組織像による解析を行った。DSS 投与から 7 日目で解剖して組織切片を作製した。YO-2 投与群においては粘膜層 (mucosa) が維持されていたが、対照群は mucosa の欠落が認められた。

YO-2 投与群において、実際に炎症が起こっていないのかどうか、炎症性サイトカインの分泌について測定することで検討を行った。同時に、YO-2 投与による線溶系阻害が MMP9 の活性化を抑制しているかについても評価した。

各群マウスより血清および消化管組織を回収し、ELISA 法により MMP9、TNF $\alpha$  量をそれぞれ測定した。YO-2 投与群において全観察期間を通じて MMP9 の抑制効果が確認された一方で、対照群は 7 日目の時点で、血清、消化管組織いずれにおいても MMP9 の活性が亢進していることが明らかとなった。また、TNF $\alpha$  分泌量についても、7 日目において対照群で有意に亢進していることが判明した。

YO-2 投与によって炎症部位に対する白血球の浸潤がどのように変化しているのか検討を行った。F4/80 陽性のマクロファージを免疫蛍光染色法、ならびに FACS 解析により評価したところ、YO-2 投与群においては消化管組織内へのマクロファージの浸潤の抑制、細胞数の減少が確認された。Gr-1 陽性の好中球についても同様の解析を実施した結果、同じように好中球の浸潤の抑制、細胞数

の減少が確認された。

以上の結果から、腸炎モデルマウスにおいて、新規プラスミン阻害剤 YO-2 が、TNF $\alpha$  等の炎症性サイトカインの分泌を抑制すること、白血球の腸管粘膜への浸潤抑制、腸管構造の維持、炎症抑制に効果があることが明らかとなった。

線溶系抑制による IBD 病態改善のアプローチはこれまでになく、今後その分子メカニズムを解明することが、新規治療薬の可能性を示唆するものとして重要な役割を担っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyata T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K.: Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood*. **119**(26):6382-93 (2012) 査読有
2. Investigation of peripheral blood free cancer cells using CEA mRNA in perioperative colorectal cancer patients. Kiichi Nagayasu, Hiromitsu Komiyama, Shun Ishiyama, Dai Ogura, Rina Takahashi, Yoshihiko Tashiro, Koichiro Niwa, Kiichi Sugimoto, Yutaka Kojima, Michitoshi Goto, Yuichi Tomiki, Shinichiro Niwa, Kazuhiro Sakamoto: *Molecular and Clinical Oncology*, **1**(4): 668-674, 2013 査読有
3. Analysis of the Effects of Alleviating Adverse Events and Improving Completion in Colorectal Cancer Patients with Postoperative Adjuvant Chemotherapy with PSK. Kiichi Sigimoto, Rina Takahashi, Shun Ishiyama, Masaki Hata, Hirohiko Kamiyama, Hiromitsu Komiyama (corresponding author), Makoto Takahashi, Yutaka Kojima, Michitoshi Goto, Hironobu Sengoku, Yuichi Tomiki, Kazuhiro Sakamoto: *Juntendo Medical Journal* **58**(5): 422-430 2012
4. Sugimoto K, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K.: Glasgow

Prognostic Score (GPS) as a prognostic factor in patients undergoing curative surgery for colorectal cancer.

*Dig Surg*.**29**(6) ,503-509, 2012

5. 生体内組織再生における線維素溶解系因子 PAI-1 の機能解明 田代 良彦, 西田知恵美, イスマイル・グリツリ, 小泉摩季子, 佐藤 弥生, 小見山 博光, 佐藤 亜紀, 坂本 一博, 宮田 敏男, 楠畑 かおり, 中内 啓光, ハイジツヒ・ベアテ, 服部 浩一. *臨床血液*(0485-1439)**52** 巻9号 Page1136(2011.09)

[学会発表] (計6件)

1. 田代良彦、宗像慎也、西田知恵美、石原誠人、Ismael Gritli、佐藤亜紀、島津浩、楠畑かおり、小泉摩季子、小見山博光、坂本一博、宮田敏男、中内啓光、Beate Heissig、服部浩一：PAI 1 阻害剤による血管新生及び組織再生促進療法、第 12 回再生医療学会、横浜、2013/03/22
2. 小見山博光、青木順、岡澤裕、水越幸輔、高橋里奈、河合雅也、嵩原一裕、宗像慎也、田代良彦、神山博彦、高橋玄、小島豊、五藤倫敏、富木裕一、坂本一博：大腸癌における原発巣ゲノム変異と肝転移、予後との関連性。第 74 回日本臨床外科学会総会、2012/11/29～12/1、東京
3. Kazuhiro Takehara, Jun Aoki, Yu Okazawa, Rina Takahashi, Kosuke Mizukoshi、Masaya Kawai, Shinya Munakata, Yoshihiko Tashiro, Kiichi Nagayasu, Koichiro Niwa, Shun Ishiyama, Kiichi Sugimoto, Masaki Hata, Hirohiko Kamiyama, Hiromitsu Komiyama, Yukihiro Yaginuma, Makoto Takahashi, Yutaka Kojima, Michitoshi Goto, Atsushi Okuzawa, Yuichi Tomiki, Kazuhiro Sakamoto: Seven patients with simultaneous ovarian metastasis from colorectal cancer. The 13 Korea-Japan-China colorectal cancer symposium, Seoul, Korea 2012/9/8・9
4. Shinya Munakata, Yoshihiko Tashiro, Hiromitsu Komiyama, Hiroshi Shimazu, Aki Sato, Chiemi Nishida, Ismael Gritli, Kaori Kusubata, Beate Heissig, Kazuhiro Sakamoto, Koichi Hattori:
5. Plasmin inhibition protects against

dextran sulfate sodium-induced colitis., 平成24年度医科学研究所研究成果発表会、第1位、東京、2012/06/01

6. 小見山 博光, 田代 良彦, 秦 政輝, 神山 博彦, 柳沼 行宏, 小島 豊, 仙石 博信, 奥澤 淳司, 富木 裕一, 坂本 一博 :  
大腸癌における p53 変異と臨床および病理学的所見との関連. 日本消化器外科学会総会 66 回 2011.07
7. 小見山 博光, 田代 良彦, 永易 希一, 丹羽 浩一郎, 小野 誠吾, 石山 隼, 杉本 起一, 秦 政輝, 神山 博彦, 高橋 玄, 柳沼 行宏, 小島 豊, 五藤 倫敏, 田中 真伸, 仙石 博信, 奥澤 淳司, 富木 裕一, 坂本 一博 :  
大腸癌における 17p13 領域欠損と臨床および病理学的所見との関連. 日本大腸肛門病学会雑誌(0047-1801) 64 巻 4 号 289 頁, 2011.04

[その他]

ホームページ

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kabusyokakan/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小見山 博光 (KOMIYAMA HIROMITSU)  
順天堂大学・医学部・講師  
研究者番号：30348982

### (2)研究協力者

服部 浩一 (HATTORI KOICHI)  
東京大学・医科学研究所・特任准教授  
研究者番号：10360116