

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790673

研究課題名(和文)シクロスポリンによる制御性T細胞を介したTGF- β の発現調節

研究課題名(英文)Cyclosporin regulates TGF-beta expression of intestinal mucosa by regulatory T cells

研究代表者

櫻庭 裕丈(SAKURABA, HIROTAKE)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90422063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：シクロスポリンによる腸管粘膜障害抑制効果の発現機序を、デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルを用いて解析。SCIDマウスに野生型マウスの脾臓より分離した制御性T細胞を移入後に腸炎を誘発。シクロスポリン投与により腸炎抑制効果を認め、腸管局所でのTGF- β の発現増強と腸上皮アポトーシス増加抑制効果を認めた。また、抗TGF- β 抗体投与によりその効果は相殺された。分離した制御性T細胞をシクロスポリンで刺激培養してもTGF- β の発現増強は認めなかった。従ってシクロスポリンによるTGF- β 発現調節を介した腸管粘膜障害抑制効果には制御性T細胞の存在が不可欠であるが、直接作用ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cyclosporine (CsA) showed a rapid improvement in the treatment of ulcerative colitis, but the precise mechanism is still obscure. We hypothesized that CsA would affect the TGF-beta expression of intestinal mucosa. Colitis was induced by feeding of 4% DSS in CD4+CD25+cells-transferred SCID mice. Treatment of CsA ameliorated mucosal destruction through reduction of epithelial apoptosis. CsA up-regulated the TGF-beta in the colon. TGF-beta expression was significantly suppressed and treatment of CsA failed to up-regulate the expression of TGF-beta in SCID mice. On the other hand, treatment of CsA up-regulated TGF-beta expression in CD4+CD25+cells-transferred SCID mice. However, TGF-beta production from separated-CD4+CD25+cells was not increased by treatment of CsA in vitro. These results demonstrate that treatment of CsA can ameliorate epithelial damage through TGF-beta-related pathway. CD4+CD25+T cells would indirectly mediate the protective effect of CsA via TGF-beta-related pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 TGF-beta 腸管上皮細胞 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(UC)における治療成績は、Infliximab(IFX)に代表される抗 TNF- α 療法及びシクロスポリン、FK506 といった calcineurin 阻害剤、顆粒球除去療法(GCAP)などの登場により飛躍的に向上した。シクロスポリンの持続静注療法はステロイド不応性重症潰瘍性大腸炎に対して大腸全摘術を回避し、内科的緩解導入を可能にする有効な治療法であることが多くの報告により確立されつつある。その効果は投与後 3 - 4 日前後と比較的早期に出現すること、また内視鏡検査所見上は深掘れ潰瘍を有する症例で有効であるなどの特徴がある(Lichtiger S, et al, N Engl J Med. 1994)。早い効果発現と高い治療奏功率は、シクロスポリンの治療効果が活性化 T 細胞機能抑制効果のみならず腸管粘膜上皮細胞に対するバリアー機能改善、粘膜修復効果の存在を示唆する。シクロスポリンの治療効果発現機序が UC の免疫異常の是正に強く関わっている可能性がある。従ってその作用機序解明により、UC そのものの病態の 1 つを明らかにできる可能性がある。

一方、IBD 患者の腸管粘膜においては腸上皮細胞のアポトーシス増加があり、それに伴うバリアー機能の破綻が病態形成に深く関与する。研究代表者は、これまでに炎症疾患動物実験腸炎モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルにおいてシクロスポリンが腸管粘膜局所での TGF- β シグナルの発現を高めることにより腸上皮細胞アポトーシスを介した粘膜障害を抑制することを明らかにしている(Biochem Biophys Res Commun 2007;359, Am J Physiol,2009;297)。さらに予備実験において、その TGF- β 発現増強効果は T・B 細胞の欠損した SCID マウスでは認めず、シクロスポリンによる粘膜障害抑制効果も認めないため、T, B 細胞がその調節メカニズムに関与していることを想定した。

2. 研究の目的

これまでの研究を進展させ、シクロスポリンによる治療効果すなわち TGF- β シグナルの発現調節の作用点として、制御性 T 細胞を介した効果の機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

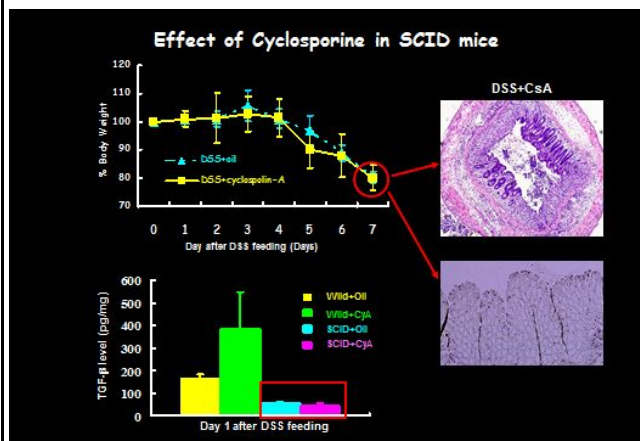
炎症性腸疾患の動物モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルを用いて解析を行った。野生型マウスの脾臓より autoMACS にて CD4+CD25+制御性 T 細胞を分離 (1x10⁸cell あたり 1x10⁶cell CD4+CD25+細胞を得ることができる)。T・B 細胞の欠損した SCID マウスに野生型マウスの脾臓より分離した CD4+CD25+制御性 T 細胞を (1 個体あたり 2x10⁵cells) 移入後に 4 % DSS を自由飲水させ腸炎を誘発。CsA は DSS 飲水開始 1 日前より 2.0 mg/kg で連日腹腔内

投与し、抗 TGF- β 抗体は DSS 飲水開始時に 50 μ g/head で腹腔内投与した。腸炎の評価は、体重変化、H&E 染色による病理組織学的スコア (DSS 投与 5, 6, 7 日目) TUNEL 法による腸上皮細胞アポトーシス数 (DSS 投与 4, 5, 6 日目)で行った。分離した腸管組織から蛋白抽出し ELISA 法により IL-22, TGF- β の発現レベルを検討した。また、分離した CD4+CD25+制御性 T 細胞を in vitro でシクロスポリンでの 24 時間刺激培養 (0.1, 0.5, 1.0 μ g/ml) を行い培養上清の TGF- β の発現レベルを測定した。

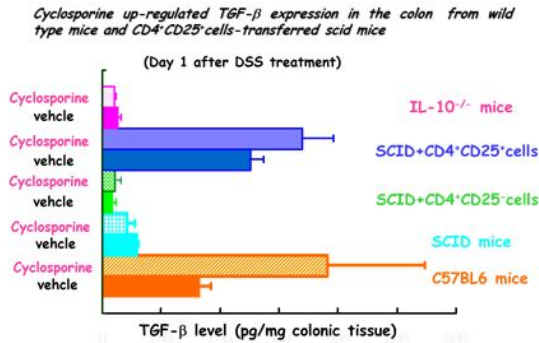
4. 研究成果

SCID マウスではシクロスポリン投与にても腸上皮細胞アポトーシス抑制効果を認めず、粘膜障害抑制効果を認めなかった。また腸管局所の TGF- β の発現レベルも野生型マウスではシクロスポリン投与にて発現増強を認めているが、SCID マウスでは発現増強効果も認めなかった。(図 1) 一方、CD4+CD25+制御性 T 細胞を移入後に腸炎を誘発した SCID マウスでは、シクロスポリン投与により腸管局所での TGF- β の発現増強を認めた。(図 2) また、CD4+CD25+制御性 T 細胞を移入 4 週後に腸炎を誘発した SCID マウスでは、シクロスポリン投与により腸炎抑制効果を認め、腸上皮アポトーシス増加抑制効果も野生型マウスと同様に認めた。また、抗 TGF- β 抗体投与によりその効果は相殺された。(図 3, 4) 分離した CD4+CD25+制御性 T 細胞をシクロスポリンで刺激培養しても TGF- β の発現増強は認めなかった。従ってシクロスポリンによる TGF- β 発現調節を介した腸管粘膜障害抑制効果には制御性 T 細胞の存在が不可欠であるが、直接作用ではないことが明らかとなった。

(図 1)

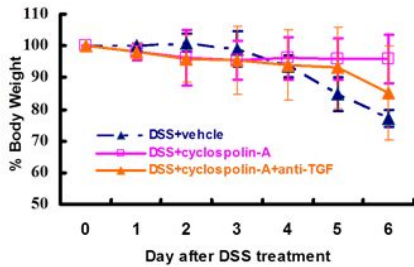


(図 2)

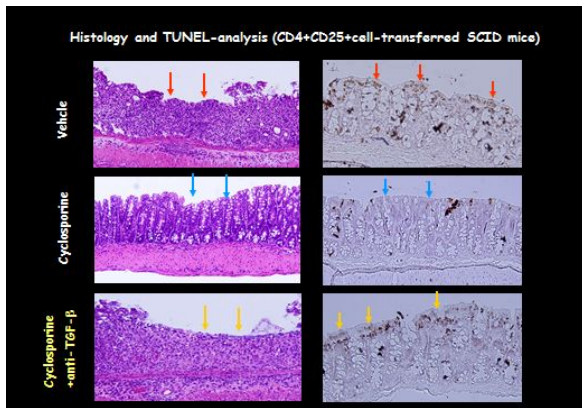


(図 3)

Cyclosporine ameliorated mucosal injury via increased epithelial apoptosis in CD4⁺CD25⁺cells-transferred scid mice. The effect of cyclosporine abolished in anti-TGF- β Ab treatment.



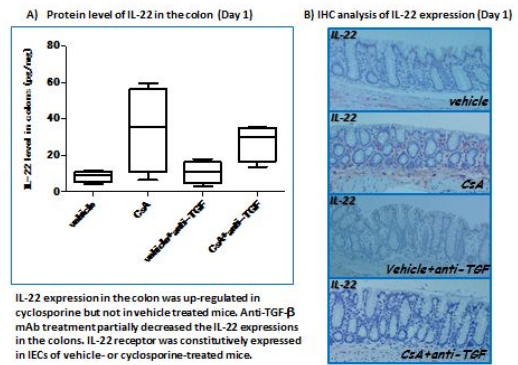
(図 4)



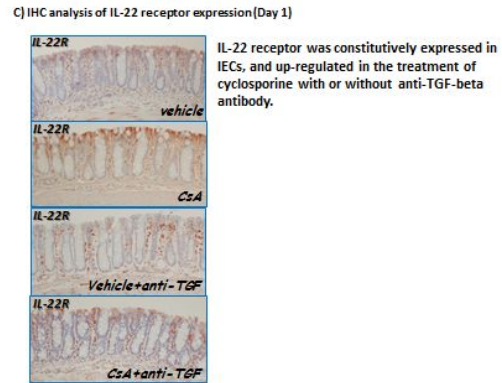
これまでの予備実験において、分離した腸上皮細胞のRNAアレイの解析からシクロスポリンの効果発現機序に関していくつかの候補因子が抽出されている。その中の1つのIL-22に関連した分子について解析を進めることとした。シクロスポリンによる発現調節に存在する因子としてIL-10ファミリーに属す

るサイトカインの1つであるIL-22に注目し腸管上皮細胞のIL-22受容体-STAT3制御を介した効果について検討した。その結果、シクロスポリン投与により腸管局所のIL-22の発現増強と腸上皮細胞IL-22受容体の発現増強を認め、かつ抗IL-22抗体投与により腸管粘膜障害抑制効果が相殺された。また抗TGF- β 抗体投与によりシクロスポリン投与による腸上皮細胞IL-22受容体の発現増強効果が相殺された。(図5、6、7)シクロスポリンによるTGF- β 発現調節とIL-22-STAT3シグナル調節の関連による腸上皮細胞アポトーシス制御が示唆された。今後はこの現象の再現性の確認とさらなる詳細な機序の解析を行っていく方針である。

(図 5)

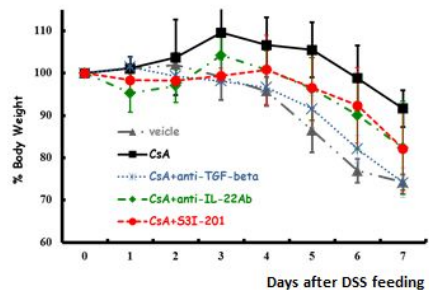


(図 6)



(図 7)

抗IL-22抗体及びSTAT3インヒビター投与によりシクロスポリンによる治療効果を抑制する。



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1件)

Cyclosporine protects from apoptosis-mediated epithelial damage through epithelial STAT3 signaling pathway in DSS-induced colitis Hirotake Sakuraba, Yoh Ishiguro, Hiroto Hiraga, Keisuke Hasui, Shinsaku Fukuda
Inflammatory Bowel Disease 2013 Supplement 19(13); S103-104

(査読なし)

〔学会発表〕(計2件)

2013 Advances Inflammatory Bowel Disease CCFA
December 12-14, 2013 Hollywood Florida USA

Cyclosporine protects from apoptosis-mediated epithelial damage through epithelial STAT3 signaling pathway in DSS-induced colitis

Hirotake Sakuraba, Yoh Ishiguro, Hiroto Hiraga, Keisuke Hasui, Shinsaku Fukuda

The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis
June 13-14, 2013 Hotel Laforet Tokyo

Cyclosporine protects from apoptosis-mediated epithelial damage through epithelial STAT3 signaling pathway Hirotake Sakuraba, Yoh Ishiguro, Hiroto Hiraga, Keisuke Hasui, Shinsaku Fukuda

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻庭 裕文 (SAKURABA Hirotake)

弘前大学医学部附属病院・助教

研究者番号：90422063

(2)研究協力者

平賀 寛人 (HIRAGA Hiroto)

弘前大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：80637546