

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460976

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における線維化機序解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of fibrosis mechanism in inflammatory bowel disease and its application to molecular targeting therapy

研究代表者

芝田 渉 (SHIBATA, Wataru)

横浜市立大学・先端医科学研究センター・准教授

研究者番号：00435819

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)：線維芽細胞の線維化における役割をNF- κ B 経路に焦点をあて検討を行った。筋線維芽細胞に特異的なNF- κ B欠損マウスを作成し、dextran sodium sulfate(DSS)腸炎モデルや腸管同種移植モデルを、またin vitroでの検討は胎児線維芽細胞を使用した。結果、腸炎モデルにおいて炎症により誘導される筋線維芽細胞の細胞数はノックアウトマウスで少なく、また移植腸管においては SMAやTGF β はノックアウトマウスで減弱していた。MEFでの検討でも炎症刺激によるTGF β や炎症性サイトカインの発現はノックアウトMEFで低下しており、NF- κ B経路が線維化形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here we investigated the role of numerous fibroblasts in the inflamed region on fibrosis, focusing on the activation of the expected NF- κ B pathway, which is particularly relevant. NF- κ B deficient mice specific for myofibroblasts considered to be involved in fibrosis were prepared, and dextran sodium sulfate (DSS) intestinal inflammation model and intestinal allograft model were examined. In vitro studies, we used fetal embryonic fibroblast cells. As a result, the number of myofibroblast cells induced by inflammation was less in knockout mice in intestinal inflammation model. SMA and TGF β were attenuated in knockout mice in transplanted intestinal tract. In the examination with MEF, expression of TGF β and inflammatory cytokine by inflammatory stimulation was decreased in knockout MEF, suggesting that the NF- κ B pathway was involved in fibrosis formation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：線維化 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

炎症性腸疾患は原因不明の慢性炎症性疾患であり、消化管に持続的な炎症と潰瘍形成をきたす。臨床的には腸管局所において抗炎症作用を有するアミノサリチル酸製剤が主に使用されるが、効果不十分の場合はコルチコステロイド剤や免疫調節剤が使用される。更にそれらの治療によっても十分な炎症抑制効果が得られない場合はいわゆる生物学的製剤である抗 TNF 製剤などが使用されている (Nature 2011)。中でもクローン病における腸管の高度狭窄は、通過障害による瘻孔や膿瘍形成の原因ともなり、内視鏡や外科手術による侵襲的治療を余儀なくされることから、その原因究明と予防は急務である。腸管狭窄においては線維芽細胞の関与が示唆されている。過去の報告で IBD 患者の線維芽細胞は炎症性サイトカイン TNF を高濃度に産生することから、IBD 特有の線維芽細胞が線維化に関与していることが示唆されている。そこで今回我々は、TNF をはじめとする炎症性サイトカインの転写因子 NF- κ B に着目し、腸炎関連潰瘍の形成・治癒過程における筋線維芽細胞の局在と、線維化における NF- κ B 経路の役割を明らかにすることを目的に本研究を提案した。

近年の網羅的遺伝子解析手法の進歩により、炎症性腸疾患の疾患感受性遺伝子が次々と報告されているが、いまだ予防や根治治療に直結する決定的な因子の同定には至っていない。Nod2 は疾患感受性遺伝子として 2001 年に報告され、炎症性腸疾患と自然免疫異常の関連がはじめて示された (Nature 2001)。Nod2 変異マウス腸炎モデルにおいても腸炎増悪が示唆されたが (Science 2005)、疾患感受性については人種差がありアジア系人種においては必ずしも疾患リスクが上昇しないことが判明した (Inflam Bowel Dis 2012)。現在までに、いわゆる Genome Wide Association Study (GWAS) 解析により、100 以上の遺伝子が疾患感受性遺伝子の候補として報告されている (Nature Genet 2010, 2011)。候補の変異遺伝子は多岐にわたっており、Nod2 に代表される腸内細菌菌体成分認識に関わる遺伝子群 (TLR5, CARD9 など) 新たな免疫制御機構として注目されている Th17 経路異常 (IL-23R, STAT3, TNFSF15 など) オートファジー制御機構の破綻 (ATG16L1, IRGM) も病態との関与が示唆されている。

我々はこれまで、炎症や抗アポトーシスに関与する NF- κ B 経路において、その活性化が慢性炎症や炎症に起因する腫瘍発生に関与していることを報告してきた。転写因子 NF- κ B は p65(RelA), RelB, p50(c-Rel), p100/p52, p105/p50 の 5 種類からなり、これらは約 300 塩基からなる共通領域 Rel homology domain (RHD) を有し、これにより

二量体の形成や DNA の転写領域への結合を可能にしている。NF- κ B は非活性化状態では I κ B と結合して細胞質内に存在している。細胞外からのサイトカイン (TNF や IL-1) ストレス (紫外線、低酸素) ウイルス・細菌感染による刺激が加わると、シグナルはまず IKK 複合体の IKK α 、IKK β をリン酸化する。リン酸化 IKK β により阻害タンパク I κ B がリン酸化されユビキチン-プロテアソーム系により分解されることにより、NF- κ B が核内移行し転写因子として種々の遺伝子発現を活性化していく。腸管においては IKK β の上皮特異的ノックアウトにより、腸炎は増悪するため、上皮においては腸炎防御的に働く一方、炎症細胞における IKK β の欠損は炎症軽減にはたらくことから、IKK β はその発現細胞により相反する作用を有している (Cell 2004 Greten)。また一方で腸管の線維化においては IKK β 経路の下流に存在する Snail, Twist, TGF β などの線維化関連分子の遺伝子発現に関わることから、線維化増悪に関与することが予想される。炎症性腸疾患患者由来の線維芽細胞には、TNF などの NF- κ B 経路下流の遺伝子発現が高いことが示されている。我々もこれまでに NF- κ B 阻害剤がマウス腸炎モデルにおいて抗炎症作用を発揮して腸炎が減弱することを報告してきた (J Immunol 2007, J Gastroenterol 2009)。

今回我々は炎症局所に多数存在する線維芽細胞の線維化における役割を、とくに関連の予想される NF- κ B 経路の活性化に焦点をあて検討を行う。

2. 研究の目的

線維芽細胞特異的 NF- κ B が腸管の炎症や線維化に関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス腸管線維化モデルでの検討；
線維化シグナルに関わると筋線維芽細胞特異的 NF- κ B 欠損マウスを作成し (図 1)、dextran sodium sulfate (DSS) 自由飲水マウス腸炎モデル、および腸管同種移植モデルを用いて腸炎と線維化の評価を病理組織学的に行った。

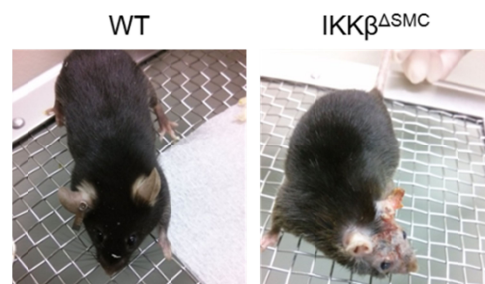


図 1. IKK β ΔSMC マウス

(2) マウス胎児線維芽細胞 (MEF) による検討；

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて、LPS, IL-1, TNF- α などの炎症刺激による炎症・線維シグナルの活性化の有無を検討した。

(3) ヒト炎症性腸疾患粘膜検体での検討；ヒト炎症性腸疾患粘膜のホルマリン固定パラフィン切片より DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより炎症・線維化関連遺伝子変異の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス腸管線維化モデルでの検討；
(1) - 1；DSS 急性腸炎モデル；

SMC-Cre- IKK F/F マウス (WT) および SMC-Cre+/IKK F/F マウス (SMC/IKK) に DSS3% 腸炎モデルを行った。結果、両群とも下痢・潰瘍は惹起したが、検討した体重、腸長 2 群間に有意差は認められなかったが、SMA 陽性細胞の減少が認められた (図 2)。

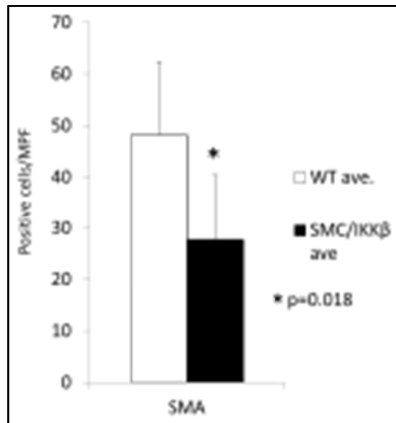
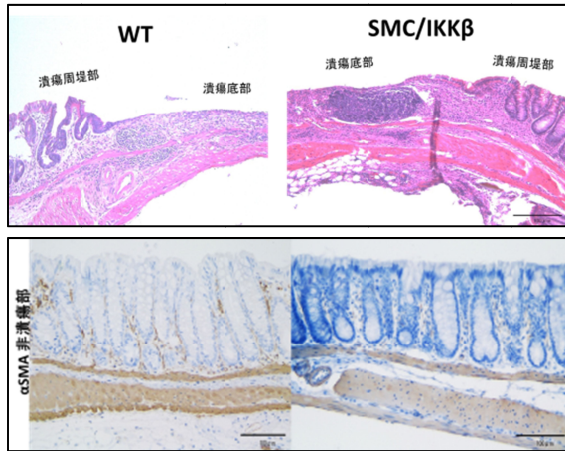


図 2 . SMC/IKK マウスの病理組織学的変化 (急性腸炎モデル)

(1) - 2；DSS 慢性腸炎モデル

2%DSS を 3 クール反復投与により腸管線維化を検討した。野生型マウスに比べて SMC/IKK マウスは体重低値の傾向を認めたが、統計学的に優位ではなく (図 3)、腸管線維化についても 2 群間に有意差は認めなかった。

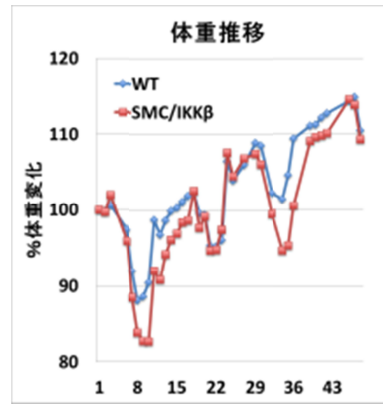


図 3 . SMC/IKK マウスの体重変化 (慢性腸炎モデル)

(1) - 3；腸管同種移植モデル；

Hausmann (IBD 2013) らの手法を参考に、切除腸管の皮下移植モデルを行い、腸管線維化の程度を病理学的に検討した。その結果、IKK^{SMC} では、WT に比べて腸上皮の残存が認められたが、線維化の程度については明らかな差異を認めなかった。IKK^{SMC} では、WT に比べて SMA 陽性細胞や CD31 陽性細胞が減弱していた (図 4)。

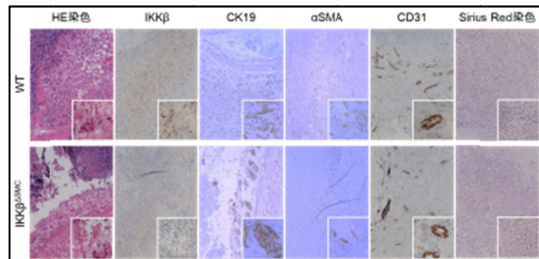


図 4 . 移植腸管における免疫組織学的検討

移植腸管においては、IKK^{SMC} では、WT に比べて SMA および TGF β 発現が低下していた (図 5)。

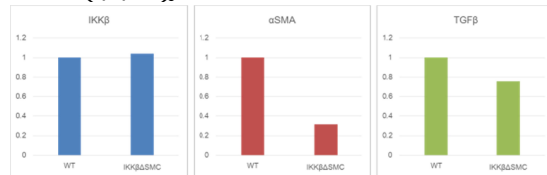


図 5 . 移植腸管における mRNA 発現変化

(2) 胎児線維芽細胞を用いた検討；

Wild Type と IKK^{-/-} の 2 種を用い、TNF、および IL-1 で刺激し炎症性サイトカインや線維関連遺伝子の発現を検討した。その結果、野生型 MEF に比較して IKK ノックアウト MEF は、SMA 発現には差異は見られなかったが、炎症刺激による IL-6 や IL-1、TGF- β の発現は少なく、線維芽細胞において IKK がこれらの遺伝子発現に関与していることが示唆された (図 6, 7)。

横浜市立大学・先端医科学研究センター
 准教授
 研究者番号：00435819

(2)研究分担者
 なし

(3)連携研究者
 なし

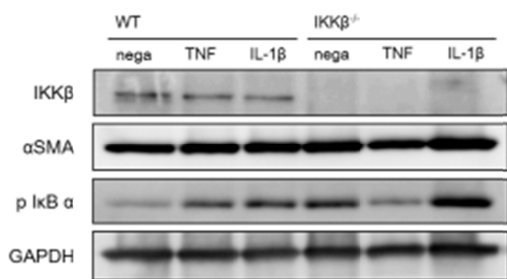


図6．胎児線維芽細胞における SMA 発現変化

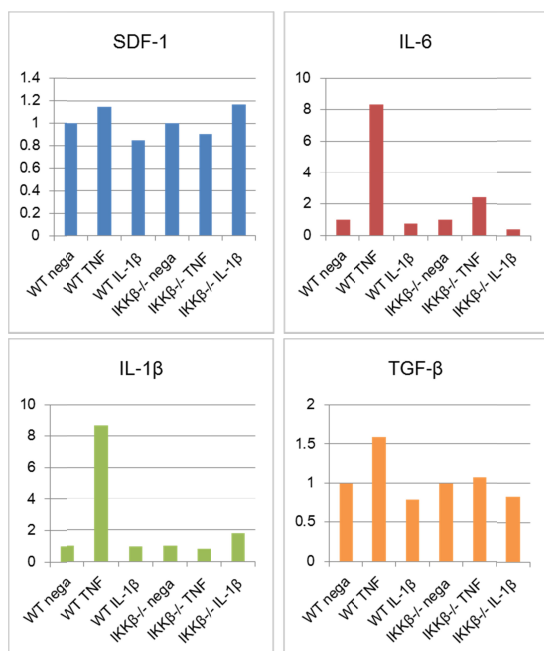


図7．胎児線維芽細胞における、mRNA 発現変化

(3)次世代シーケンサーを用いた検討；
 炎症性腸疾患患者の FFPE 固定腸管検体を用いて、遺伝子変異解析を行った(検討中)。FFPE 切片を 10μm 厚にスライスし、レーザーマイクロディセクションにより、病変部位を切離し、DNA を抽出した。IonPGM を用いて遺伝子変異を解析し線維化に与する遺伝子変異の有無を解析した(現在も解析中)。

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)
 なし

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[その他]

特記すべきことなし。

6．研究組織

(1)研究代表者

芝田 涉 (SHIBATA, Wataru)