

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461961

研究課題名(和文) 血液線維素溶解系による炎症性腸疾患の病態制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Studies in the action mechanism of fibrinolytic system on the inflammatory bowel disease and its clinical applications

研究代表者

小見山 博光 (Komiya, Hiromitsu)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：30348982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では炎症性大腸炎(IBM)の線維素溶解系(線溶系)による病態制御機構の解明と有効な治療法開発を目標とした。IBMモデルマウスではプラスミンの濃度が高かったが、プラスミン阻害剤を処置したマウスはIBMを発症せず、炎症性サイトカイン類の濃度は低下、好中球やマクロファージの腸管粘膜への浸潤も減少した。またマトリックスメタロプロテアーゼ9(MMP9)の亢進がIBM発症を促進する事を確認した。更に線溶系因子である好中球エラスターゼの阻害剤投与でも病態が改善することを明らかにした。線溶系の抑制によって炎症回路を阻害することがIBMの治療に有効と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We previously verified inflammatory bowel diseases (IBM) was suppressed by fibrinolytic system inhibitors in mice. In this study, we aimed to clarify functions of fibrinolytic system in development of IBM. Circulating levels of plasmin were higher in mice with colitis than in control mice. Colitis did not develop in mice injected with plasmin inhibitors or with plasminogen-binding proteins. Colons dissected from these mice had been reduced infiltration of Gr1+ neutrophil and F4/80+ macrophage, and reduced levels of inflammatory cytokines and chemokines. We also found that activation of endogenous MMP9 leads colonic inflammation. Moreover, application of neutrophil elastase inhibitor improved therapeutic conditions of IBM in the mice. These results suggested that the disruption of chronic inflammatory circuit by inhibition of fibrinolysis factors should be an effective method for IBM treatment.

研究分野：消化器外科学

キーワード：炎症性大腸炎 クロウン病 IBM 血液線維素溶解系 マトリックスメタロプロテアーゼ 好中球エラスターゼ プラスミン 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) は、腸管粘膜、全層に炎症や潰瘍を引き起こす難治性疾患である。IBD の病態制御に関わる諸要因は未だ完全には解明されていない。また IBD では再発を繰り返すために外科的な手術が必要となる症例が多く、非侵襲かつ有効な治療の確立が望まれている。

これまで IBD 病態に関する TNF- α 、 Fas-ligand, CD40-ligand, Toll 様受容体等の炎症性サイトカインが報告されており、近年は各種サイトカインに対する抗体療法の開発が進んでいる。しかしこうした療法に対する治療抵抗性も生じており、現状では薬物による治療体制が万全であるとは言いがたい。

代表者らはすでに、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ナーゼ (MMP) が炎症性サイトカインの調節に関与することを示し(Hattori K et al, Leuk Lymphoma, 2000)、さらに線維素溶解系(線溶系)因子であるプラスミンと、MMP の制御(Hattori K et al, Cell Stem Cell, 2007)、線溶系亢進による炎症性サイトカインの分泌促進などを明らかにした(Ohki M et al, Blood, 2010)。またリンパ腫において、プラスミン阻害剤による白血球の組織内浸潤抑制、腫瘍細胞の増殖抑制効果(Hattori K et al, Leukemia, 2012)を報告した(Hattori K et al, J Biol Chem, 2011)。

最近、白血球除去療法、顆粒球除去療法の IBD に対する有効性が確認されているが、このことから、細胞外基質を分解する MMP が白血球の動員や浸潤に関与している可能性が考えられる。また代表者らのグループの研究では、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ける MMP・ADAM の活性化が判明している(Heissig B et al. Cell 2002, Heissig B et al. J Exp Med 2005)。しかし MMP 阻害剤はかつて癌転移阻害薬として期待されながら、深刻な副作用などが顕在化したという経緯があり、臨床適用は現実的ではない。

一方、MMP を制御するプラスミンの阻害剤には、MMP 阻害剤にみられるような重篤な副作用の報告は無い。さらにプラスミンは複数の炎症性サイトカインを同時に抑制することが期待できることから代表者らはプラスミン阻害の IBD 病態調節機序を解明することが、臨床応用をめざす上で有意義であると考えた。

一方、他の線溶系因子のうち IBD 病態制御・改善に寄与する因子を探り、利用を図ることも意義深い。代表者らは IBD 等の炎症反応に応じて傷害部位に集簇する白血球が組織内に侵入する上で、各種プロテアーゼが重要な役割を担うものと推測している。また好

中球エラスターゼが線溶系に關与することが指摘されていることから、本研究では好中球エラスターゼ阻害剤が IBD の病態を改善する可能性にも着目した。

以上から、線溶系抑制の作用機序の解明、線溶系を起点とした病態の制御システムの構築が前例のない新規 IBD 治療法の確立に結びつく重要な課題であると認識し、すでに代表者らが IBD 抑制効果を確認しているプラスミン阻害剤の、線溶系・MMP 制御を介した作用機序を明らかにするほか、線溶系に介在するエラスターゼの阻害による IBD 病態抑制効果を検証する本研究を計画した。

2. 研究の目的

代表者らはすでに腸炎モデルマウスにおいて、線溶系タンパク質分解酵素プラスミンの阻害剤が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を明らかにした。

そこで本研究では、1) プラスミン阻害剤が炎症性サイトカインの分泌抑制を引き起こす際に作用する末梢血中の血球成分を特定する評価をすること。

さらに2) 線溶系因子であり様々な機能性分子を分解する好中球エラスターゼに着目、IBD 病態との関係を明らかにすること、好中球エラスターゼ阻害剤の臨床適用可能性検証を目指した。

即ち、本研究では線溶系抑制に伴う MMP 活性抑制の結果、IBD 病態改善に至るまでの分子メカニズム、シグナル pathway を解明して線溶系阻害剤の作用機序を明確にすることを企図し、線溶系阻害剤による病態改善効果の検証ならびに、新規 IBD 治療法開発の基盤形成までを研究目標とした。

3. 研究の方法

IBD モデルマウスを作成し、線溶系プロテアーゼの阻害剤を投与、マウスから経時的に採取した末梢血、病理組織を用い、組織学的解析、FACS 解析やマイクロアレイ解析などを行うことにより、各種阻害剤の IBD 病態改善効果の評価、さらに各線溶系因子・その阻害剤が作用する際の標的細胞の同定および関連遺伝子、シグナル pathway の同定を試みた。

1) C57BL/6 マウスに対して、2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)溶液を飲水させることによる DSS モデルを作製し、これを IBD モデルマウスとして利用した。

2) IBD モデルマウスに作製するにあたり、併せてプラスミン阻害剤 Y0-2、好中球エラスター

ーゼ阻害剤の皮下投与群とコントロール群をそれぞれ作製し解析に用いた。処理後に各群マウスより消化管を摘出し同時に末梢血を採取した。

3) 採取した消化管より病理組織標本作製し、プラスミン阻害剤の効果、さらにエラスターゼ阻害剤の効果、白血球の腸管組織への浸潤など、組織学的な所見について調べた。次に組織より mRNA を抽出し、各種凝固・線溶系因子の遺伝子発現を qPCR 法により定量して、分子シグナルの動態変化を解析した。

4) 採取した各群マウスの末梢血について血球数を経時的に測定した。次に末梢血中の血漿を分離し、血液中の各種サイトカイン、蛋白分解酵素、凝固・線溶系因子等の経時的濃度あるいは活性の変化を測定した。

5) 各阻害剤の標的細胞を特定するために、2) で採取した各群マウスの末梢血中から血球分離液によって取り出された血球成分について、フローサイトメーターを使用し、各種細胞表面マーカー、各種膜型サイトカインの発現を調べた。次にこれらの細胞を培養し、その上清中の各種因子の測定を行った。

4. 研究成果

線溶系による IBD の病態制御機構の解明とその有効な治療法開発を目標に研究を行った。本研究課題の第一の特色は、IBD 病態形成に關与する炎症性サイトカインの分泌機構に注目した点にある。研究の結果、MMP 活性の制御によるサイトカイン分泌阻害、およびプラスミン、エラスターゼなどのプロテアーゼの活性阻害による IBD 病勢の鎮静化メカニズムを今回確認した。

1) プラスミン阻害剤が作用する末梢血中血球成分を FACS 解析などにより評価した。

IBD モデルマウスでは、フィブリン分解酵素プラスミンの濃度が高かったが、プラスミン阻害剤やプラスミノゲン結合蛋白等を処置したマウスでは炎症性サイトカイン類の濃度は低下し、Gr-1+好中球や F4/80+マクロファージの腸管粘膜への浸潤が減少した。

2) 好中球エラスターゼ阻害剤を投与した IBD モデルマウスでは非投与群に比して生存率は高く体重減少率は低かった。すなわち好中球エラスターゼ阻害剤には IBD の病態を改善する効果が有意に認められた。

3) 線溶系抑制に伴う MMP 阻害の結果として、IBD 病態改善に至るまでの分子メカニズム、シグナル pathway を解明することで、線溶系阻害剤の作用機序を明確にした。特に MMP9 あるいはタンパク質分解酵素群の活性化が線維溶系システムを促進する事、タンパク質分解活性の高い環境は骨髄細胞の腸上皮への流入を刺激し腫瘍壊死因子 (TNFs) と炎症性ケモカイン CXCL5 の産生を促進する、また脊髄 CD11b+細胞によるウロキナーゼ・プラス

ミノゲン活性因子放出は、プラスミンの合成を促進することなどを明らかにした。

以上、本研究ではプラスミンや MMP 阻害に加え、新たに線溶系因子である好中球エラスターゼの阻害による慢性的炎症回路の抑制が IBD の治療に有効であることを示した。

またこれまで線溶系の IBD 疾患における役割については不明な点が多く、先例の稀少な課題であったが、本研究において、線溶系因子群の IBD 病態における機能解明がなされたことから、治療抵抗性の IBD 症例に対し、代替療法を提案できる可能性が見出された。

本研究は創薬、そしてリスクの少ない新たな IBD の治療法開発の前提となるものであり、基礎的にも臨床的にも有意義な成果を得たといえる。

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7件)

Kawai M,[†] Komiyama H,^{*†} Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama, N, Sato C, Ueyama T, Okuzawa A, Goto M, Kojima Y, Takahashi, M Sugimoto K, Ishiyama S, Munakata S, Ogura D, Niwa S, Tomiki Y, Ochiai T, Sakamoto K: Impact of chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer on liver metastasis. *Oncology Letters* (査読有), 11, 2016. (in press)

<https://www.spandidos-publications.com/ol>

*Corresponding author, [†]These authors contributed equally to this work.

Munakata S, Tashiro Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahri D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B, Hattori K: Inhibition of plasmin protects against colitis in mice by suppressing matrix metalloproteinase 9-mediated cytokine release from myeloid cells. *Gastroenterology* (査読有), 148(3): 565-578, 2015.
DOI:10.1053/j.gastro.2014.12.001

Heissig B, Dhahri D, Eiamboonsert S, Salama Y, Shimazu H, Munakata S, Hattori K: Role of mesenchymal stem cell-derived fibrinolytic factor in tissue regeneration and cancer progression. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(24): 4759-4770, 2015.

DOI: 10.1007/s00018-015-2035-7

Heissig B, Eiamboonsert S, Salama Y, Shimazu H, Dhahri D, Munakata S, Tashiro Y, Hattori K. Cancer therapy targeting the fibrinolytic system. *Adv Drug Deliv Rev* (査読有), 99(B): 172-179, 2015. (review article)
DOI:10.1016/j.addr.2015.11.0105

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H, Takahashi M, Ishiyama S, Niwa K and Okubo H: Efficacy of Postoperative Adjuvant Chemotherapy According to Prognostic Factor in Patients with Stage III Colon Cancer. *Journal of Cancer Therapy* (査読有), 5: 806-816, 2014.
DOI:10.4236/jct.2014.58088

Nagayasu K, Komiyama H,* Ishiyama S, Ogura D, Takahashi R, Tashiro Y, Niwa K, Sugimoto K, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Niwa S, Sakamoto K: Investigation of free cancer cells in peripheral blood using CEA mRNA expression in perioperative colorectal cancer patients. *Mol Clin Oncol* (査読有), 1: 668-674, 2013.
DOI: 10.3892/mco.2013.109
*Corresponding author.

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H: The validity of predicting prognosis by lymph node ratio in node-positive colon cancer. *Dig Surg* (査読有), 30: 368-374, 2013.
DOI:10.1159/000355444

[学会発表](計 10 件)

(国際学会)

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H, Takahashi M, Kamiyama H, Ishiyama S, Niwa K, Ito S, Kawai M, Takehara K, Tashiro T, Munakata S, Aoki J, Okazawa Yu O, Takahashi R, Mizukoshi K, Ro H, Ichikawa R, Kure K, Honjyo K, Tsukamoto R: Comparisons of long-term outcomes for locally advanced colon cancer between laparoscopic colectomy and open colectomy; propensity score analysis 23th International Congress of the EAES. 2015年06月03日~2015年06月06日, Bucharest, Romania.

Sugimoto K, Humbert A, Lu Z, Chen C, Rodgers K, Lee, B Griffin C, Sato K, Orita H, Ito T, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K, Brock M: CHFR methylation is an independent prognostic marker of poor prognosis in

gastric cancer. AACR Annual Meeting 2015. 2015年04月18日~2015年04月22日, Pennsylvania, USA.

(国内学会)

Okazawa Y, Mizukoshi K, Komiyama H, Fujii T, Goto M, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: Patient-derived colon carcinoma cells disseminate into distant organs in various different fashions. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月08日~2015年10月10日名古屋

呉一眞, 細谷理樹, 小見山博光, 富木裕一, 落合匠, 大永崇, 坂本一博: The detection of colorectal CTC by the use of polymeric microfluidic devices. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月08日~2015年10月10日, 名古屋

本庄薫平, 塚本亮一, 植山孝恵, 伊藤慎吾, 市川亮介, 呉一眞, 盧尚志, 田代良彦, 宗像慎也, 高橋玄, 小見山博光, 小島豊, 五藤倫敏, 富木裕一, 市村敦彦, 段孝, 宮田敏男, Heissig B, 服部浩一, 坂本一博: 腹腔内癒着における線溶系阻害因子 PAI-1の機能解明第115回日本外科学会定期学術集会. 2015年04月16日~2015年04月18日, 名古屋.

盧尚志, 宗像慎也, 小見山博光, 坂本一博: セリンプロテナーゼ阻害薬による Dextran sulfate sodium(DSS)誘発腸炎の抑制機構. 第115回日本外科学会定期学術集会, 2015年04月16日~2015年04月18日, 名古屋.

Okazawa Y, Mizukoshi K, Komiyama H, Fujii T, Goto M, Habu S, Sakamoto K, Orimo A: The subsequent epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition model barely depicts colon cancer metastasis. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年09月25日~2014年09月27日, 横浜.

宗像慎也, 小見山博光, 坂本一博, Heissig Beate, 服部浩一: Inflammatory bowel disease モデルにおける線溶系を介した抑制機序. お茶の水がん学アカデミア第111回集会. 2015年02月25日, 東京.

Mizukoshi K, Okazawa Y, Komiyama H, Fujii T, Ito Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: The development of gross hepatic and pulmonary metastases in a patient-derived colorectal tumor xenograft model. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月03日~2013年10月05日, 横浜.

田代良彦, 宗像慎也, 西田知恵美, 石原誠人, Gritli Ismael, 島津 浩, 佐藤亜紀, 楠畑かおり, 小泉摩季子, 小見山博光, 坂本一博, 宮田敏夫, 中内啓光, Heissig Beate, 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 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013 年 04 月 11 日 ~ 2013 年 04 月 13 日, 福岡.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称: 術後癒着モデル及びその作成方法
発明者: 本庄薫平, 宗像慎也, 小見山博光, 坂本一博
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許
番号: 2014-225968
出願年月日: 2014 年 11 月 06 日
国内外の別: 国内

名称: 大腸がんの転移又は再発リスクの評価方法

発明者: 小見山博光, 坂本一博, 奥澤淳司, 塩澤学, 赤池信, 宮城洋平, 大津敬, 林崎良英, 伊藤昌可, 川路英哉, 大宮寛子
権利者: 学校法人順天堂, 地方独立行政法人神奈川県立病院機構, 独立行政法人理化学研究所
種類: 特許
番号: 特願 2014-017945
出願年月日: 2014 年 01 月 31 日
国内外の別: 国内

名称: 患者原発性大腸癌の個別化転移モデルマウスの作製方法

発明者: 折茂 彰, 水越幸輔, 岡澤 裕, 五藤倫敏, 小見山博光, 樋野興夫, 坂本一博
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許
番号: 特願 2013-193525 特開 2015-057974
出願年月日: 2013 年 9 月 18 日
公開年月日: 2015 年 3 月 30 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

順天堂大学 下部消化管外科
<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kabusyoukakan/>

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)研究分担者

服部 浩一 (HATTORI Koichi)
順天堂大学・医学部・特任先任准教授
研究者番号: 10360116

(3)連携研究者

HEISSIG, Beate (ハイジツヒ ベアーテ)
東京大学, 医科学研究所, 准教授
研究者番号: 30372931