

氏名 (生年月日) なかもと ともひろ  
中本 智大 (1995年4月4日)

学位の種類 博士(薬学)

博薬 第237号

学位授与の日付 2024年3月16日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 TRPM2 チャンネルの TNBS 誘起マウス大腸炎および大腸炎関連線維症の病態進展における役割

論文審査委員 (主査) 教授 加藤 伸一

(副査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 田中 智之

## 論文内容の要旨

### 序論 (はじめに)

潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) に代表される炎症性腸疾患 (IBD) は、主に下部消化管の粘膜に慢性炎症を生じる疾患であり、患者数はわが国を含めて世界的に年々増加の一途を辿っている。IBD の病因は未だ不明であるが、免疫制御の破綻に起因しており、特にヘルパーT細胞サブセットである Th1/Th2/Th17 バランスの異常が関与すると考えられている。

CD は UC と比較して粘膜の炎症が深部に及ぶ傾向があり、腹痛や下痢、血便などの急性期の症状に加えて、慢性期には狭窄や癒着、瘻孔の形成、がん化などの合併症を引き起こすことが知られている。これら CD の慢性期の合併症の病態には病的線維化が関与しており、CD 患者の実に 40% に線維化が観られる。近年、免疫抑制薬や生物学的製剤の登場により、IBD 治療は大きく進展したが、これらの薬剤は CD の合併症で観られる線維化に対しては無効である。

Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) は、Ca<sup>2+</sup>透過性の陽イオンチャンネルであり、活性酸素などの酸化ストレスにより活性化される。TRPM2 は腸管においては、神経や上皮細胞、単球/マクロファージなどの炎症免疫細胞に発現していることが知られている。これまでに、単球/マクロファージに発現する TRPM2 がケモカイン産生を介して大腸炎の病態進展に関与していること、また腎臓や肺における線維症の進行に関与していることなどが報告されている。

本研究では、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) の単回投与により誘起される大腸炎および反復投与により誘起される大腸炎関連線維症の病態における TRPM2 の関与について、TRPM2 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、特に Th1/Th2/Th17 応答の観点から検討を行った。

## 第1章 TNBS 誘起マウス大腸炎の病態における TRPM2 の役割

本章では、大腸炎の病態における TRPM2 の関与について検討した。大腸炎は TNBS を単回直腸内投与することにより惹起した。TNBS の単回直腸内投与は、体重減少および 3 日目において大腸の短縮を伴う重篤な大腸炎を惹起したが、それらの程度はいずれも野生型 (WT) マウスと比較して TRPM2KO マウスでは著明に抑制された。WT マウスの大腸においては、TNBS 単回投与により炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) およびケモカイン (CXCL2) に加えて、Th1 (IL-12a、IFN- $\gamma$ )、Th17 関連サイトカイン (IL-6、TGF- $\beta$ 、IL-23a、IL-17A) およびそれらの転写因子 (T-bet、Ror $\gamma$ T) の発現が顕著に増大したが、Th2 関連サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) およびその転写因子 (GATA-3) の発現は変化が認められなかった。TRPM2KO マウスでは、これらの炎症性サイトカイン/ケモカイン、Th1/Th17 関連サイトカインおよび転写因子の発現増大はいずれも有意に抑制された。次に、病態制御に関与する TRPM2 の発現部位を明らかにするため、骨髄キメラマウスを作製し同様な検討を行った。WT マウスから採取した骨髄細胞を移植した WT (WT $\rightarrow$ WT) および TRPM2KO (WT $\rightarrow$ KO) マウスと比較して、TRPM2KO マウスから採取した骨髄細胞を移植した WT (KO $\rightarrow$ WT) および TRPM2KO (KO $\rightarrow$ KO) マウスでは、TNBS 単回投与により誘起される大腸炎は全身の TRPM2KO マウスと同様に有意に抑制された。以上の結果から、マクロファージなどの骨髄由来細胞に発現する TRPM2 は、Th1/Th17 応答の制御を介して TNBS 誘起大腸炎の病態進展に関与していることが判明した。

## 第2章 TNBS 誘起マウス大腸炎関連線維症における TRPM2 の役割

本章では、慢性大腸炎に関連する線維症の病態進展における TRPM2 の関与について検討した。大腸炎関連線維症は、低用量の TNBS を反復直腸内投与することにより惹起した。TNBS の反復直腸内投与は、TNBS 最終投与 2 週間後において、大腸粘膜層から粘膜下層に膠原線維の沈着および線維化関連因子 (Col1A1、TIMP-1、ACTA2) 発現の増大を伴う線維症が観察されたが、その程度は WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。WT マウスの大腸においては、TNBS 反復投与により TNF- $\alpha$  および Th2 関連サイトカインとその転写因子、さらに線維化促進因子である TGF- $\beta$ 1 の発現が顕著に増大したが、その他の炎症性サイトカインやケモカイン、Th1/Th17 関連サイトカインおよびそれらの転写因子の発現は変化が認められなかった。TRPM2KO マウスでは、TNBS 反復投与による TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、Th1/Th17 関連サイトカインおよび転写因子の発現の増大はいずれも有意に抑制された。さらに、骨髄キメラマウスを用いて同様な検討を行ったところ、WT $\rightarrow$ WT および WT $\rightarrow$ KO マウスと比較して、KO $\rightarrow$ WT および KO $\rightarrow$ KO マウスでは、TNBS 反復投与により誘起される大腸線維症は全身の TRPM2KO マウスと同様に有意に抑制された。以上の結果より、マクロファージなどの骨髄由来細胞に発現する TRPM2 は、Th2 応答および線維化促進因子の制御を介して TNBS 誘起大腸線維症の病態進展に関与していることが判明した。

次に、マクロファージに発現する TRPM2 のサイトカインおよびケモカイン発現の制御における役割について検討した。WT および TRPM2KO マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下に 7 日間培養することでマクロファージに分化させ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置 3 時間後におけるサイトカインお

よびケモカイン発現の変化を測定した。WT マウスの骨髄由来マクロファージにおいて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置は炎症性サイトカイン/ケモカイン、Th1/Th2/Th17 関連サイトカインおよび線維化促進因子の発現を顕著に増大させたが、これらの増大はいずれも TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。また、WT マウスの骨髄由来マクロファージにおける H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置は ERK、JNK および p38 MAPK のリン酸化を亢進させたが、これらの亢進もまた TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。以上の結果から、TRPM2 はマクロファージにおいて、MAP キナーゼを介したサイトカインやケモカイン発現の制御に関与していることが判明した。

## 総括

本研究では、TRPM2 は急性期には Th1/Th17 応答の制御を介して大腸炎の病態進展に、また慢性期には Th2 応答および線維化シグナルの制御を介して大腸炎関連線維症の進展に関与していることを明らかにした。TRPM2 はマクロファージにおいて、炎症性サイトカイン/ケモカイン、ヘルパーT 細胞関連サイトカインおよび線維化促進因子の発現を制御しているものと推察される。ゆえに、TRPM2 は大腸炎のみならず慢性期の合併症である大腸炎関連線維症に対する治療標的として有用であると考えられる。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) に代表される炎症性腸疾患 (IBD) は、近年、わが国を含めて世界的に年々増加の一途を辿っている。IBD の病因は未だ不明であるが、免疫制御の破綻、特に Th1/Th2/Th17 バランスの異常が関与すると考えられている。CD は UC と比較して粘膜の炎症が深部に及ぶ傾向があり、慢性期には病的線維化に伴う狭窄や癒着、瘻孔の形成、がん化などの合併症を引き起こすことが知られている。

Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) は、神経や上皮細胞、炎症免疫細胞などに発現する Ca<sup>2+</sup>透過性の陽イオンチャネルであり、活性酸素などにより活性化される。

本研究では、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘起大腸炎および大腸炎関連線維症の病態における TRPM2 の関与について検討した。

### 《審査結果の要旨》

#### 第1章 TNBS 誘起マウス大腸炎の病態における TRPM2 の役割

TNBS 誘起急性大腸炎の病態における TRPM2 の関与について検討した。TNBS の単回直腸内投与は重篤な大腸炎を惹起したが、その程度はいずれも野生型 (WT) マウスと比較して TRPM2KO マウスでは著明に抑制された。WT マウスの大腸では、炎症性サイトカイン/ケモカインに加えて、Th1/Th17 免疫応答の活性化が観察されたが、TRPM2KO マウスでは、これらの活性化は有意に抑制された。骨髄キメラマウスを用いた検討から、これらの反応には骨

髄由来細胞に発現する TRPM2 が関与することが確認された。以上の結果より、マクロファージなどの骨髄由来細胞に発現する TRPM2 は、Th1/Th17 応答の制御を介して TNBS 誘起大腸炎の病態進展に関与していることが判明した。

## 第2章 TNBS 誘起マウス大腸炎関連線維症における TRPM2 の役割

反復 TNBS 誘起大腸炎関連線維症における TRPM2 の関与について検討した。TNBS の反復直腸内投与は大腸線維症を誘起したが、その程度は WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。WT マウスの大腸では、Th2 免疫応答の活性化および線維化促進因子 TGF- $\beta$ 1 発現の増大が観察されたが、TRPM2KO マウスでは、これらの反応は有意に抑制された。骨髄キメラマウスを用いた検討から、これらの反応には骨髄由来細胞に発現する TRPM2 が関与することが確認された。骨髄分化マクロファージにおいて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置は MAPK の活性化を伴う炎症性サイトカイン/ケモカイン、Th1/Th2/Th17 関連サイトカインおよび線維化促進因子の発現の増大を誘起したが、これらの反応はいずれも WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。以上の結果より、マクロファージなどの骨髄由来細胞に発現する TRPM2 は、Th2 応答および線維化促進因子の制御を介して TNBS 誘起大腸線維症の病態進展に関与していることが判明した。TRPM2 はマクロファージにおいて、MAP キナーゼを介してサイトカインやケモカイン発現を制御しているものと推察される。

### 《結論》

本研究では、TRPM2 は急性期には Th1/Th17 応答の制御を介して大腸炎の病態進展に、また慢性期には Th2 応答および線維化シグナルの制御を介して大腸炎関連線維症の進展に関与していることを明らかにした。TRPM2 はマクロファージにおいて、炎症性サイトカイン/ケモカイン、ヘルパーT 細胞関連サイトカインおよび線維化促進因子の発現を制御しているものと推察される。ゆえに、TRPM2 は CD における大腸炎のみならず慢性期の合併症である大腸炎関連線維症に対する治療標的として有用であると考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。