

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860570

研究課題名(和文)治療標的あるいはバイオマーカーとしてのCGRPの可能性

研究課題名(英文)The possibility of CGRP as a therapeutic target and a biomarker for IBD

研究代表者

山崎 博(Yamasaki, Hiroshi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20529565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の治療応用の可能性、血管内皮前駆細胞(EPC)と関連するCGRP作用メカニズムの解析による炎症性腸疾患(IBD)の病態の解明とバイオマーカー、治療選択マーカーとしてのCGRPの可能性の検討である。検討の結果、潰瘍性大腸炎(UC)の病態にCGRPが関与し、CGRPの投与はUCの新たな治療戦略となること、CGRPがUCのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to address the mechanism of action responsible for the effect of CGRP on colitis and the possibility of a biomarker for IBD. The result was that CGRP effectively suppresses colonic injury through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines and the up-regulation of protective events, including bone marrow-derived cell induction, in addition to promoting colonic blood flow. CGRP is an attractive therapeutic target and a novel biomarker for UC patients.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 クローン病 CGRP 神経ペプチド バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我々は、UCの動物モデルを用いた検討で、白血球除去療法(LCAP)がCGRP(calcitonin gene-related peptide)の産生誘導を介して腸炎改善効果を発揮することを報告してきた(Yamasaki H, Dig Dis Sci. 2010)。

一方、ヒトUCの病変局所ではCGRP発現量の低下がみられ、CGRPがUCの病態形成に関与していることが報告されている(Fu-Jun Li, Dig Dis Sci. 2012)。このような背景から、CGRPの投与がUCの新たな治療戦略となること、CGRPがUCのバイオマーカーとして有用であることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが報告した論文、発表をふまえて、以下のことを解明することが目的である。

- (1) カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の治療応用の可能性。
- (2) Clock gene、血管内皮前駆細胞(EPC)と関連するCGRP作用メカニズムの解析による炎症性腸疾患(IBD)の病態の解明。
- (3) バイオマーカー、治療選択マーカーとしてのCGRPの可能性の検討。

3. 研究の方法

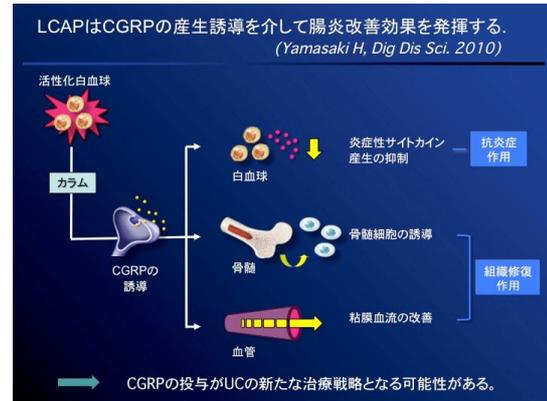
本研究は、申請者らが報告した論文、発表をふまえて、以下のことを解明することが目的である。

- (1) CGRPの治療応用の可能性
- (2) 本研究では、CGRPを正常ラットやマウス、腸炎モデルラットやマウスに投与し、その生理機能や炎症に対する効果を検討する。
- (3) Clock gene、EPCと関連すると考えられるCGRP作用メカニズムの解析を行い炎症性腸疾患(IBD)の病態の解明を行う。
- (4) バイオマーカー(治療選択あるいは疾患活動性マーカー)としてのCGRPの可能性の検討潰瘍性大腸炎、クローン病患者および健康人、炎症性発癌患者より血清、末梢血単核球および腸管手術標本より単核球を分離し、ELISAやReal-time PCRにてCGRPの発現を解析する。発現増加が確認できた場合、免疫染色やフローサイトメトリーにて発現している細胞の特定を行う。

4. 研究成果

CGRP(calcitonin gene-related peptide)は、強力な血流増加作用とともに、骨髓細胞の誘導、炎症性サイトカインの抑制作用をもつ神経ペプチドである。我々は、潰瘍性大腸炎(UC)動物モデルを用いた実験(急性モデルとしてデキストラン硫酸(DSS)大腸炎、慢性モデルとしてHLA B27トランスジェニックマウスを使用)で白血球除去療法(LCAP)の作用メ

カニズムを検討し、LCAPが内在性CGRPの産生誘導を介して腸炎改善効果を発揮することを報告してきた。



一方、ヒトUCの病変局所ではCGRP発現量の低下がみられることが最近報告され、CGRPがUCの病態形成に直接関与していることが示唆されている。このような背景から、CGRPの投与がUCの新たな治療戦略となることが期待される。またバイオマーカーとしてのCGRPの可能性についても検討した。

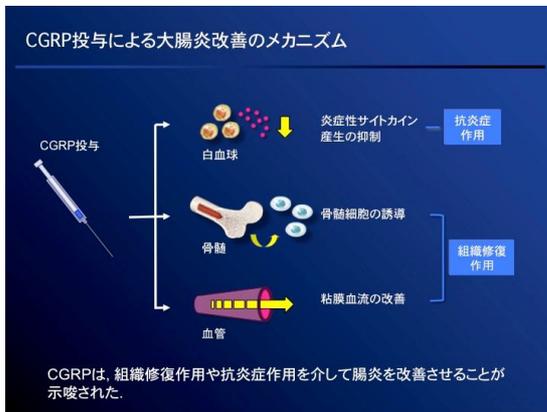
最初に、CGRPの治療応用の可能性を検討した。

初年度は、CGRPをDSS大腸炎ラットと正常ラットにCGRPを7日間経静脈投与したモデルを用いてその生理機能や炎症に対する効果を検討した。

- (1) 正常ラットから末梢血単核細胞(PBMC)を分離し、CGRP添加培養後のサイトカインレベル(IL-1, IL-6, TNF-)をRT-PCR法とELISAで測定した。
- (2) DSS大腸炎ラットにCGRPを7日間経静脈的に投与し、臨床スコア、内視鏡スコア、サイトカイン発現(IL-1, IL-6, TNF-)、CGRP受容体発現(RAMP1, CRLR)、骨髓でのCFU-GMの誘導、末梢血での血管内皮前駆細胞(EPC)の動員、腸粘膜血流量の変化を詳細に再検討した。

その結果、

- (1) in vitroでCGRPを添加すると、PBMCの炎症性サイトカイン発現、産生は濃度依存的に抑制された。
- (2) DSS大腸炎モデルの腸粘膜ではCGRP発現量は低下していた。CGRPを経静脈的投与すると、臨床スコアの改善(P=0.009)、内視鏡スコアの改善(P=0.009)、IL-1, IL-6, TNF-発現の低下、RAMP1, CRLR発現の増加、骨髓でのCFU-GMの増加(P=0.004)、末梢血でのEPCの増加(P=0.017)、腸粘膜血流量の増加(P=0.032)がみられた。



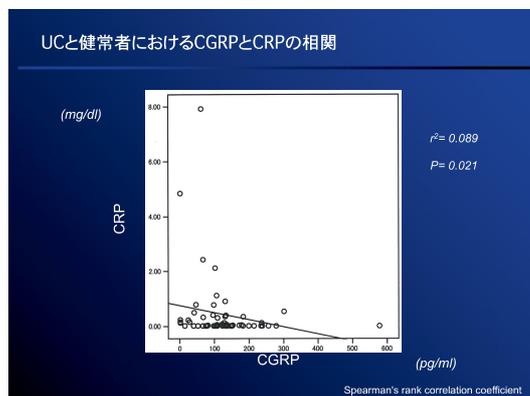
次に、動物腸炎モデルを用いた検討で CGRP が UC の病態形成に関与していることが示唆されたため、バイオマーカー(治療選択あるいは疾患活動性マーカー)としての CGRP の可能性について検討した。

次年度は、

- (1) ヒト UC 患者および健常人から PBMC を分離し、CGRP 発現を RT-PCR 法で検討した。
- (2) ヒト UC 患者に対し LCAP を施行し、サイトカイン発現、CGRP の発現の変化を検討した。
- (3) 健常者と UC 患者における血清 CGRP 濃度と血清の CRP の相関について検討した。

その結果、

- (1) ヒト UC 患者では、健常人に比べて PBMC での CGRP 発現が低下していた。
- (2) ヒト UC 患者に対する LCAP により LCAP 前後で IL-1, IL-6, TNF- α 発現の低下、CGRP の改善がみられた。
- (3) 健常者と UC 患者の血清中 CGRP と CRP は有意に負の相関を認めた。しかし CGRP のバイオマーカーとしての意義はさらなる検討が必要と考えられた。



結論として CGRP が UC の病態形成に関与していることが示唆された。CGRP 投与は、腸粘膜血流の増加・骨髄細胞の誘導による組織修復効果と、炎症性サイトカイン産生抑

制による抗炎症効果の両面からの腸炎改善効果を発揮し、UC の新たな治療戦略となる可能性があり、CGRP の測定が UC の診断・治療のバイオマーカーとなる可能性があることが、示唆された。

神経ペプチド CGRP とその関連薬剤が従来の薬剤と異なる作用メカニズムをもつ UC の治療薬となる可能性があること、CGRP の測定が UC の診断・治療のバイオマーカーとなる可能性があることを初めて見出した。

今後、IBD と CGRP とその関連物質についてさらなる検討が必要であると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

発表者名 山崎 博、発表標題 潰瘍性大腸炎に対する治療標的・バイオマーカーとしての CGRP の検討 学会名 第 11 回日本消化管学会総会学術集会、発表年月日 2015 年 2 月 13 日、発表場所 京王プラザホテル / 東京

発表者名 山内 亨介、山崎 博、発表標題 MECHANISMS UNDERLYING THE EFFECTS OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN A RAT COLITIS MODEL 学会名 欧州消化器病週間 2014、発表年月日 2014 年 10 月 18 日、発表場所 Vienna / Austria

発表者名 山崎 博、発表標題 ラット潰瘍性大腸炎モデルに対する LCAP の効果とその作用メカニズム 学会名 第 103 回日本消化器病学会九州支部例会 (招待講演)、発表年月日 2014 年 07 月 5 日、発表場所 アクロス福岡 / 福岡

発表者名 山崎 博、発表標題 潰瘍性大腸炎モデルに対する CGRP の投与効果とその作用メカニズム 学会名 第 10 回日本消化管学会総会学術集会、発表年月日 2014 年 02 月 14 日、発表場所 福島ビューホテル / 福島

発表者名 山崎 博、発表標題 ラット慢性腸炎モデルでの白血球除去療法の作用機序は Calcitonin Gene-Related Peptide に依存している 学会名 JDDW 2013 (第 55 回日本消化器病学会大会、発表年月日 2013 年 10 月 10 日、発表場所 高輪プリンスホテル / 東京

発表者名 山崎 博、発表標題 動物腸炎モデルにおいて白血球除去療法の作用機序は Calcitonin Gene-Related Peptide に依存している 学会名 第 101 回日本消化器病学会九

州支部例会、発表年月日 2013 年 6 月 22 日、
発表場所 北九州国際会議場 / 北九州

発表者名 小林 哲平、山崎 博、発表標題
Action of Leukocytapheresis Depends on
Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in
Colitis Models 学会名 米国消化器病学会週
間 2013、発表年月日 2013 年 5 月 21 日、発
表場所 Orland / the United States

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 博 (Yamasaki Hiroshi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 20529565