

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460957

研究課題名(和文) シクロスポリンによるSTAT3シグナルを介した腸上皮細胞アポトーシス制御

研究課題名(英文) Cyclosporine protects from apoptosis-mediated epithelial damage through epithelial STAT3 signaling pathway

研究代表者

櫻庭 裕丈 (SAKURABA, HIROTAKE)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：90422063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DSS誘発大腸炎モデルにおけるシクロスポリンによる粘膜障害抑制効果は、腸管上皮細胞IL-22受容体の発現増強とSTAT3の活性化による粘膜障害抑制機序が関与していることが明らかとなった。腸上皮細胞株Caco2を用いた解析では、リコンビナントTGF-beta単独またはシクロスポリン単独刺激による腸上皮細胞IL-22受容体発現増強効果は認めず、両者の刺激よりIL-22受容体の発現増強は認められた。シクロスポリンによる腸上皮細胞のIL-22受容体発現増強及びSTAT3活性化を介した粘膜障害抑制効果は、TGF-betaからのシグナルと同時にシクロスポリンが加わることで誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Treatment of cyclosporine ameliorated mucosal destruction through reduction of epithelial apoptosis in DSS-induced colitis model. IL-22 receptor expression and STAT3 phosphorylation in purified intestinal epithelial cells (IECs) were up-regulated in cyclosporine but not in vehicle treated mice. Anti-TGF-beta mAb treatment diminished the protective effect of cyclosporine. In addition, anti-TGF-beta mAb treatment diminished up-regulated IL-22 receptor expression and STAT3 phosphorylation in IECs. In Caco2 cells, the treatment with both cyclosporine and recombinant TGF-beta increased IL-22 receptor expression. These results demonstrate that treatment of cyclosporine can ameliorate apoptosis-mediated epithelial damage through epithelial IL-22 receptor-STAT3 signaling pathway, which required the TGF-beta stimulation.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 IL-22受容体 TGF-beta シクロスポリン 腸上皮細胞 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効率は、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。

腸管粘膜上皮細胞のバリア機能という点で、UC患者の活動期大腸粘膜において腸上皮細胞アポトーシスの増加が報告されている(Straer J, et al, Gastroenterol. 1997)。また、腸上皮細胞におけるアポトーシスの制御におけるSTAT3シグナルの関与が報告された(Xialoling J, et al, Gut, 2010)。さらにSTAT3は炎症性腸疾患(IBD)の全ゲノム相関解析で特定された感受性候補遺伝子の1つでもあり、STAT3シグナルによる腸上皮アポトーシス制御異常が、UCの病態に密接に関与している可能性がある。

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)。さらに予備実験を行い、シクロスポリンが腸管局所のIL-22発現を増強すること、T, B細胞が欠損したSCIDマウスにおいてはその発現増強効果を認めないことを確認している。こういった解析結果をもとに今回の研究を進めた。

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腸上皮細胞アポトーシス制御を介した効果の機序を明らかにすることを目的とした。シクロスポリンによる直接的な腸上皮細胞IL-22-STAT3シグナル調節によるアポトーシス抑制効果、TGF- β を介したSTAT3シグナル調節効果とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 炎症性腸疾患の動物モデルであるマウス(C57BL/6, SCID)DSS誘発腸炎モデルにおいてシクロスポリン投与による腸管局所のIL-22、分離した腸上皮のIL-22受容体・活性化STAT3発現の誘導について解析する。抗IL-22抗体、STAT3阻害剤投与によるシクロスポリン治療効果の抑制の有無を解析した。
- (2) 抗TGF- β 抗体投与下でのシクロスポリン投与による腸管局所のIL-22、分離した腸上皮のIL-22受容体・活性化STAT3発現の誘導について解析する。SCIDマウスへのリコンビナントTGF- β 投与時の腸管局所のIL-22、分離した腸上皮のIL-22受容体・活性化STAT3発現の誘導について解析した。
- (3) *In vitro*の腸上皮細胞培養(Caco2)システムでシクロスポリン、リコンビナントTGF- β によるIL-22R発現調節の機序を解析した。

4. 研究成果

シクロスポリンによる粘膜障害抑制効果は、腸管上皮細胞 IL-22 受容体の発現増強と STAT3 の活性化による粘膜障害抑制機序が関与していることが明らかとなった。また、腸上皮細胞株 Caco2 を用いてシクロスポリンの処理による腸上皮細胞 IL-22 receptor mRNA、蛋白の発現調節について解析を行った結果、シクロスポリン単独刺激による腸上皮細胞 IL-22 受容体発現増強効果は認めず、直接効果ではない可能性が考えられた。

次に、シクロスポリンと同時にリコンビナント TGF- β を加えると IL-22 receptor mRNA および蛋白の発現増強は認められた。一方、シクロスポリン単独あるいはリコンビナント TGF- β 単独の刺激では、IL-22 receptor mRNA および蛋白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腸上皮細胞の IL-22 受容体発現増強及び STAT3 活性化を介した粘膜障害抑制効果は、TGF- β からのシグナルと同時にシクロスポリンが加わることで誘導されることが示唆された。

また、細胞内シグナルの解析では、シクロスポリン投与により p38 のリン酸化抑制を認め、一方 p38 inhibitor 投与下では IL-22 受容体の発現亢進はキャンセルされた。したがって、TGF- β およびシクロスポリン刺激での IL-22 受容体の発現亢進作用は、p38 リン酸化抑制を介していることが示唆された。

マウス腸炎モデルにおいてもシクロスポリンによる腸上皮細胞の IL-22 受容体発現増強及び STAT3 活性化を介した粘膜障害抑制効果における TGF- β からのシグナルの関与について解析を行った。抗 TGF- β 抗体投与下では、シクロスポリン投与による腸上皮細胞の IL-22 受容体発現増強・STAT3 活性化誘導の効果がキャン

セルされた。さらに、マウス腸炎モデルにおいて抗 IL-22 抗体投与により、シクロスポリンによる腸上皮細胞アポトーシス増加を介した粘膜障害抑制効果がキャンセルされた。

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6件)「すべて査読あり」

1. Daisuke Chinda, Tadashi Shimoyama, Kuniaki Miyazawa, Tetsu Arai, Shiro Hayamizu, Miyuki Yanagimachi, Toshiaki Tsukamoto, Kazuki Akitaya, Tetsuya Tatsuta, Shogo Kawaguchi, Hidezumi Kikuchi, Hiroto Hiraga, Manabu Sawaya, Hirotake Sakuraba, Tatsuya Mikami and Shinsaku Fukuda. Estimation of perioperative invasiveness of colorectal endoscopic submucosal dissection evaluated by energy metabolism. *J Clin Biochem Nutr.* 2018 May; 62(3):1-4.
2. Mikami K, Endo T, Sawada N, Igarashi G, Kimura M, Sakuraba H, Fukuda S. Inhibition of Systemic Hyaluronan Synthesis Exacerbates Murine Hepatic Carcinogenesis. *In Vivo.* 2018 Mar-Apr; 32(2):273-278.
3. Watanabe K, Matsumoto T, Hisamatsu T, Nakase H, Motoya S, Yoshimura N, Ishida T, Kato S, Nakagawa T, Esaki M, Nagahori M, Matsui T, Naito Y, Kanai T, Suzuki Y, Nojima M, Watanabe M, Hibi T; DIAMOND study group (Hirotake Sakuraba et al). Clinical and Pharmacokinetic Factors Associated With Adalimumab-Induced Mucosal Healing in Patients With Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018 Apr; 16(4):542-549.
4. Nakase H, Motoya S, Matsumoto T, Watanabe, Hisamatsu T, Yoshimura N, Ishida T, Kato S, Nakagawa T, Esaki M, Nagahori M, Matsui T, Naito Y, Kanai T, Suzuki Y, Nojima M, Watanabe M, Hibi T; DIAMOND study group (Hirotake Sakuraba et al). Significance of measurement of serum trough level and anti-drug antibody of adalimumab as personalised pharmacokinetics in patients with Crohn's disease: a subanalysis of the DIAMOND trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Nov; 46(9):873-882.
5. Miwa Satake, Hirotake Sakuraba, Hiroto Hiraga, Norihiro Hanabata, Noriko

- Hiraga, Keisuke Hasui1, Shinji Ota, Yui Akemoto, Tatsuya Mikami, Yoh Ishiguro and Shinsaku Fukuda. Capsule Endoscopy for Differentiating Early Crohn's Disease from Behçet's Disease. J Inflamm Bowel Dis & Disor 2016, 1:2
6. Sakuraba H, Ishiguro Y, Hasui K, Hiraga H, Fukuda S, Shibutani K, Takai Y. Prediction of maintained mucosal healing in patients with Crohn's disease under treatment with infliximab using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Digestion. 2014;89(1):49-54.

〔学会発表〕(計2件)

- ① 第103回日本消化器病学会総会
2017.4.20-22

IBDの腸管合併症と腸管外合併症の
マネージメントと工夫ー内科の立場か
らー

櫻庭裕丈、平賀寛人、福田眞作

第11回消化管学会 2015.2.13-15

シクロスポリンによるIL-22シグナル
調節を介した腸管上皮細胞アポトーシ
ス抑制効果

櫻庭裕丈、石黒 陽、平賀寛人、蓮井桂
介、佐竹美和、吉田淑子、中根明夫、福
田眞作

〔図書〕(計2件)

特集 内視鏡所見から全身を診る III
自己免疫疾患・膠原病・血管炎など
強皮症を疑う消化器病変 消化器内視鏡
2017;29(4):732-735

平賀寛人、三上達也、櫻庭裕丈、田中奈保子、
渡邊里奈、太田真二、佐竹美和、菊池英純、
澤谷 学、平賀典子、珍田大輔、福田眞作

成人病と生活習慣病
ここまで来た炎症性腸疾患の新展開 東京
医学者 炎症性腸疾患の腸管外病変
2014 Vol.44 No3.331-4
平賀寛人、山形和史、佐竹美和、櫻庭裕丈、
福田眞作

〔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 裕丈 (SAKURABA, Hirotake)
弘前大学大学院医学研究科・講師
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