

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460966

研究課題名(和文) Dectin-1を介した選択的IL-17F制御に基づく炎症性腸疾患の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of inflammatory bowel disease based on selective IL-17F regulation via Dectin-1.

研究代表者

伴 宏充 (Ban, Hiromitsu)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30598363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：IL-17 でDectin-1 陽性細胞からIL-17F が高発現される。また、Dectin-1 依存性に Schizophyllanという -1,3-D-gulcan を担体とし、アンチセンスDNA 塩基配列を細胞内に導入を研究してきた。これらの2つの研究をもとに、腸炎モデルマウスにおいてDectin-1 陽性細胞から高発現するIL-17F を、SPG を介したDrug delivery system を用いることによりアンチセンスDNA を細胞内導入することで抑制し、Dectin-1 陽性細胞から発現されるIL-17F の役割を解明し、炎症性腸疾患の新しい治療薬の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：IL-17 is highly expressed from Dectin-1 positive cells with IL-17 . In addition, we have studied the introduction of antisense DNA nucleotide sequences into cells using -1,3-D-gulcan, Schizophyllan as a carrier, in a Dectin-1 dependent manner. Based on these two studies, IL-17F highly expressed from Dectin-1 positive cells in intestinal inflammation model mice was suppressed by intracellular introduction of antisense DNA by using SPG-mediated Drug delivery system We will elucidate the role of IL-17F expressed from Dectin-1 positive cells and aim to develop new therapeutic agents for inflammatory bowel disease.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患 サイトカイン アンチセンスオリゴ

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患の病態に大きな作用を有しているサイトカインである Interleukin (IL)-17 には 6 個の subtype が存在し、そのなかでも IL-17A と IL-17F は炎症誘発作用と炎症抑制作用という相反する作用を持っていることが知られている。そのため、IL-17 をすべてを抑制してしまうと、炎症性腸疾患は増悪することがヒトでも動物実験でも明らかとなっている。

今回我々は、炎症誘発作用を有する IL-17F のみを抑止するため、IL-17F に特異的な antisense oligo DNA を作成し、Dectin-1 を介した drug deliveryly によってマクロファージや単球のみに IL-17F をロックダウンした実験系を in vivo および in vitro で作成し検討を行うこととした。

### 2. 研究の目的

以前の検討で、Interleukin-17 antisense-oligo DNA (AS-IL17 oligo DNA) 1.104 nmol に対しシゾフィラニン (SPG) 0.3 nmol を混合させる組み合わせが最も効率よく会合を得ることが明らかとなった。この組み合わせで会合させた SPG/AS-IL17 oligo DNA 会合溶液が腸炎モデルマウスを改善させるかどうかを検討した。

### 3. 研究の方法

2.5% デキストリン硫酸ナトリウム (DSS) で誘発させた腸炎マウスに SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液を腹腔内投与し、その体重変化と疾患活動 index、組織学的 score を検討した。

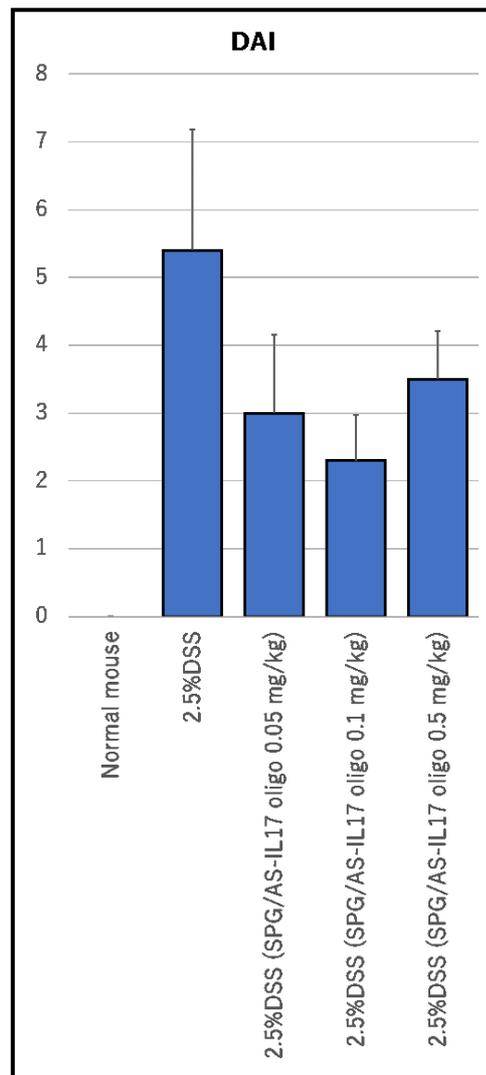
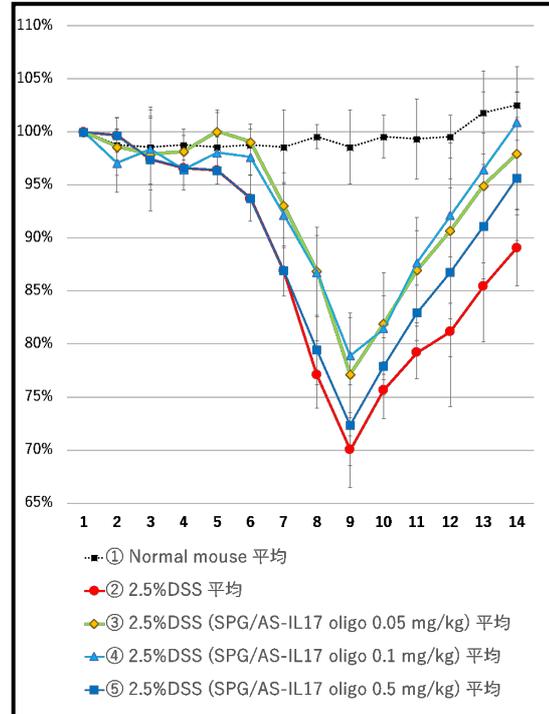
DSS を 5 日間投与したのち、0, 3, 6, 9, 12 日目に SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液を 0.05, 0.1, 0.5 mg/kg (体重) の antisense oligo DNA 量となるように生食 0.5 cc に溶解し腹腔内投与を行った。7 日目と 12 日目に組織と血清を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色、mRNA 採取、血清 TNF- $\alpha$  濃度の測定を行った。以下のように各群 n=20 ずつで検討を行った。

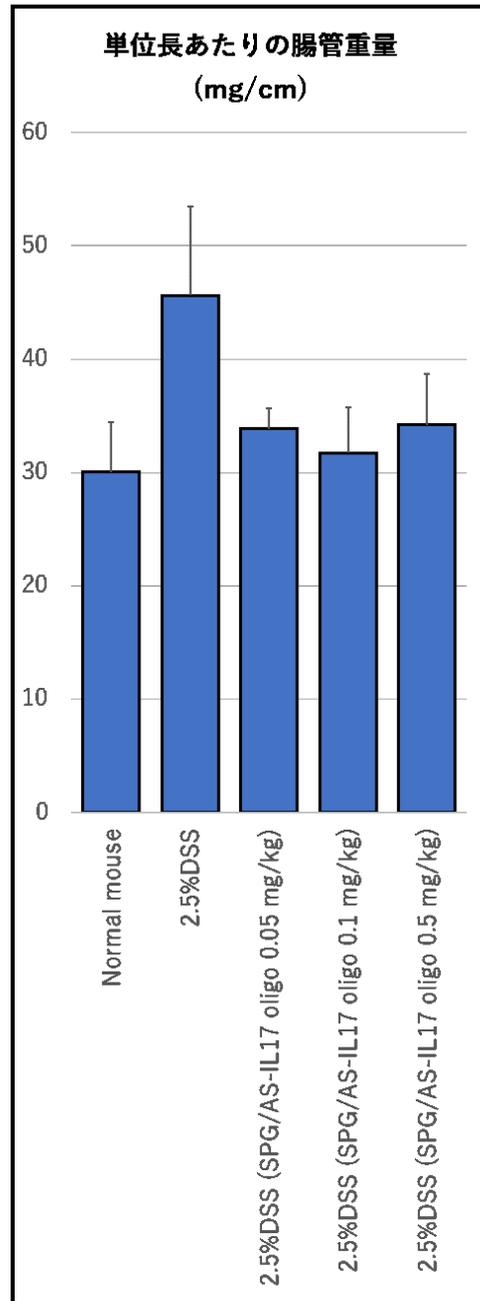
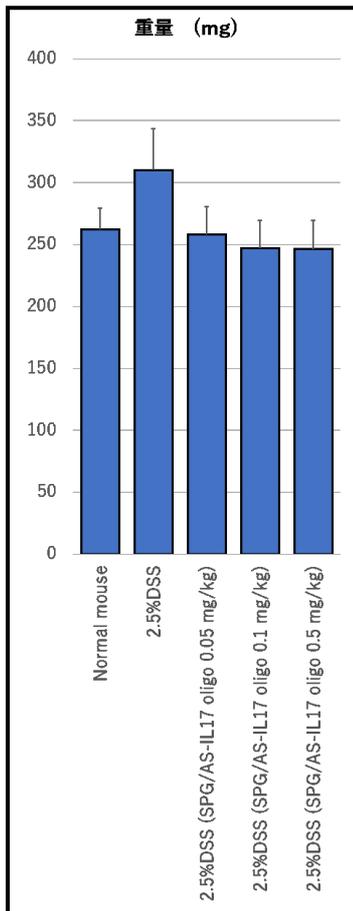
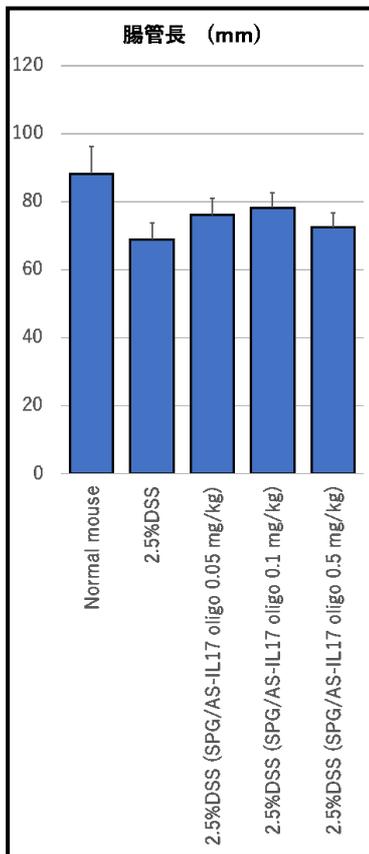
1. 正常群
2. DSS (生食投与) 群
3. DSS (SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液 0.05 mg/kgBW 投与) 群
4. DSS (SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液 0.1 mg/kgBW 投与) 群
5. DSS (SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液 0.5 mg/kgBW 投与) 群

### 4. 研究成果

結果として、4. DSS (SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液 0.1 mg/kgBW 投与) 群が体重の変化が最も改善率が高く、7 日目および 12 日目ともに組織学的スコアが低く ( $P < 0.01$ )、血清

TNF- $\alpha$  濃度も優位に低値であった ( $P < 0.05$ )。

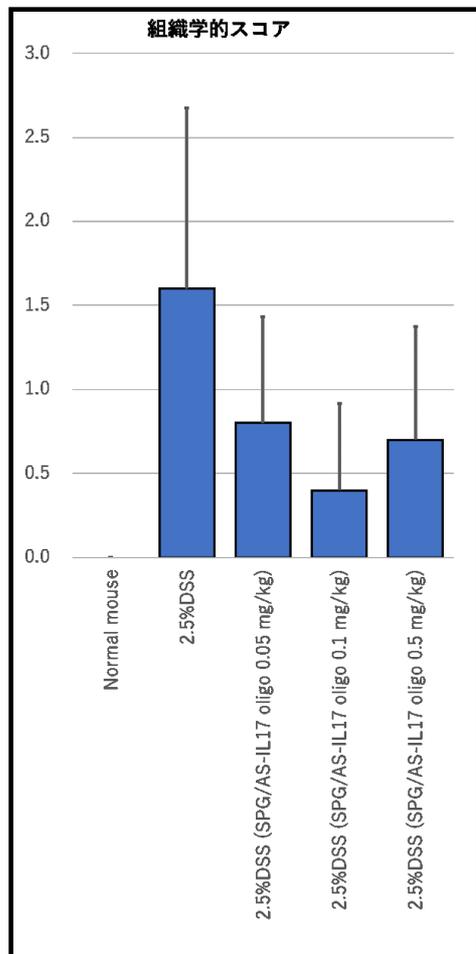




引き続き組織中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 および IL-17A、IL-17F の発現を mRNA レベルとタンパクレベルで検討した。それが組織内 antisense oligo DNA 量と相関しているかどうかを RT-qPCR 法、ウェスタン・ブロッティング法にて検討したところ、逆相関を呈していたが、3. DSS (SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液 0.05 mg/kgBW 投与)群と、5. DSS (SPG/AS-IL17 oligo 会合溶液 0.5 mg/kgBW 投与)群では認めなかった。

これらのことより、この複合体には至適濃度が存在することが示唆される。

単位長あたりの腸管重量においては、0.1mg/kgBW を投与した群が最も炎症所見が少なく、浮腫が最も軽減されていた。



組織学的スコアにおいても同様に 0.1mg/kgBW を投与した群がもっともよい結果となった。

これらのことは、SPG 投与量が増大することによって炎症が逆に惹起されることによるものであると推察される。

以上のことより、SPG をドラッグデリバリーとした、IL-17F をターゲットとしたアンチセンスオリゴによる腸管炎症抑制効果は有効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 8 件)

1) Sugimoto M, Ban H, Hira D, Kamiya T, Otsuka T, Inatomi O, Bamba S, Terada T, Andoh A. Letter: CYP3A4/5 genotype status and outcome of vonoprazan-containing *Helicobacter pylori* eradication therapy in Japan. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Apr;45(7):1009-1010. 【査読あり】

2) Sugimoto M, Sahara S, Ichikawa H, Kagami T, Ban H, Otsuka T, Andoh A, Furuta T. Four-times-daily Dosing of Rabeprazole with Sitafloxacin, High-Dose Amoxicillin, or Both for Metronidazole-Resistant Infection with *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter.* 2017 Feb;22(1). 【査読あり】

3) Sugimoto M, Ban H, Ichikawa H, Sahara S, Otsuka T, Inatomi O, Bamba S, Furuta T, Andoh A. Efficacy of the Kyoto Classification of Gastritis in Identifying Patients at High Risk for Gastric Cancer. *Intern Med.* 2017;56(6):579-586. 【査読あり】

4) Murata M, Sugimoto M, Yokota Y, Ban H, Inatomi O, Bamba S, Kushima R, Andoh A. Efficacy of additional treatment with azathioprine in a patient with prednisolone-dependent gastric sarcoidosis. *World J Gastroenterol.* 2016 Dec 21;22(47):10471-10476. 【査読あり】

5) Otsuka T, Sugimoto M, Inoue R, Ohno M, Ban H, Nishida A, Inatomi O, Takahashi S, Naito Y, Andoh A. Influence of potassium-competitive acid blocker on the gut microbiome of *Helicobacter pylori*-negative healthy individuals. *Gut.* 2016 Dec 13. 【査読あり】

6) Ban H, Bamba S, Nishida A, Inatomi O, Shioya M, Takahashi KI, Imaeda H, Murata M, Sasaki M, Tsujikawa T, Andoh A. Prognostic factors affecting early colectomy in patients with moderate to severe ulcerative colitis treated with calcineurin inhibitors. *Exp Ther Med.* 2016 Aug;12(2):829-834. 【査読あり】

7) Tsujikawa T, Bamba S, Inatomi O, Hasegawa H, Ban H, Nishida A, Imaeda H, Itoh A, Saotome T, Sasaki M, Andoh A. Factors affecting pancreatic hyperamylasemia in patients undergoing peroral single-balloon enteroscopy. *Dig Endosc.* 2015 Sep;27(6):674-8. 【査読あり】

8) Bamba S, Hirota S, Inatomi O, Ban H, Nishimura T, Shioya M, Imaeda H, Nishida A, Sasaki M, Murata S, Andoh A. Familial and multiple gastrointestinal stromal

tumors with fair response to a half-dose  
of imatinib. *Intern Med.*  
2015;54(7):759-64. 【査読あり】

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伴 宏充 (Ban, Hiromitsu)  
滋賀医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号：30598363

##### (2) 研究分担者

馬場 重樹 (Bamba, Shigeki)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40422901

##### (3) 連携研究者

該当なし

##### (4) 研究協力者

該当なし