

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

2023 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】薬物治療学分野

中本 智大

本論文は、以下の報告内容を総括したものである。

1. Tomohiro Nakamoto, Kenjiro Matsumoto, Hiroyuki Yasuda, Yasuo Mori, Shinichi Kato. Transient receptor potential melastatin 2 is involved in trinitrobenzene sulfonic acid-induced acute and chronic colitis-associated fibrosis progression in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29. [第1章, 第2章]

目次

序論.....	1
第1章 TNBS 誘起マウス大腸炎の病態における TRPM2 の役割.....	8
第1節 緒言.....	8
第2節 実験材料および方法.....	10
1. 実験動物.....	10
2. 使用薬物.....	10
3. トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘起急性大腸炎の作製.....	10
4. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色下における組織学的評価.....	10
5. 各種 mRNA 発現の測定.....	11
6. 骨髄キメラマウスの作製.....	11
7. 統計学的検討.....	12
第3節 結果.....	15
1. TNBS 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎に対する TRPM2KO の影響.....	15
2. TNBS 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎におけるサイトカイン、ケモカインおよび転写因子発現に対する TRPM2KO の影響.....	19
3. 骨髄キメラマウスを用いた TNBS 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎に対する骨髄由来細胞および非骨髄由来細胞に発現する TRPM2KO の影響.....	23
第4節 考察.....	26
第5節 小括.....	28
第2章 TNBS 誘起マウス大腸炎関連線維症の病態における TRPM2 の役割.....	29
第1節 緒言.....	29
第2節 実験材料および方法.....	31
1. 実験動物.....	31

2. 使用薬物.....	31
3. TNBS 誘起マウス大腸線維症の作製.....	31
4. HE 染色下における組織学的評価.....	31
5. マッソントリクローム (MT) 染色下における組織学的評価.....	31
6. 各種 mRNA 発現の測定.....	32
7. 骨髄キメラマウスの作製.....	32
8. 骨髄分化マクロファージの作製および H ₂ O ₂ 処置によるサイトカイン発現の解析.....	32
9. 各種 MAPK 経路の活性化の解析.....	32
10. 統計学的検討.....	32
第3節 結果.....	34
1. TNBS 反復直腸内投与により誘起される大腸線維症に対する TRPM2KO の影響.....	34
2. TNBS 反復直腸内投与により誘起される大腸線維症におけるサイトカイン、ケモカインおよび転写因子発現に対する TRPM2KO の影響.....	40
3. 骨髄キメラマウスを用いた TNBS 反復直腸内投与により誘起される大腸線維症に対する骨髄由来細胞および非骨髄由来細胞に発現する TRPM2KO の影響.....	44
4. 骨髄分化マクロファージにおける H ₂ O ₂ 誘発サイトカインおよびケモカイン発現および MAPK リン酸化に対する TRPM2KO の影響.....	48
第4節 考察.....	52
第5節 小括.....	55
総括.....	56
引用文献.....	58
謝辞.....	68

略語表

ACTA2	α -smooth muscle actin
ANOVA	analysis of variance
BM	bone marrow
BMDMs	BM-derived macrophages
CC	Coiled-coils
CD	Crohn's disease
COL1A1	collagen type 1 α 1 chain
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GATA-3	GATA binding protein 3
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HE	hematoxylin-eosin
IBD	inflammatory bowel disease
IFN- γ	interferon- γ
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mRNA	messenger Ribo Nucleic Acid
MT	Masson's trichrome
NUDT9	Nudix Hydrolase 9
PBS	phosphate-buffered saline
Roryt	retinoic acid-related orphan receptor γ t
ROS	reactive oxygen species
RT-qPCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
S.E.M.	standard error of the mean
TBP	TATA binding protein
T-bet	T-box expressed in T cells
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
Th	helper T cells
TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TNBS	2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRP	transient receptor potential
TRPA	TRP ankyrin

TRPC	TRP canonical
TRPM	TRP melastatin
TRPML	TRP mucolipin
TRPP	TRP polycystin
TRPV	TRP vanilloid
TRPM2KO	TRPM2-deficient
UC	ulcerative colitis
WT	wild-type

序論

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD) は消化管粘膜に慢性炎症を引き起こす原因不明の疾患であり、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis : UC) とクローン病 (Crohn's disease : CD) がその代表例である。UC の病変部は大腸に限局しているのに対し、CD は口腔から肛門までの消化管全体に及ぶのが特徴である。IBD の患者数は、日本を含め世界的に年々増加の一途をたどっている [1]。Global Data の疫学予測によると、全世界において、UC と診断される患者数は 2022 年の約 200 万症例から 2031 年までに 210 万症例に増加するとされ、また CD と診断される症例は 2023 年の約 160 万症例から 170 万症例に増加するとされている [2]。IBD は従来から欧米に多く、日本を含むアジアでは比較的少ないとされてきた。しかし、日本における IBD 患者数も近年増加しており、厚生労働省の「特定疾患の医療受給者・登録者数」によると、2021 年度の UC 患者数は約 13 万 8079 人、CD 患者数は 4 万 8320 人と公表されており [3]、UC と CD を合わせた IBD 全体の患者数で見ると、厚生労働省の指定難病のなかで最も患者数の多い疾患となっている (Fig. 1)。したがって、日本においても IBD は希少疾患とされた時代ではなくなり、日常診療において“common disease”となりつつあるのが現状である。また日本においては、CD は UC と比較して患者数が少ないと認識されており、実際、CD 患者数は UC 患者数の 1/3 程度である。一方、2018 年度の米国における UC 患者数は約 92 万人であるのに対して CD 患者数は約 80 万人、欧州においても UC 患者数は約 69 万人に対して CD 患者数は約 59 万人となっており、欧米においては UC 患者数と CD 患者数に差はない [2]。ゆえに、今後日本においても、CD 患者数の増加が懸念されている。

IBD の急性期の典型的な症状としては、腹痛、下痢や血便、発熱などが挙げられ [4-6]、腸炎が長期間持続すると大量出血や線維化を伴う穿孔や狭窄などが引き起こされる。特に、CD では、UC と比較して病変が粘膜深部にまで達することから、線維化に伴う合併症はより深刻であり、穿孔、狭窄、癒着、さらには瘻孔の形成などが高頻度に観られる [7]。線維化は傷害の修復・治癒過程に観られる現象であり、コラーゲンなどの膠原線維の蓄積に特徴づけられる。しかし、炎症が持続あるいは繰り返されると、膠原線維の過剰な蓄積が生じ、正常組織が過剰な膠原線維に置き換わり、正常な組織機能が維持できなくなり、臓器不全や時にはがんの発生にもつながる [8, 9]。近年、IBD の治療は免疫抑制薬および抗体製剤に代表される生物学的製剤などの登場により大きく進歩した。しかし、これら最新の薬物療法であっても、CD 関連腸線維症に対しては無効であり、病的線維化に伴う穿孔、狭窄、癒着、瘻孔などの合併症に対しては、ほとんどの場合、手術を余儀なくされる [8, 10]。また、これらの合併症は、手術により切除しても、他の消化管の部位に高頻度に再燃・再発することが知られており、CD 関連線維症は今日の臨床において大きな問題となっている。

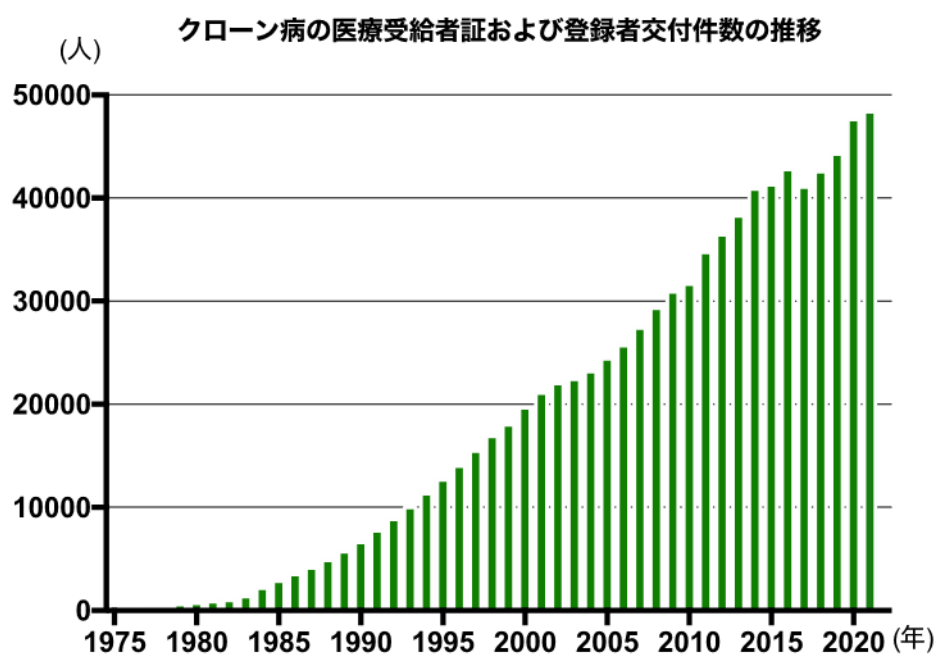
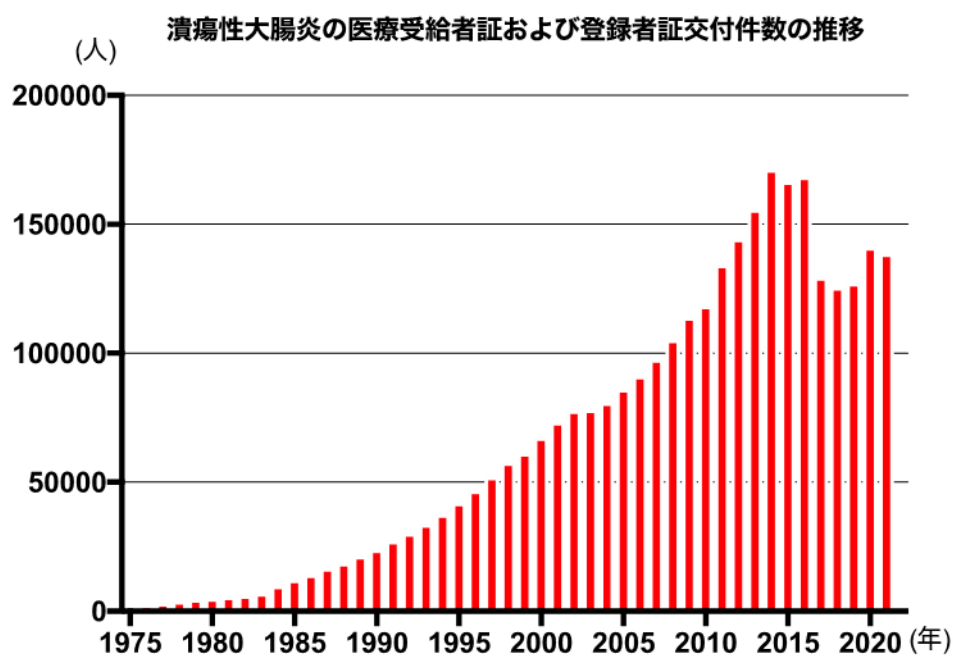


Fig. 1. 潰瘍性大腸炎、クローン病の医療受給者証および登録者証交付件数の推移

公益財団法人難病医学研究財団運営（厚生労働省補助事業）の難病情報ホームページ、
 特定医療費（指定難病）受給者証保持数から作表

IBD の病因は未だ不明であるが、一般的には遺伝的および環境的要因、自然免疫および獲得免疫の異常、さらには上皮性腸バリア機能障害に起因するものと考えられている [1, 11]。なかでも、CD4 陽性ヘルパーT (Th) 細胞サブセットである Th1/Th2/Th17 バランスの異常が IBD の病態に深く関わっているとされている [12-17]。CD は、インターフェロン (IFN)- γ やインターロイキン (IL)-12 などの Th1 関連サイトカイン、さらには腫瘍壊死因子 (TNF)- α などの産生増加が顕著に観られることから、Th1 応答優位な疾患であるとされている [18]。一方、UC では、Th1 応答に加えて、IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 関連サイトカインの産生増加も認められることから、Th2 応答も関与していることが報告されている [19,20]。さらに、IL-17 産生に関連する Th17 免疫応答は、CD および UC の両者の病態に関与していることが明らかになっている [21, 22]。Th17 細胞は、IL-17 を高レベルで産生し [23]、炎症性サイトカインやケモカイン産生を介して好中球やマクロファージを炎症組織に動員することにより、炎症反応を増強することで宿主防御の機能を担っているが、その反面、種々の炎症性疾患の病態に関与しているものと考えられている [24,25]。実際、CD 患者では Th17 細胞が異常活性化していること [26]、患者の病変部ならびに非病変部でも正常粘膜と比較して Th17 細胞および Th1 細胞の分化誘導能が促進していることが明らかとなっている [27]。

マクロファージは、消化管粘膜に観察される白血球の 1 つであり、自然免疫を司る重要な細胞で、消化管粘膜の恒常性の維持においても不可欠である [28]。IBD、特に CD の病態にマクロファージが重要な役割を果たしていることは数多く報告されている [29-31]。急性期において、マクロファージは Th1 および Th17 免疫応答を促進させることで CD の病態を進展させる [32-43]。一方、慢性期においては、マクロファージは組織修復、リモデリングおよび Th2 免疫応答を介する線維組織形成因子の産生を促進させることで、CD の症状を軽減させると共に、傷害の修復治癒に関与するものと考えられている [35-37]。

Transient receptor potential (TRP) チャネルは、外界から受ける光、化学物質、機械刺激、熱、浸透圧変化などの様々な刺激を感知する多刺激感受性イオンチャネルファミリーである。1989 年にショウジョウバエの光受容応答変異株の原因遺伝子として TRP 遺伝子が同定されて以降 [38]、TRP チャネルは刺激の受容そのものとして機能するものや刺激受容後の細胞内情報伝達の過程に関与するものなど、様々な種類が存在することが明らかになってきた。TRP チャネルは酵母から哺乳類まで幅広く真核生物に存在するカチオンイオンチャネルであり、ヒトにおいては TRPC (canonical)、TRPV (vanilloid)、TPPM (melastain)、TRPA (ankyrin)、TRPP (polycystin) および TRPML (mucolipin) の 6 つのサブファミリーから構成されている (Fig. 2)。これまでに、これらのサブファミリーに属する全 27 種類の TRP チャネルが同定されており [39, 40]、全身のほとんどの細胞に発現し、様々な生理機能の調節や疾患の病態の制御に関与することが知られている。

TRP Melastain 2 (TRPM2) は、悪性黒色腫細胞の悪性度に反比例する TRPM1 と共に見出された TRPM サブファミリーの一つである [41]。TRPM サブファミリーは発現部位や機能が多種多様であることが知られており、活性酸素や ATP が結合することで活性化され、チャネルが開くとされている。これまでに、TRPM1 や TRPM8 は腫瘍の悪性度に関連して発現が変化すること [42, 43]、TRPM3 は神経ステロイドなどにより活性化されること [44, 45]、TRPM4 や TRPM5 は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関連していること [46-48]、TRPM2、TRPM4、TRPM5 および TRPM8 は温度変化などにより活性化すること

[49-52] が報告されている。構造的な特徴として、TRPM ファミリーは N 末端に約 700 アミノ酸の TRPM ファミリーホモロジー領域とコイルドコイル (CC) ドメイン、また C 末端に TRP-ボックス、CC ドメインを有している。TRPM ファミリーホモロジー領域の役割については不明であるが、C 末端における CC ドメインはサブユニットの集積やチャネルの局在に関与することが報告されている [53]。さらに TRPM2、TRPM6 および TRPM7 は C 末端に酵素として機能するアミノ酸配列を有しており、特に TRPM2 は C 末端に pyrophosphatase 作用を有する Nudix hydrolase 9 モチーフ (NUDT9 motif) と呼ばれるアミノ酸配列が存在している [54] (Fig. 3)。

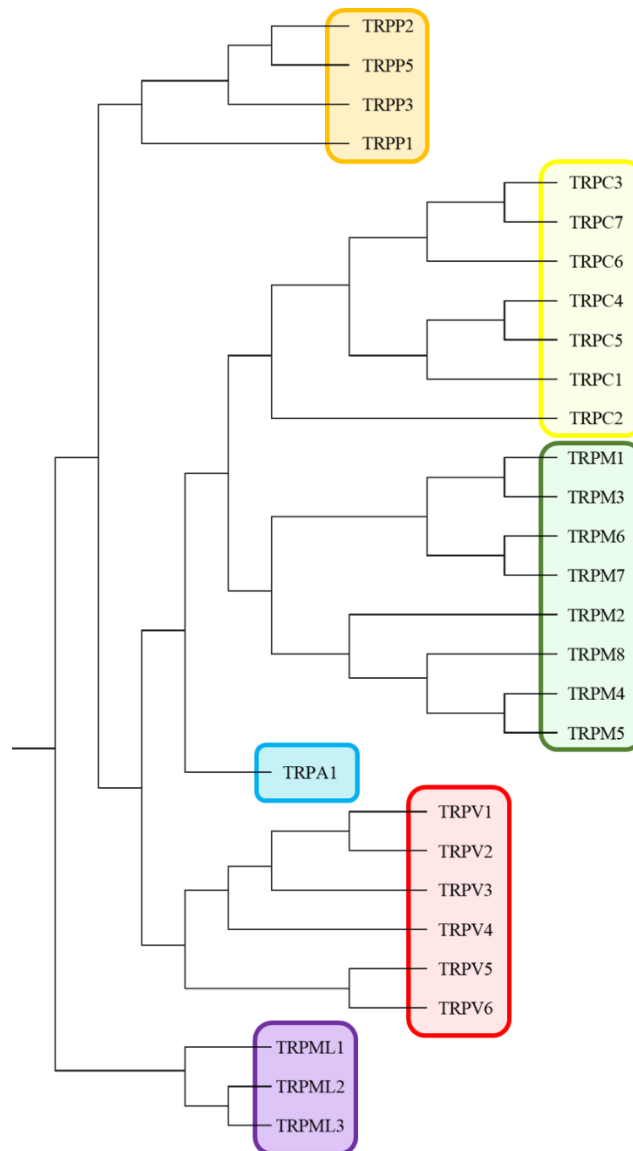


Fig. 2. Evolutional tree of TRP channels

Matsuura H, Sokabe T, Kohno K, Tominaga M, Kadowaki T. Evolutionary conservation and changes in insect TRP channels. *BMC Evol Biol.* **2009**, 9, 228. を参考に作図

過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種は、TRPM2 の Nudix モチーフを直接的あるいは ADP リボースの産生を介して間接的に活性化する。また、過酸化水素はミトコンドリアおよび核内における酸化ストレスにより Adipose differentiation-related protein (ADRP) 産生・遊離を促進し、この ADPR もまた TRPM2 の NUDT9 motif に結合することで TRPM2 が活性化することが報告されている [55]。Nudix モチーフの活性化は TRPM2 を開口し、細胞外から細胞内に Ca^{2+} を流入させる [56, 57] (Fig. 4)。ミトコンドリアでの ADPR 産生・遊離機序の詳細は不明であるが、核内では DNA 損傷に起因し、poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)/poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) 経路が関与すると考えられている。このように TRP ファミリーの中でも TRPM2 は活性酸素などの酸化ストレスによって活性化される性質を有していることが明らかになっているチャンネルである。ゆえに、活性酸素は炎症を引き起こす要因の1つであると考えられているため、活性酸素に活性化される TRPM2 は炎症免疫応答の制御に関与している可能性が推察される。

TRPM2 の発現は、腸管においては、神経細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、さらには T 細胞や単球/マクロファージなどの炎症・免疫細胞に認められている [58-62]。以前の報告において、TRPM2 を発現する単球/マクロファージが、炎症部位で産生される H_2O_2 などの酸化ストレスにより C-X-C モチーフリガンド 2 (CXCL2) などの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が示されている [63]。しかし、IBD の病態に深く関与する Th1/Th17 免疫応答における TRPM2 の関与については不明である。一方、TRPM2 は腎臓、肺、血管などにおける線維症の進行に関与していることが報告されている [64-66]。しかし、CD 患者で高頻度に観られる病的線維化の病態における TRPM2 の関与については不明である。慢性期における修復・治癒過程、さらには線維化の進行には主に Th2 免疫応答が関与していることが知られている [35, 36]。したがって、Th1/Th17 および Th2 免疫応答の制御における TRPM2 の役割を明らかにすることは、CD における急性期の腸炎に加えて、慢性期の病的線維化の病態解明につながる可能性が考えられる。

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘起大腸炎は、CD の病態モデルとして繁用されており、その病態には Th1/Th17 免疫応答が関与することが知られている [67]。急性大腸炎の惹起には、TNBS を単回直腸内投与する病態モデルが繁用されている [68]。一方、急性大腸炎惹起よりも低用量の TNBS を反復直腸内投与した場合、高度な病的線維化を引き起こし、これは CD 関連大腸線維症の病態モデルとして知られている [69]。

本研究では、TNBS 単回投与により誘起される急性大腸炎および TNBS 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、特に Th1/Th2/Th17 免疫応答との関連を中心に、TRPM2 遺伝子欠損 (TRPM2KO) マウスを用いて検討した。

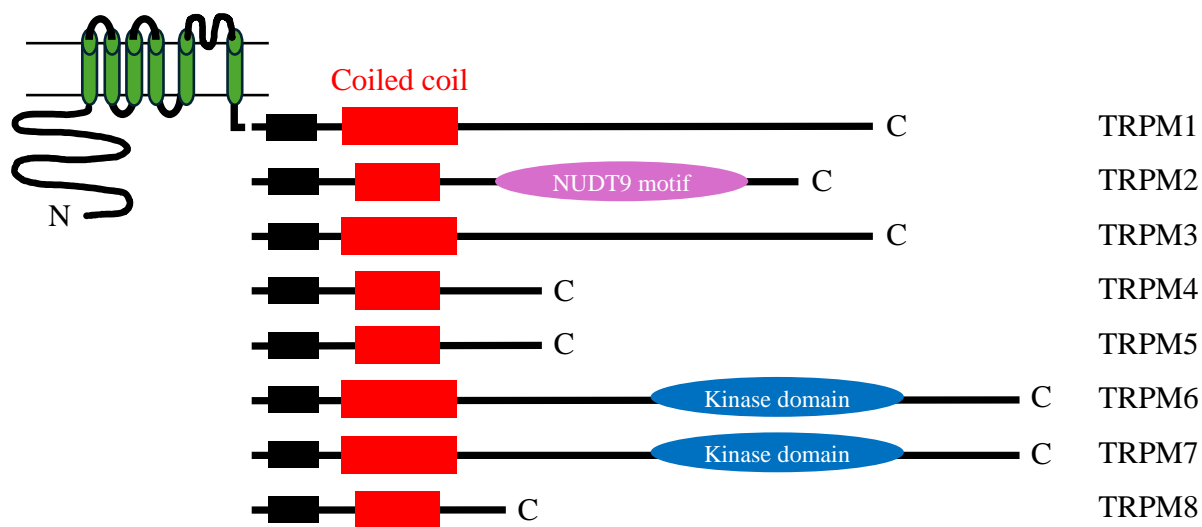


Fig. 3. Structure of TRPM subfamily

Fujiwara Y, Minor DL Jr. X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J Mol Biol.* **2008**, 383(4), 854-70. を参考に作図

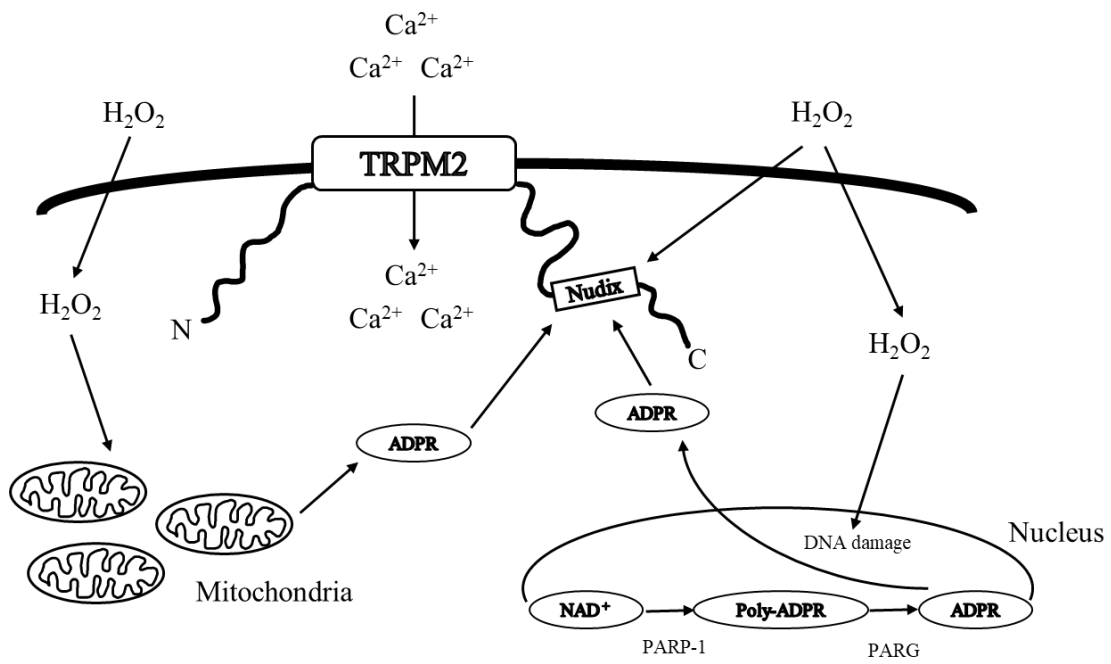


Fig. 4. Activation of TRPM2 by H₂O₂

Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch.* **2005**, 451(1), 212-9. を参考に作図

第1章

TNBS 誘起マウス大腸炎の病態における TRPM2 の役割

第1節 諸言

IBD の正確な病因は不明であるが、CD4 陽性 T 細胞における Th1/Th2/Th17 バランスの異常が深く関与しているものと考えられている [1, 11-17]。Th1 細胞への分化は、マクロファージや樹状細胞から産生される IL-12 により促進され [70]、Th1 細胞は IFN- γ や IL-2 などの Th1 サイトカインを産生し、マクロファージや CD8 陽性 T 細胞の活性化を引き起こす [32, 33]。一方、Th2 細胞への分化は、マクロファージや樹状細胞から産生される IL-4 により促進され [19, 20]、Th2 細胞は IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカインを産生し、抗体産生の促進や好酸球の活性化などを引き起こす [71-73]。また、Th2 サイトカインは Th1 に関連する炎症応答に対して抑制的に機能するとともに、傷害組織の修復・治癒、組織のリモデリングに関与していることが知られている [74]。

近年、ヘルパー T 細胞の新たなサブセットが複数同定された。なかでも IL-17 を産生する Th17 細胞は、マクロファージや樹状細胞から産生される IL-6、TGF- β 1 および IL-23 などにより分化誘導あるいは維持され、CXCL2 などのケモカインの誘導を促進することで、種々の炎症性疾患の病態に関与することが報告されている [19-22]。

CD の病態においては、Th1 および Th17 免疫応答が関与しているものと考えられている [27]。CD 患者の腸管局所では、IFN- γ などを放出する Th1 細胞が集積している [18]。これら Th1 細胞が産生する IFN- γ はマクロファージからのサイトカインの産生を促進し、一方マクロファージは Th1 細胞を刺激することで慢性的に炎症を持続させる [75]。IL-17 を産生する Th17 細胞は、ケモカインの産生を介して好中球やマクロファージなどの炎症性細胞を炎症局所に動員することにより、炎症反応をさらに増強しているものと考えられている [23, 24, 26]。実際、CD の病態にマクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかになっている [19-31]。

TRPM2 は腸管においては、神経細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、さらには T 細胞や単球/マクロファージなどに発現していることが報告されている [58-62]。以前の報告では、単球/マクロファージに発現する TRPM2 が UC の病態モデルとして知られているデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起マウス大腸炎の病態に関与していることが示されている [63]。TRPM2 は炎症部位で産生される活性酸素により活性化され、CXCL2 などのケモカイン産生を増加させることで、大腸炎の病態進展に寄与しているものと推察されている。しかし、TRPM2 の CD の病態やヘルパー T 細胞サブセットとの関連については不明である。また、単球/マクロファージ以外に発現する TRPM2 の大腸炎の病態への関与についても、これまでのところ否定できてはいない。

本章では、CD の病態モデルとして繁用されている TNBS の単回投与により誘起される急性大腸炎の病態における TRPM2 の関与について、TRPM2KO マウスを用いて、特に Th1/Th2/Th17 免疫応答の観点から検討を行った。さらに、単球/マクロファージなどの骨髄由来細胞あるいは神経細胞、上皮細

胞あるいは血管内皮細胞などの非骨髄由来細胞のいずれに発現する TRPM2 が大腸炎の病態に関与しているかについて、TRPM2KO マウスを用いた骨髄キメラマウスを作製し検討した。

第2節 実験材料および方法

1. 実験動物

実験には雄性 TRPM2 遺伝子欠損 (KO、京都大学より供与) マウスおよび野生型 (WT) マウス (C57BL/6、日本エスエルシー、静岡) を使用した。TRPM2KO マウスは、雌雄ホモ TRPM2KO マウスの交配により得た。動物は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ および 12 時間の明暗サイクル、湿度約 55% となる環境で飼育し、固形飼料水道水を自由飲水させた。TRPM2KO および WT マウスは少なくとも 3 週間以上同一環境下に飼育した後、無作為に群分けを行い、実験に用いた。本研究における動物実験はすべて京都薬科大学動物実験委員会に申請し、承認を得た上で「京都薬科大学動物実験実施規程」に準じて実施した (許可番号: PETH19-007 および PETH19-008)。また、動物実験は ARRIVE ガイドライン [76] に則って行った。

2. 使用薬物

2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム二水和物 (TNBS) (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) は、30%エタノール水溶液に 34 mg/mL の濃度で調整した。三種混合麻酔薬は、塩酸メドミジン (ドミール[®]、日本全薬工業、福島) 1.875 mL 、ミタゾラム (ドルミカム注射液 $10\text{mg}^{\text{®}}$ 、丸石製薬、大阪) 2 mL および酒石酸ベトルファール (ベトルファール $5\text{mg}^{\text{®}}$ 、Meiji Seika ファルマ、東京) 2.5 mL を生理食塩水で 25 mL に調整した (それぞれの最終濃度は、 0.075 mg/mL 、 0.4 mg/mL および 0.5 mg/mL)。

3. トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘起急性大腸炎の作製

TNBS 誘起急性大腸炎の作製は既報の方法を一部改変して行った [68]。24 時間絶食した 10 週齢の雄性 WT および TRPM2KO マウスに三種混合麻酔薬 (マウス体重 10 g あたり 0.1 mL) を腹腔内投与することで全身麻酔を行った。TNBS の 30%エタノール水溶液 $50 \mu\text{L}$ (1.7 mg/マウス) を DISPOSAL 経ロズンデ (フチガミ器械、京都) を用いて、マウスの肛門から 4 cm の直腸内に単回投与した。対照群 (Control 群) には 30%エタノール生理食塩水 $50 \mu\text{L}$ を同様に直腸内に投与した。TNBS および 30%エタノール生理食塩水投与後経日的に体重を測定した。投与 3 日後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、結腸 (肛門から盲腸) を摘出し、結腸の長さおよび損傷面積を測定した。損傷面積の測定は ImageJ v.1.53 (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。さらに、大腸組織は組織学的評価および各種 mRNA 発現の測定に用いた。

4. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色下における組織学的評価

摘出した遠位結腸を 10% 中性ホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋し、厚さ $4 \mu\text{m}$ の薄切組織切片を作製した。組織切片は脱パラフィンした後、ヘマトキシリン (Merck, Darmstadt, Germany) およびエオジン (富士フィルム和光純薬、大阪) で染色した。透徹処置後、顕微鏡下 (BZ-X800、キーエンス、大阪、日本) において組織学的評価を既報に準じて行った [77]。すなわち、炎症細胞の浸潤、

陰窩損傷、上皮組織の浸食および潰瘍形成の 4 つのパラメーターをそれぞれ評価し、それらの合計を組織学的スコア (0 - 14) とした。評価基準とスコアに関しては Table 1 に示す。

5. 各種 mRNA 発現の測定

大腸における各種サイトカイン、ケモカインおよび転写因子の mRNA 発現は定量 RT-PCR (RT-qPCR) により測定した。RT-qPCR は既報に準じて行った [78]。摘出した大腸組織は PBS で洗浄した後、測定まで RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) 中に 4°C で保存した。全 RNA の抽出は Sepasol RNA I super G (ナカライテスク、京都) を用いて定法に従って行った。すなわち、遠位結腸に Sepasol RNA I super G を加え、テフロンガラスホモジナイザーにより均質化した。Sepasol RNA I super G の 1/5 容量のクロロホルムを添加し、攪拌後、4 °C、12,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上層 (水相) を予め 500 μ L の 2-プロパノールを入れたチューブに静かに重層し、室温で 10 分間静置した後、4 °C、12,000 rpm で 10 分間遠心分離することで全 RNA の沈殿物を得た。上清を除去し、75% エタノール水溶液 1 mL で沈殿物を洗浄した後、4 °C、12,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、風乾した後、Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水 (ナカライテスク) に溶解した。逆転写反応は Prime Script TM RT Master Mix (タカラバイオ、滋賀) を用いて行った。

TRPM2 以外の各種 mRNA 発現は、TB Green Premix ExTaq II (タカラバイオ、滋賀) を用いたインターカレート法により測定した。PCR 反応は、Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて、95°C 5 秒間、60°C 30 秒間を 40 サイクル行い、各種遺伝子の PCR の結果から検量線を作成し、発現量を算出した。各種 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子として TATA-binding protein (TBP) mRNA 発現量に対する比として表示した。本章で用いた各種遺伝子に対するプライマーの配列は Table 2 に示した。

TRPM2 mRNA 発現は、TaqMan Probe Assay RT-qPCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いたプローブ法により測定した。PCR 反応は、ABI 7500 System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により、TRPM2 (Mm01177249_g1) および TBP (Mm01277042_m1) の遺伝子特異的 TaqMan Primer Probe セットを用いて、95°C 15 秒間、60°C 60 秒間を 40 サイクル行った。TRPM2 mRNA 発現量は、 $\Delta\Delta C_t$ 法により、ハウスキーピング遺伝子として TBP mRNA 発現量により標準化し、Control 群の mRNA 発現量に対する比として表示した。

6. 骨髄キメラマウスの作製

骨髄キメラマウスの作製は既報に準じて行った [79]。すなわち、WT および TRPM2KO マウス (10 週齢) のドナーマウス (10 週齢) の大腿骨および脛骨を摘出し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) を骨髓腔に注入することにより骨髓細胞を採取した。RBC lysis 緩衝液 (155 mmol/L NH_4Cl 、10 mmol/L KHCO_3 、0.1 mmol/L EDAT) で処理した後、70 μ m セルストレイナーで濾過し、 5×10^7 cells/mL に調整した。WT マウスおよび TRPM2KO マウス (4 週齢) のレシピエントマウスは、X 線照射装置 (MultiRad 160 X、RPS Service, West Byfleet, UK) を用いて致死線量の X 線 (9.5 Gy) を照射した後、ドナーマウスから採取した骨髓細胞溶液 100 μ L/マウス (5×10^6 cells/マウス) を尾静脈内投与した (Fig. 5)。骨髓移植 4 週間後に TNBS 誘起大腸炎モデルを作製し検討を行った。なお、本法における骨髄キメラマウスにつ

いては、そのほとんどがレシピエントマウスの骨髄に置換されていることを EGFP マウスの骨髄を移植した検討で確認している [80]。

7. 統計学的検討

データは平均値±標準誤差 (SEM) として表示した。統計解析は GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。体重、大腸の長さ、損傷面積および各種 mRNA 発現に対する統計学的有意性は、一元配置あるいは二元配置の分散分析により標本の平均を比較し、Holm-Sidak 多重比較検定を用いて解析した。一方、組織学的評価に対する統計学有意性は、Kruskal-Wallis 検定により標本の平均を比較し、Dunn の多重比較検定を用いて解析した。いずれの統計学的有意性も、 $P < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

Table 1.	
Criteria in histological evaluation with HE staining	
score	Inflammatory cell infiltration
0	rare inflammatory cells in the lamina propria
1	increased numbers of granulocytes in the lamina propria
2	confluence of inflammatory cells extending into the submucosa
3	transmural extension of the inflammatory infiltrate
	Crypt damage
0	intact crypts
1	loss of the basal one third
2	loss of the basal two third
3	entire crypt loss
	A change of epithelial surface
0	intact epithelial surface
4	erosion
5	confluent erosion
	Ulceration
0	an absence of ulcer
1	1 or 2 foci of ulcerations
2	3 or 4 foci of ulcerations
3	confluent or extensive ulceration

Table 2.**Primer used for detection of mouse mRNA transcripts in this study.**

Target	Length (bp)		Sequence	Accession Number
TBP (<i>tbp</i>)	Fw	25	5'-CATTCTCAAACCTCTGACCACTGCAC-3'	NM_013684
	Rv	25	5'-CAGCCAAGATTCACGGTAGATACAA-3'	
TNF- α (<i>tnfr1</i>)	Fw	23	5'-GCCTCTTCTCATTCCCTGCTTGTG-3'	NM_001278601.1
	Rv	21	5'-TGATGAGAGGGAGGCCATTTG-3'	
IL-1 β (<i>il1b</i>)	Fw	22	5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3'	NM_008361.4
	Rv	23	5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'	
CXCL2 (<i>cxcl2</i>)	Fw	23	5'-GCCAAGGGTTGACTTCAAGAACA-3'	NM_009140.2
	Rv	21	5'-AGGCTCCTCCTTCCAGGTCA-3'	
IL-12a (<i>il12a</i>)	Fw	22	5'-TGTCTTAGCCAGTCCCGAAACC-3'	NM_008351.3
	Rv	24	5'-TCTTCATGATCGATGTCTTCAGCAG-3'	
IFN- γ (<i>ifng</i>)	Fw	21	5'-GTTGCTGATGGCCTGATTGTC-3'	NM_008337.4
	Rv	22	5'-CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA-3'	
IL-6 (<i>il6</i>)	Fw	23	5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'	NM_031168.2
	Rv	25	5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATCA-3'	
TGF- β 1 (<i>tgfb1</i>)	Fw	20	5'-TACGGCAGTGGCTGAACCAA-3'	NM_011577.2
	Rv	21	5'-CGGTTTCATGTCATGGATGGTG-3'	
IL-17a (<i>il17a</i>)	Fw	21	5'-GAGGCCCTCAGACTACCTCAA-3'	NM_010552.3
	Rv	21	5'-TCATGTGGTGGTCCAGCTTTC-3'	
IL-23a (<i>il23a</i>)	Fw	27	5'-AGCGGGACATATGAATCTACTAAGAGA-3'	NM_031252.2
	Rv	25	5'-GTCCTAGTAGGGAGGTGTGAAGTTG-3'	
IL-4 (<i>il4</i>)	Fw	21	5'-ACGGAGATGGATGTGCCAAAC-3'	NM_021283.2
	Rv	22	5'-AGCACCTTGAAGCCCTACAGA-3'	
IL-5 (<i>il5</i>)	Fw	25	5'-TGAGGCTTCCTGTCCCTACTCATAA-3'	NM_010558.1
	Rv	25	5'-TTGGAATAGCATTTCACAGTACCC-3'	
IL-13 (<i>il13</i>)	Fw	19	5'-TGTGTCTCTCCCTCTGACC-3'	NM_008355.3
	Rv	20	5'-CACACTCCATACCATGCTGC-3'	
T-bet (<i>tbx21</i>)	Fw	22	5'-GTTCAACCAGCACCAGACAGAG-3'	NM_019507.2
	Rv	20	5'-TGGTCCACCAAGACCACATC-3'	
RoryT (<i>rorc</i>)	Fw	21	5'-CACAGAGACACCACGGACAT-3'	NM_011281.3
	Rv	21	5'-CGTGCAGGAGTAGGCCACATT-3'	
GATA-3 (<i>gata3</i>)	Fw	21	5'-GGATGTAAGTCGAGGCCCAAG-3'	NM_001355110.1
	Rv	22	5'-ATTGCAAAGGTAGTGCCCGGTA-3'	

Fw, forward; Rv, reverse.

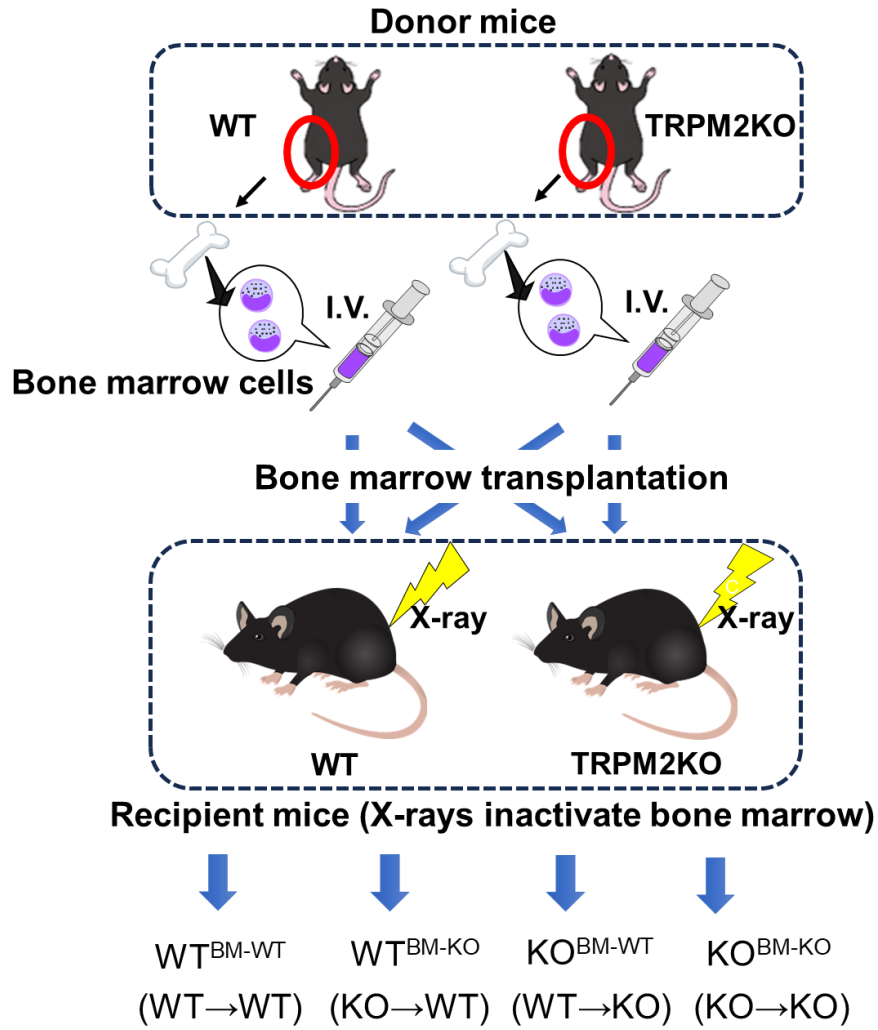


Fig. 5. Generation of TRPM2-bone marrow chimeric mice

Bone marrow cells obtained from WT or TRPM2KO mice (donor) were transplanted into WT or TRPM2KO mice (recipient) irradiated with lethal dose of X-ray, resulting in four types of bone marrow chimeric mice.

第3節 結果

1. TNBS 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎に対する TRPM2KO の影響

急性大腸炎の病態における TRPM2 の役割を明らかにするため、TNBS (1.7 mg/マウス in 30% エタノール溶液) 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎の病態を WT および TRPM2KO マウスで比較検討した (Fig. 6A)。TNBS 投与 1 日目には WT および TRPM2KO マウスでは同程度の体重減少が観察された (Fig. 6B)。WT マウスにおいては、TNBS 投与 3 日目までさらなる体重減少が認められたのに対し、TRPM2KO マウスでは 2 日目以降体重減少は徐々に回復した。TNBS 投与 3 日目における体重減少は、WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に回復した ($P < 0.0001$)。

TNBS 投与 3 日目の大腸においては、大腸の短縮、重度の浮腫、広範なびらんおよび潰瘍の発生に特徴づけられる肉眼的損傷が観察されたが (Fig. 6C–E)、それらの程度はいずれも WT マウス (大腸の長 : 7.31 ± 0.209 cm および損傷面積 : 91.3 ± 16.5 mm²) と比較して TRPM2KO マウス (大腸の長 : 8.79 ± 0.223 cm および損傷面積 : 16.2 ± 5.16 mm²) では有意に抑制された (大腸の短縮: $P = 0.0053$ および損傷面積: $P < 0.0001$)。

組織学的評価においても同様に、TNBS 投与 3 日目の大腸では、高度な炎症性細胞の浸潤、上皮の脱落、浮腫、杯細胞および陰窩の喪失が観察され (Fig. 7A)、組織学的傷害スコアは肉眼的に損傷を認めた箇所に関係なく結腸において顕著に増加したが (Fig. 7B)、これらの変化はいずれも WT マウス (7.79 ± 0.578) と比較して TRPM2KO マウス (3.28 ± 0.375) では有意に抑制された ($P < 0.0001$)。

大腸における TRPM2 mRNA 発現を RT-qPCR により測定した。WT マウスにおいては、Control 群と比較して、TNBS を単回投与することにより TRPM2 mRNA 発現は有意に増加した ($P < 0.0001$) (Fig. 8)。一方、TRPM2KO マウスでは、Control 群および TNBS 処置群いずれにおいても TRPM2 mRNA 発現は検出されなかった。

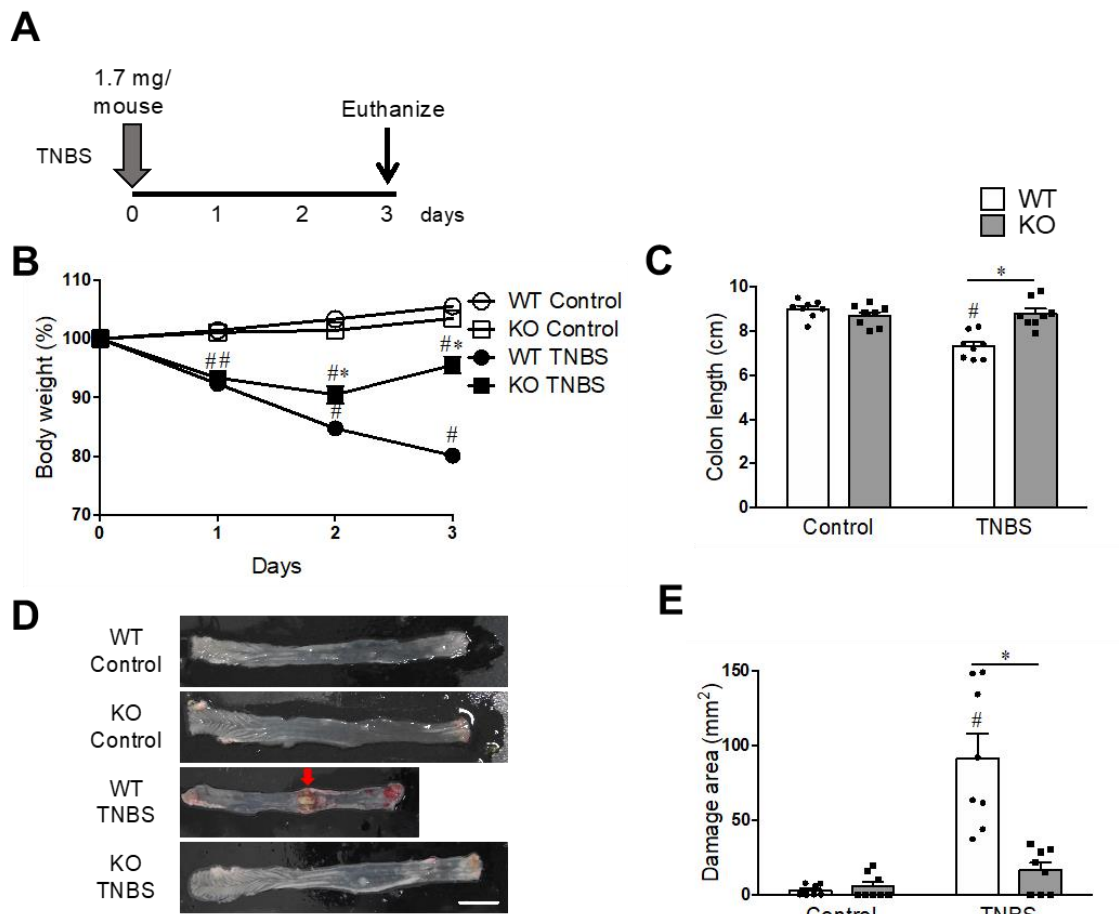


Fig. 6. Effect of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) deficiency on acute colitis induced by a single 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) injection. Under anesthesia, acute colitis was induced through intracolonic TNBS administration (1.7 mg/mouse in 30% ethanol) and examined on day 3 (A). Body weight was determined daily (B). Colon length (C) and Macroscopic damage (D) were determined on day 3. Representative macroscopic appearance (E) of colon tissue from wild-type (WT) and TRPM2-deficient (TRPM2KO) mice 3 days after TNBS-induced acute colitis. A scale bar : 1 cm. Macroscopic damage areas are indicated by arrows. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) (n = 8). Statistical significance was analyzed using two-way ANOVA with the Holm–Sidak test. *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

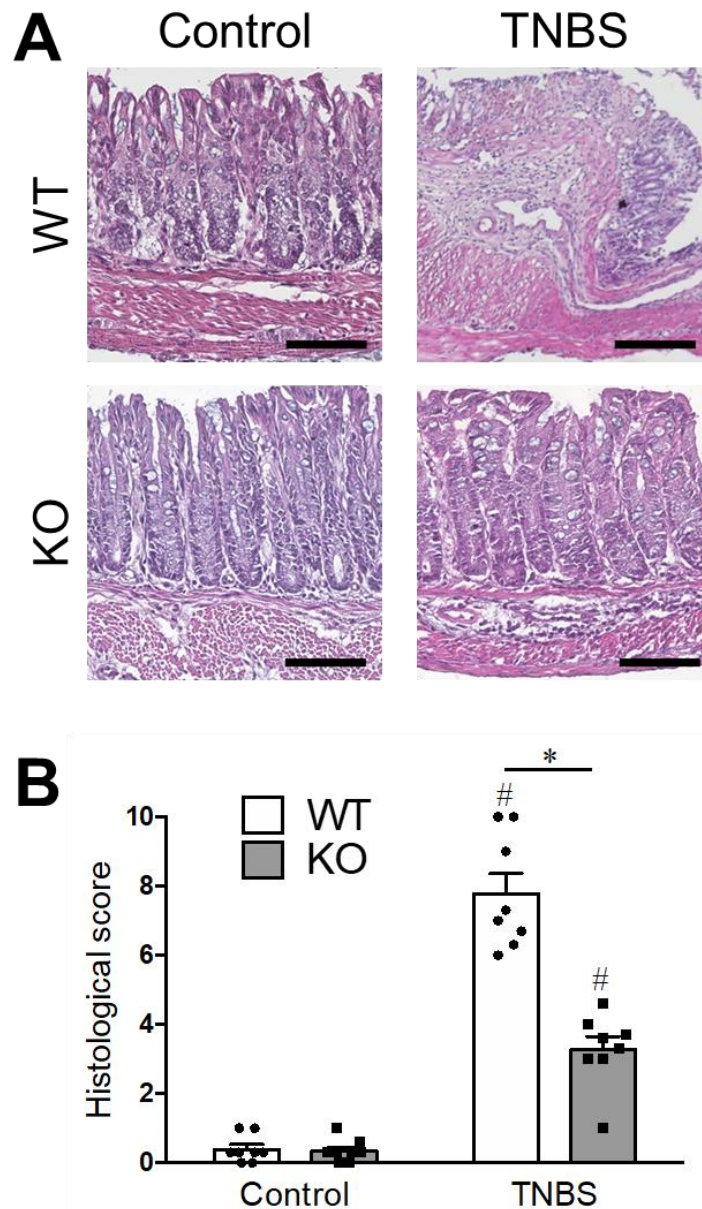


Fig. 7. Effect of TRPM2 deficiency on acute colitis induced histological damage. Under anesthesia, acute colitis was induced through intracolonic TNBS administration (1.7 mg/mouse in 30% ethanol) and examined on day 3. Representative images of hematoxylin-eosin (HE)-stained sections (A) and histological score (B) of colon tissue from wild-type (WT) and TRPM2-deficient (TRPM2KO) mice 3 days after TNBS-induced acute colitis. Scale bars : 50 μ m. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) (n = 8). Statistical significance was analyzed using Kruskal–Wallis analysis, followed by Dunn’s multiple-comparison test. *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

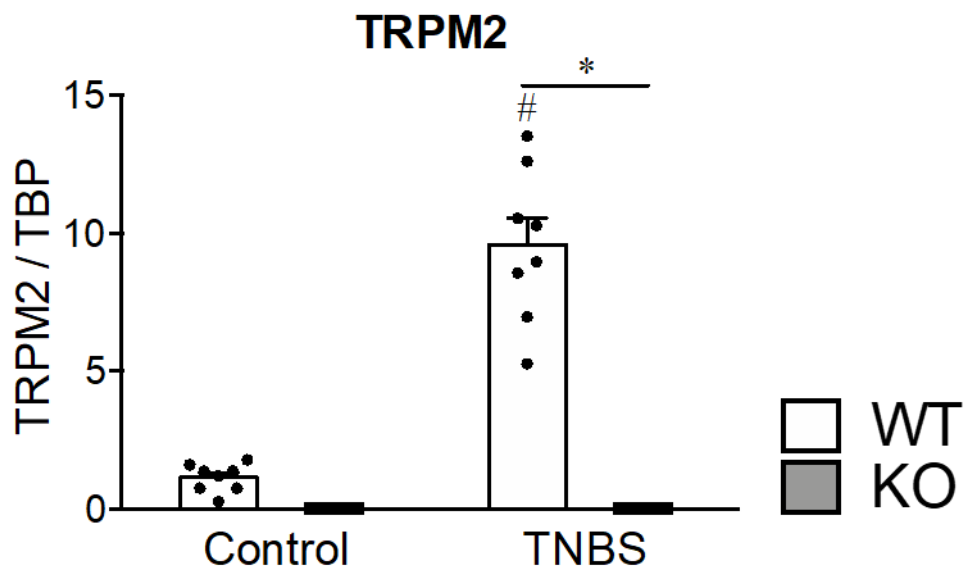


Fig. 8. The mRNA expression of TRPM2 in acute colitis. The mRNA expression of TRPM2 in the colon from WT and TRPM2KO mice 3 days after TNBS treatment. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) (n = 8). Statistical significance was analyzed using two-way ANOVA with the Holm–Sidak test. *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

2. TNBS 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎におけるサイトカイン、ケモカインおよび転写因子発現に対する TRPM2KO の影響

TNBS 誘起急性大腸炎における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それらの転写因子の mRNA 発現を RT-qPCR により測定した。TNBS の単回直腸内投与は、3 日目には、WT マウスにおいて、炎症性サイトカインである TNF- α ($P < 0.0001$)、IL-1 β ($P < 0.0001$)、ケモカインである CXCL2 mRNA を顕著に増加させたが ($P < 0.0001$)、それらの増加はいずれも TRPM2KO マウスでは有意に抑制された (いずれも $P < 0.0001$) (Fig. 9A-C)。

WT マウスにおいては、Th1 分化誘導に関与する IL-12a ($P < 0.0001$) や Th1 細胞から産生されるサイトカインである IFN- γ ($P < 0.0001$) などの Th1 関連サイトカイン (Fig. 10A and B)、Th17 分化誘導に関与する IL-6 ($P < 0.0001$)、TGF- β 1 ($P = 0.0048$)、IL-23a ($P < 0.0001$)、Th17 細胞から産生されるサイトカインである IL-17a ($P < 0.0001$) などの Th17 関連サイトカイン (Fig. 10C-F)、さらに Th1 および Th17 の転写因子であるそれぞれ T-bet ($P = 0.002$) および Ror γ t 発現もまた TNBS 単回直腸内投与により顕著に増加した ($P < 0.0001$) (Fig. 10G and H)。TNBS 単回直腸内投与による Th1 関連サイトカインである IL-12a ($P < 0.0001$)、IFN- γ ($P = 0.0002$)、Th17 関連サイトカインである IL-6 ($P < 0.0001$)、TGF- β 1 ($P < 0.0001$)、IL-23a ($P < 0.0001$)、IL-17a ($P < 0.0001$)、それらの転写因子である T-bet ($P = 0.0025$) および Ror γ t ($P < 0.0001$) mRNA 発現の増加はいずれも WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。

一方、Th2 分化誘導に関与する IL-4、Th2 細胞から産生されるサイトカインである IL-5 および IL-13 などの Th2 関連サイトカイン、その転写因子である GATA-3 mRNA 発現は、WT および TRPM2KO マウスいずれも TNBS 単回直腸内投与によっては影響を受けなかった (Fig. 11A-D)。

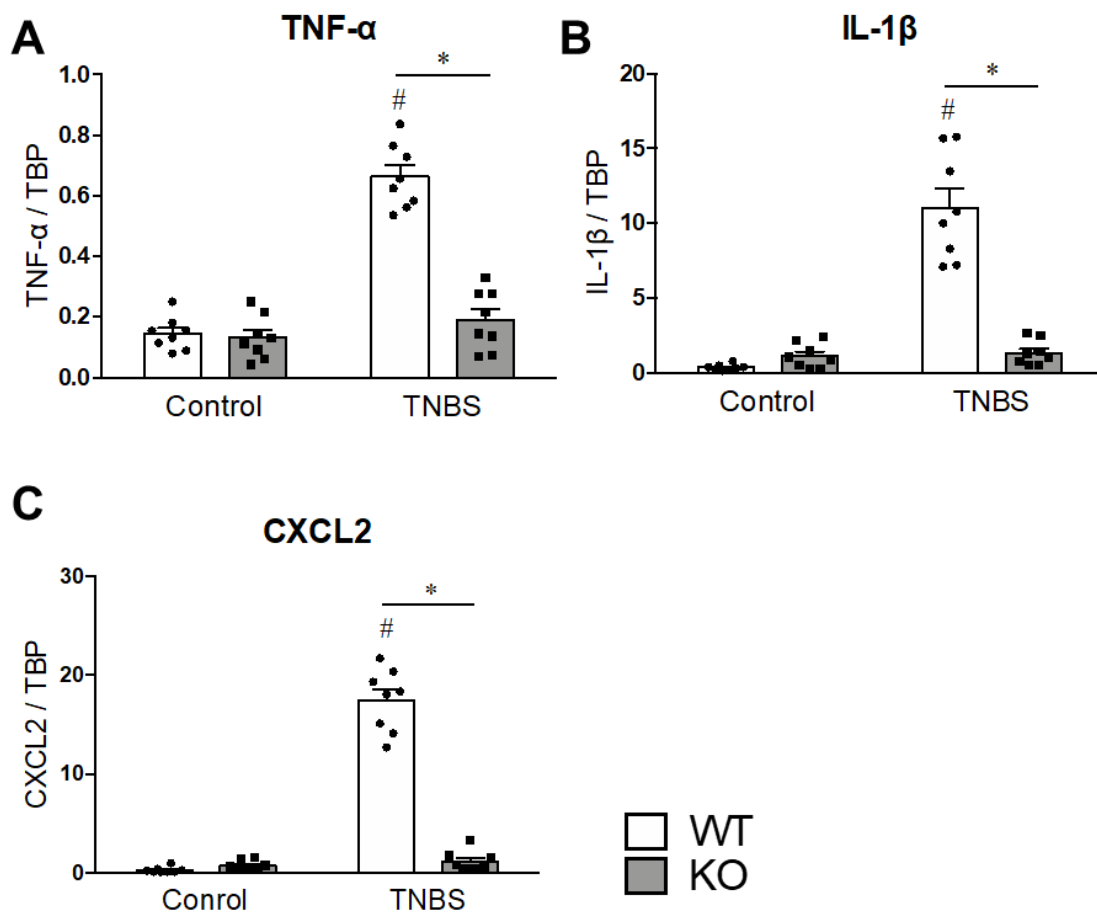


Fig. 9. Effect of TRPM2 deficiency on upregulating various proinflammatory cytokines/chemokines in the colon with acute colitis induced by a single TNBS injection. The mRNA expression of TNF- α (A), IL-1 β (B), CXCL2 (C) in the colon of WT and TRPM2KO mice was determined 3 days after TNBS injection. Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test. *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

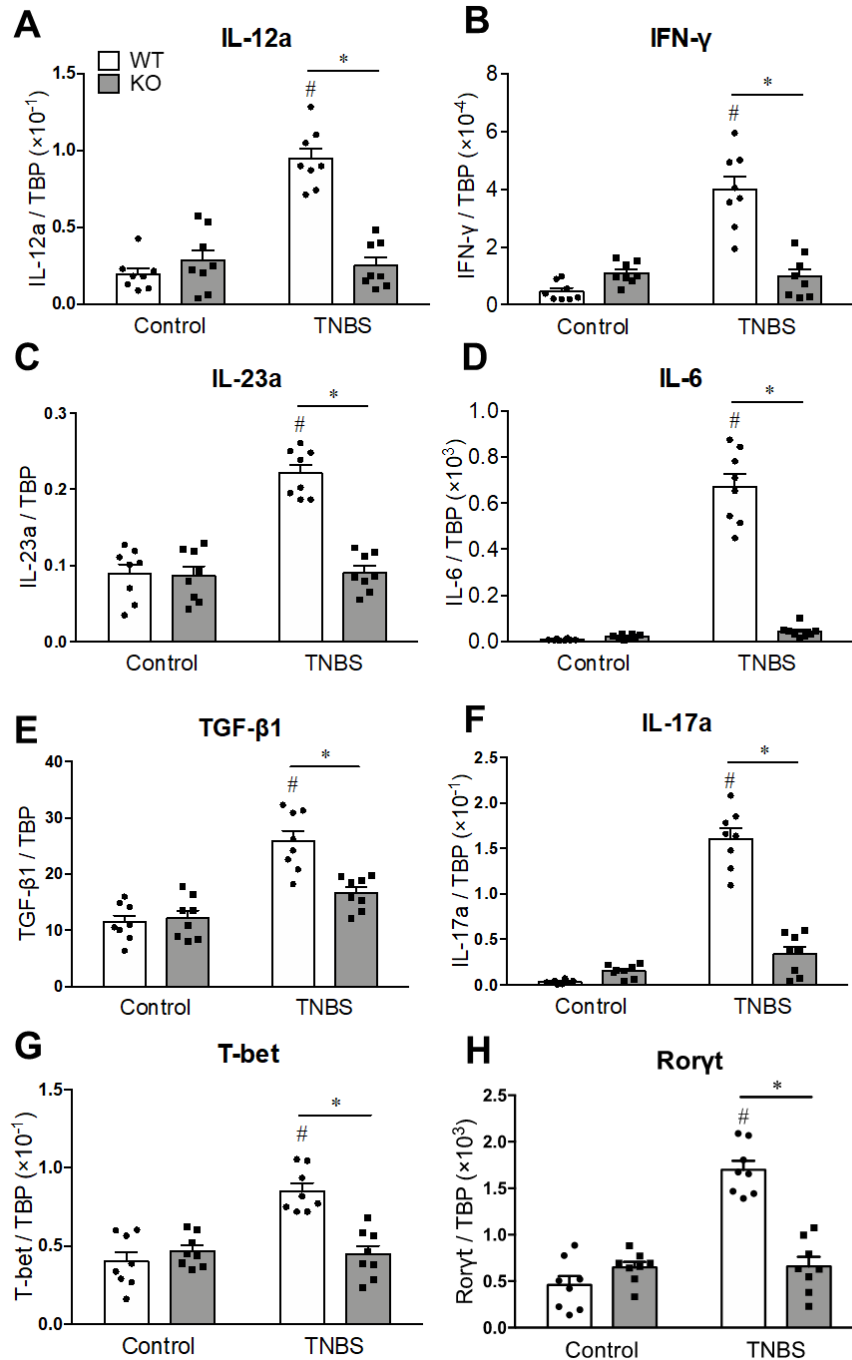


Fig. 10. Effect of TRPM2 deficiency on upregulating various Th1/Th17-related cytokines and their transcription factors in the colon with acute colitis induced by a single TNBS injection. The mRNA expression of IL-12a (A), IFN- γ (B), IL-23a (C), IL-6 (D), TGF- β 1 (E), IL-17a (F), T-bet (G), and Roryt (H) in the colon of WT and TRPM2KO mice was determined 3 days after TNBS injection. Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm-Sidak test. *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

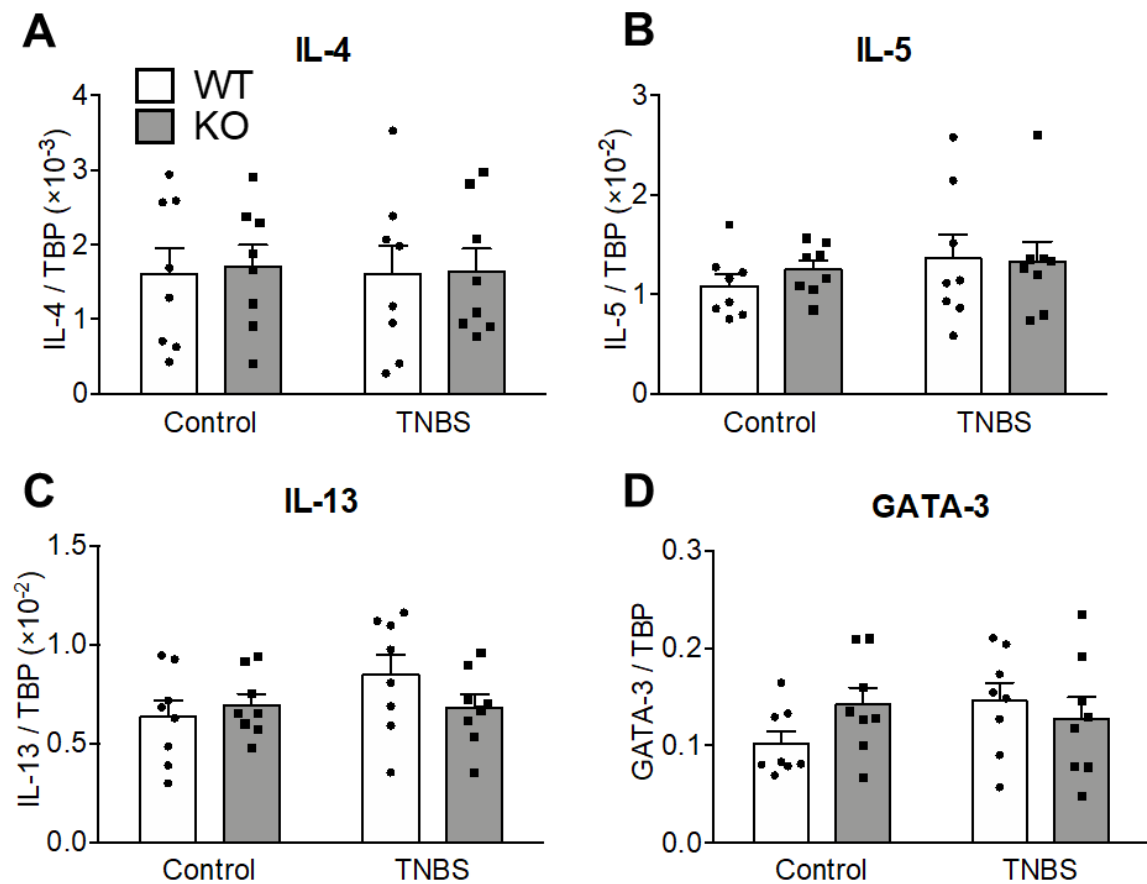


Fig. 11. Effect of TRPM2 deficiency on upregulating various Th2-related cytokines and its transcription factor in the colon with acute colitis induced by a single TNBS injection. The mRNA expression of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), and GATA-3 (D) in the colon of WT and TRPM2KO mice was determined 3 days after TNBS injection. Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test. *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

3. 骨髄キメラマウスを用いた TNBS 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎に対する骨髄由来細胞および非骨髄由来細胞に発現する TRPM2KO の影響

マクロファージなどの炎症免疫細胞 (骨髄由来細胞) および上皮、血管内皮および神経 (非骨髄由来細胞) のいずれに発現する TRPM2 が急性大腸炎の病態に関与しているのかを明らかにするため、TRPM2KO マウスを用いて骨髄キメラマウスを作製し検討を行った。WT または TRPM2KO マウス (ドナーマウス) から採取した骨髄細胞を、致死線量の X 線を照射することで内因性の骨髄細胞を死滅させた WT または TRPM2KO マウス (レシピエントマウス) に移植することで、計 4 種類の骨髄キメラマウスを作製した (WT マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植したマウス: WT→WT、WT マウスの骨髄を TRPM2KO マウスに移植したマウス: WT→KO、TRPM2KO マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植したマウス: KO→WT、TRPM2KO マウスの骨髄細胞を TRPM2KO マウスに移植したマウス: KO→KO) (Fig. 5)。

TNBS の単回直腸内投与は、WT マウスの骨髄細胞を移植した WT→WT および WT→KO マウスにおいては、WT マウスの場合と同様に顕著な体重減少 (Fig. 12A)、3 日目には大腸の短縮 (WT→WT: 9.24 ± 0.132 cm および WT→KO: 9.26 ± 0.112 cm) (Fig. 12B)、重度の浮腫、広範なびらんおよび潰瘍の発生に特徴づけられる肉眼的損傷 (WT→WT: 59.2 ± 2.35 mm² および WT→KO: 65.2 ± 3.91 mm²) を惹起した (Fig. 11C and D)。これに対して、TRPM2KO マウスの骨髄細胞を移植した KO→WT および KO→KO マウスでは、TNBS 投与による体重減少 ($P < 0.0001$)、大腸の短縮 (KO→WT: 10.3 ± 0.143 cm および KO→KO: 10.2 ± 0.127 cm) ($P < 0.0001$) および肉眼的損傷 (KO→WT: 8.80 ± 2.76 mm² および KO→KO: 7.54 ± 3.38 mm²) ($P < 0.0001$) は TRPM2KO マウスの場合と同様にいずれも有意に抑制された。

組織学的評価においても同様に、TNBS 投与 3 日目の大腸においては、WT マウスの骨髄細胞を移植した WT→WT および WT→KO マウスでは高度な炎症性細胞の浸潤、上皮の脱落、浮腫、杯細胞および陰窩の喪失が観察され (Fig. 13A)、組織学的傷害スコア (WT→WT: 8.00 ± 0.681 および WT→KO: 8.13 ± 0.480) は顕著に増加したが (Fig. 13B)、これらの変化はいずれも TRPM2KO マウスの骨髄細胞を移植した KO→WT および KO→KO マウス (KO→WT: 2.50 ± 0.189 および KO→KO: 1.88 ± 0.398) では有意に抑制された ($P < 0.0001$)。

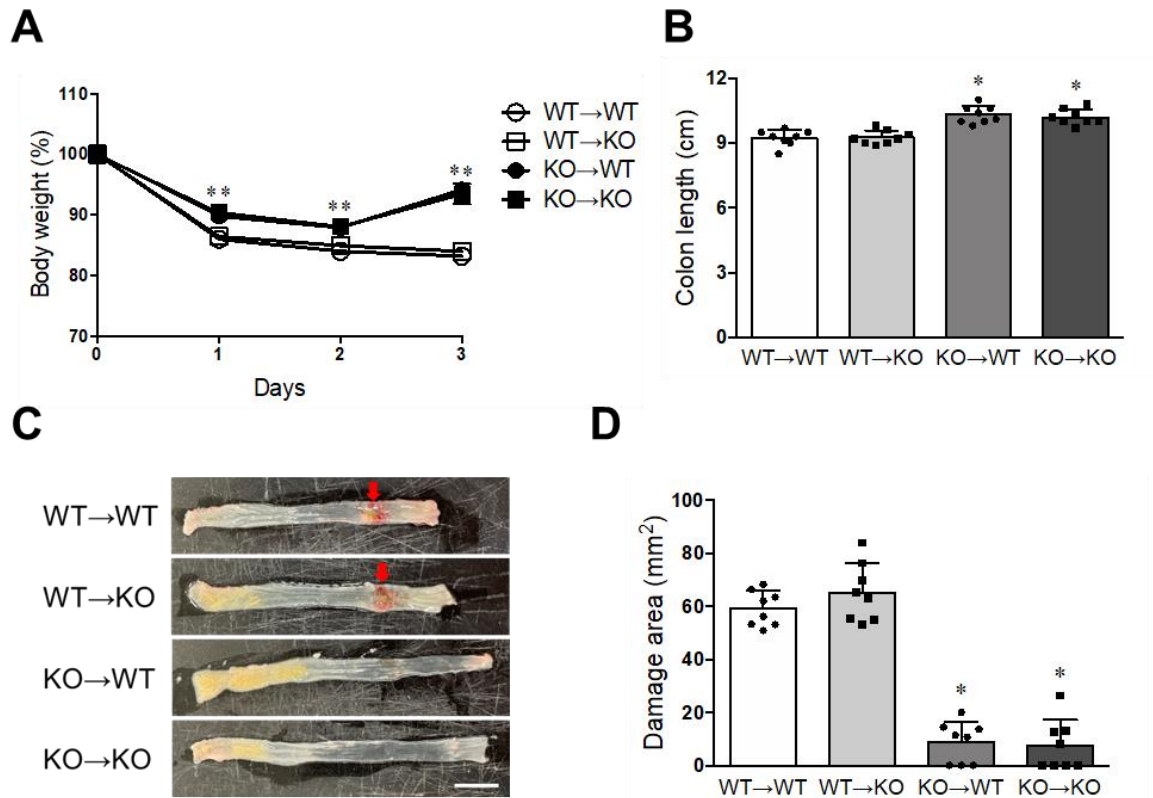


Fig. 12. Involvement of TRMP2 expressed in bone marrow (BM)-derived hematopoietic and non-hematopoietic cells in acute colitis induced by a single TNBS injection. BM cells from WT and TRPM2KO mice (donors) were transferred to irradiated WT and TRPM2KO mice (recipients). The WT mice received BM cells from the WT mice (WT→WT) and the TRPM2KO mice (KO→WT), and the TRPM2KO mice received BM cells from the WT (WT→KO) and the TRPM2KO mice (KO→KO). Body weight was determined daily (A). Colon length (B) and macroscopic damage (D) were determined 3 days after TNBS injection. Representative macroscopic appearance (C) of colon tissue from mice 3 days after TNBS-induced acute colitis. A scale bar : 1 cm. Macroscopic damage areas are indicated by arrows. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 8). Statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA with Holm-Sidak multiple-comparison test. *P < 0.05 vs. WT→WT mice.

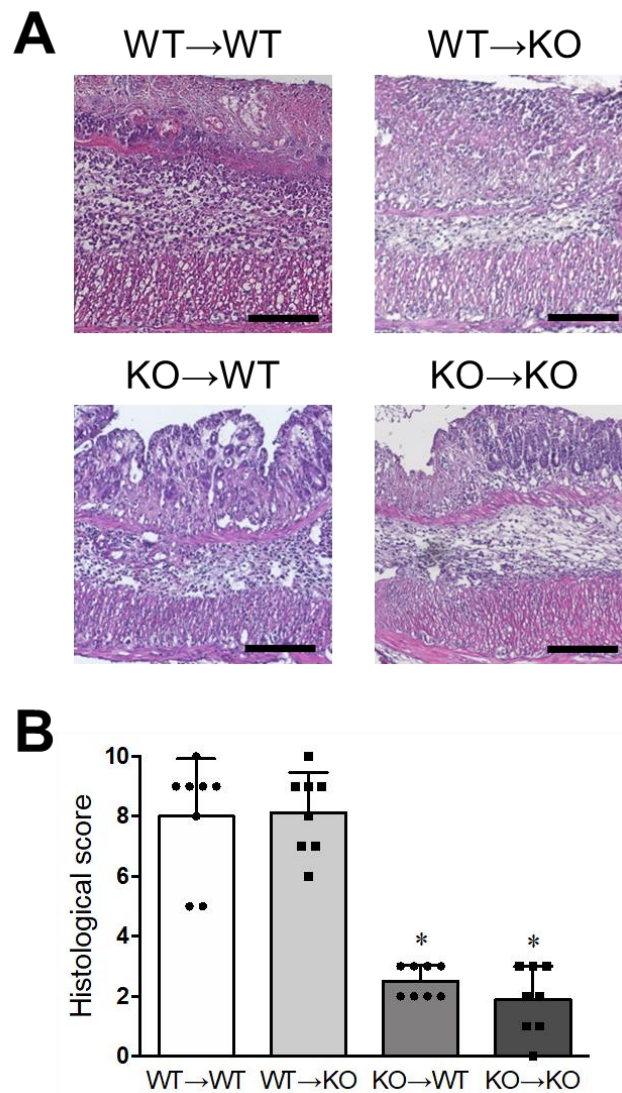


Fig. 13. Effect of TRMP2 expressed in BM-derived hematopoietic and no-hematopoietic cells in acute colitis induced histological damage. Representative image of HE-stained sections (A) and histological score (B) of colon tissue from mice 3 days after TNBS-induced acute colitis. Scale bars : 50 μ m. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 8). Statistical significance was analyzed using Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn’s multiple-comparison test. *P < 0.05 vs. WT→WT mice.

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

第4節 考察

以前の報告において、UCの病態モデルとして知られているDSS誘起大腸炎がTRPM2KOマウスではWTマウスと比較して抑制されることから、UCの病態進展にTRPM2が関与していることが示されている [63]。本章では、CDの病態モデルとして繁用されるTNBS誘起大腸炎の病態におけるTRPM2の関与について、TRPM2KOマウスを用いて検討した。

TNBSの単回直腸内投与は、投与直後から顕著な体重減少を惹起し、WTマウスでは体重は3日目までさらに減少した。一方、TRPM2KOマウスでは体重減少は一過性であり、2日目以降は徐々に回復した。TNBS投与3日目には、WTマウスでは大腸の短縮を伴う明らかな肉眼的および組織学的損傷の発生が観察されたが、これらの損傷もまたTRPM2KOマウスでは有意に抑制された。さらに、肉眼的に損傷を認めた大腸炎局所ではTRPM2発現が明らかに増加していた。これらの結果は、TRPM2がDSS誘起大腸炎の場合と同様にTNBS誘起急性大腸炎の病態の進展に関与していることを強く示唆している。すなわち、TRPM2はUCのみならずCDの病態においても重要な役割を演じている可能性が推察される。

CDの病因および病態については未だ不明な部分が多いが、ヘルパーT細胞サブセットのバランスの異常、特にTh1およびTh17免疫応答の活性化が関与していることが知られている [12-17]。本章の検討においても、WTマウスにおいては、TNBSの単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎の病変局所では、IL-12aおよびIFN- γ などのTh1関連サイトカイン [32, 33, 81]に加えて、IL-6、TGF- β 1、IL-23aおよびIL-17aなどのTh17関連サイトカイン [19-22, 82]の顕著な増加が観察された。さらに、Th1およびTh17細胞の特異的転写因子として知られるそれぞれT-bet [17]およびRoryt [83]発現も増加していた。一方、IL-4、IL-5およびIL-13などのTh2関連サイトカイン、その転写因子であるGATA-3 [71-73]の発現については変化が認められなかった。一方、TRPM2KOマウスにおいては、TNBSの単回直腸内投与により誘起されるTh1およびTh17関連サイトカインならびにそれらの転写因子の発現増加は有意に抑制された。特にTh1およびTh17細胞への分化に関与するそれぞれIL-12aおよびIL-6、TGF- β 1、IL-23a発現の増加を抑制したことから、TRPM2がTNBSの単回直腸内投与により活性化されるTh1およびTh17細胞の分化誘導過程に関与している可能性が考えられる。本研究では病変局所へのヘルパーT細胞の浸潤の変化については確認できていない。すなわち、TRPM2はヘルパーT細胞の浸潤過程に関与しており、TRPM2KOではヘルパーT細胞の浸潤を抑制した結果、Th1/Th17関連サイトカイン発現を抑制した可能性も考えられる。この点についてはさらなる検討が必要であるが、いずれにせよ、TRPM2はTh1/Th17細胞の浸潤促進や活性化を介してTNBS誘起急性大腸炎の病態進展に寄与しているものと推察される。

TRPM2は腸管においては、神経細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、さらにはT細胞や単球/マクロファージなどに発現していることが報告されている [58-62]。DSS誘起大腸炎を用いた以前の報告では、単球/マクロファージに発現するTRPM2が大腸炎の病態に関与している可能性が示されている [63]。しかし、その検討では全身のTRPM2KOマウスを用いていることから、神経細胞、上皮細胞および血管内皮細胞に発現するTRPM2の関与については必ずしも否定できない。そこで、TRPM2KOマウスを用

いて骨髄キメラマウスを作製し、TNBS 誘起急性大腸炎モデルで検討を行った。WT マウスの骨髄を移植した WT および TRPM2KO (WT→WT および WT→KO) マウスでは、WT マウスと同様に顕著な体重減少および大腸の短縮を伴う大腸炎の発症が観察された。これに対して、TRPM2KO マウスの骨髄を移植した WT および TRPM2KO (KO→WT および KO→KO) マウスでは、全身の TRPM2KO マウスと同様に、体重減少、大腸の短縮を伴う大腸炎の発症は有意に抑制された。これらの結果は、骨髄由来細胞、すなわちマクロファージなどの炎症免疫細胞に発現する TRPM2 が大腸炎の病態進展に関与していることを強く示唆している。

以上、本章では、TNBS の単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎の病態において TRPM2 が関与することを明らかにした。おそらく、TRPM2 は主としてマクロファージなどの炎症免疫細胞に発現し、Th1/Th17 免疫応答の活性化に寄与しているものと推察される。

第5節 小括

本章では、TNBS の単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎の病態における TRPM2 の役割を明らかにするために、TRPM2KO マウスを用いて検討し、次の知見を得た。

1. TNBS 誘起急性大腸炎の病態進展に TRPM2 が関与していることを明らかにした。
2. TRPM2 は炎症性サイトカインおよびケモカイン発現増大に加えて、Th1 および Th17 免疫応答に関与していることを明らかにした。
3. 骨髄由来細胞に発現する TRPM2 が、Th1 および Th17 免疫応答の活性化を介して、大腸炎の病態進展に寄与していることを明らかにした。

第2章

TNBS 誘起マウス大腸炎関連線維症の病態における TRPM2 の役割

第1節 諸言

第1章において、TNBS の単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎の病態に TRPM2 が関与していること、さらに骨髄分化マクロファージに発現する TRPM2 が Th1/Th17 免疫応答を活性化に関与することを明らかにした。本章では、慢性期の大腸炎で観察される病的線維化の病態における TRPM2 の役割について検討した。

CD は、UC と比較して、病変が粘膜深部にまで達し、持続的な腸炎により、慢性期には狭窄、癒着、瘻孔形成、さらには癌化などの重大な合併症を引き起こすことが知られている [7, 84]。これらの病態には慢性炎症に起因する病的線維化が関与しているものと考えられている。線維化は傷害の修復・治癒過程に観られる現象であり、コラーゲンなどの膠原線維の蓄積に特徴づけられる [85]。実際、CD 患者の約 40% に線維化が生じていることが報告されている [86]。近年、新たな免疫抑制薬や TNF- α モノクロナール抗体をはじめとする種々の生物学的製剤の登場により、CD を含む IBD の治療は大きく進歩したが、これら最新の薬物療法であっても、線維症に起因する合併症を有する症例では効果がほとんど認められないことから、病的線維化に対する予防および治療法の確立が望まれている。

最近、TRPM2 が急性期の炎症病変のみならず、慢性期の肺線維症 [64, 65]、動脈硬化 [66, 67]、腎線維症 [87] の病態にも関与することが明らかになってきた。炎症の急性期では病変部にマクロファージの集積が増加することで、マクロファージによる細胞傷害作用に加えて、Th1/Th17 免疫応答を促進させることで炎症をさらに促進あるいは持続させる [18, 24, 25]。一方、炎症の慢性期では、マクロファージは、組織修復、リモデリングおよび Th2 免疫応答の促進などにより炎症の収束に寄与しているが、これらの反応が過剰に生じると病的線維化につながる [35, 36]。これらの背景から、TRPM2 は CD における急性期の大腸炎のみならず、慢性期の病的線維化の病態に関与している可能性が推察される。しかし、TRPM2 の CD 関連線維症の病態における役割、さらには病態に関与する TRPM2 の発現細胞などについては不明である。

以前の研究において、単球に発現する TRPM2 が H₂O₂ の刺激により、CXCL2 などのケモカイン産生を増加させることが報告されている [63]。しかし、TRPM2 のヘルパーT 細胞サブセットの分化との関連については知られていない。

本章では、CD の慢性期の合併症である線維症の病態モデルとして知られる TNBS 誘起マウス大腸炎関連線維症における TRPM2 の関与について、TRPM2KO マウスを用いて、特にヘルパーT 細胞サブセットとの関連に着目し検討を行った。また、単球/マクロファージなどの骨髄由来細胞あるいは神経細胞、上皮細胞あるいは血管内皮細胞などの非骨髄由来細胞のいずれに発現する TRPM2 が大腸炎関連線維症の病態に関与しているかについて、TRPM2KO マウスを用いた骨髄キメラマウスを作製し検

討を行った。さらに、各種サイトカイン/ケモカイン発現における TRPM2 の関与を明らかにするため、マウスの骨髄から分化誘導したマクロファージを用いた *in vitro* 実験系で検討した。

第2節 実験材料および方法

1. 実験動物

第1章に準ずる。

2. 使用薬物

2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム二水和物 (TNBS) (富士フィルム和光純薬) は、30%エタノール水溶液に 10、15 および 20 mg/mL の濃度で調整した。その他の試薬は第1章に準ずる。

3. TNBS 誘起マウス大腸線維症の作製

TNBS 誘発結腸線維症の作製は既報に準じて行った [88]。すなわち、24 時間絶食した 10 週齢のマウスに三種混合麻酔薬 (マウス体重 10 g あたり 0.1 mL) を腹腔内投与することで全身麻酔を行った。各濃度の TNBS の 30%エタノール水溶液 50 μ L (0.5、0.5、0.75、0.75、1 および 1 mg/マウス) を 1 週間に 1 回 DISPOSAL 経口ゾンデ (フチガミ器械) を用いて、マウスの肛門から 4 cm の直腸内に投与した (Fig. 13A)。対照群 (Control 群) には 30%エタノール生理食塩水 50 μ L を同様に直腸内に投与した。TNBS および 30%エタノール水溶液の投与期間中 1 週間毎に体重を測定した。TNBS の最終投与 2 週間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、結腸 (肛門から盲腸) を摘出し、大腸の長さを測定した。さらに、大腸組織は組織学的評価および各種 mRNA 発現の測定に用いた。

4. HE 染色下における組織学的評価

第1章に準ずる。

5. マッソントリクローム (MT) 染色下における組織学的評価

摘出した遠位結腸を 10% 緩衝ホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋し、厚さ 4 μ m の薄切組織切片を作製した。組織切片は脱パラフィンした後、第一媒染剤 (武藤化学、東京) で処置した後、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 I (武藤化学) で核染色を行った。次に、第二媒染剤 (武藤化学) および 0.75% オレンジ G 溶液 (武藤化学) で処理した後、マッソン染色 B (武藤化学) で細胞質染色を行った。さらに、2.5% リンタングステン酸液 (武藤化学) で処置した後、アニリン青液 (武藤化学) で膠原線維染色を行った。透徹処置後、顕微鏡下 (BZ-X800、キーエンス、大阪、日本) において青色に染色された膠原線維の浸潤の程度を既報に準じて評価した [89]。すなわち、0: 線維症なし、1: 軽度の線維症 (局所粘膜/粘膜下コラーゲン沈着、構造的歪み確認されない)、2: 中程度の線維症 (粘膜/粘膜下層構造の適度な歪みを伴うが、粘膜/粘膜下層の境界が不明瞭になることはない、顕著な粘膜/粘膜下層コラーゲン沈着)、3: 重度の線維症 (粘膜/粘膜下の境界を不明瞭にする顕著な構造的歪みを伴う広範な粘膜/粘膜下コラーゲンの沈着) の 4 段階 (0-3) で評価した。

6. 各種 mRNA 発現の測定

第 1 章に準ずる。なお、第 1 章で使用した以外の遺伝子のプライマーの配列は Table 3 に示した。

7. 骨髄キメラマウスの作製

第 1 章に準ずる。

8. 骨髄分化マクロファージの作製および H₂O₂ 処置によるサイトカイン発現の解析

骨髄由来マクロファージの作製は既報に準じて行った [90-92]。すなわち、マウスの大腿骨および脛骨を摘出し、PBS を骨髄腔内に注入することにより骨髄細胞を採取した。RBC lysis 緩衝液 (155 mmol/L NH₄Cl, 10 mmol/L KHCO₃, 0.1 mmol/L EDTA) で処理した後、70 μm セルストレイナーで濾過した。採取した骨髄細胞は、50 ng/mL マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を添加した 10% 牛血清含有 D-MEM (ナカライテスク) で 7 日間培養することでマクロファージに分化させた。作製した骨髄分化マクロファージに 10 nM H₂O₂ (富士フィルム和光純薬) を添加し、1 時間後にマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 経路の活性化をウェスタンブロットにより、また 3 時間後に各種 mRNA 発現を RT-qPCR により測定した。

9. 各種 MAPK 経路の活性化の解析

各種 MAPK として、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK)、p38 MAPK および c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) の活性化は、既報に準じてウェスタンブロットにより解析した [93]。H₂O₂ 処置した骨髄分化マクロファージを PBS で洗浄した後、プロテアーゼ阻害薬カクテル (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) およびホスファターゼ阻害薬カクテル (PhosSTOP, Roche Diagnostics GmbH) を含有 RIPA 緩衝液 (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaOH, 1% Nonidet P40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), pH7.6) 中で均質化した。4°C、12,000 × g で 30 分間遠心分離した後、上清を 95°C で 5 分間処理した。10% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動した後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) 上に転写した。PVDF 膜は一次抗体として各種 MAPK およびリン酸化 MAPK (p-MAPK) および β アクチンに対する特異的抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) で処置した後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) で処置した。本実験で使用した一次抗体は Table 4 に示した。さらに、PVDF 膜をペルオキシダーゼ発色試薬 (Western Lightning Plus-ECL, Boston, MA, USA) で処置した後、化学発光シグナルを化学発光検出装置 (Fusion Solo S, Viber, Collégien, France) で検出した。各種 MPAK および p-MAPK の発現量は β アクチンの発現量で標準化し、p-MAPK/MAPK として表示した。

10. 統計学的検討

第 1 章に準ずる。

Table 3.				
Primer used for detection of mouse mRNA transcripts in this study.				
Target	Length (bp)		Sequence	Accession Number
COL1A1 (<i>colla1</i>)	Fw	24	5'-GACATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3'	NM_007742.4
	Rv	22	5'-GGGACCCTTAGGCCATTGTGTA-3'	
Timp1 (<i>timp1</i>)	Fw	22	5'-GGGCTCCTAGAGACACACCAGA-3'	NM_001044384.1
	Rv	19	5'-GAGGATGCCAGATGCCAGA-3'	
ACTA2 (<i>acta2</i>)	Fw	21	5'-TTTGGCCCATTCCAACCATTA-3'	NM_007392.3
	Rv	22	5'-GACAATGGCTCTGGGCTCTGTA-3'	

Fw, forward; Rv, reverse.

Table 4.		
Primary antibodies used for western blot analysis in this study.		
Antibody	Source	Identifier
Anti-beta-Actin	Cell Signaling Technology	#4870S
Anti-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology	#4695S
Anti-P-p44/42 MAPK (pERK1/2)	Cell Signaling Technology	#4370S
Anti-p38 MAPK	Cell Signaling Technology	#8690S
Anti-P-p38 MAPK	Cell Signaling Technology	#4511S
Anti-JNK	Cell Signaling Technology	#9258S
Anti-P-JNL	Cell Signaling Technology	#9251S

第3節 結果

1. TNBS 反復直腸内投与により誘起される大腸線維症に対する TRPM2KO の影響

大腸線維症の病態における TRPM2 の役割を明らかにするため、TNBS (0.5, 0.75 および 1.0 mg/マウス in 30%エタノール溶液) を1週間に1回、2週間毎に TNBS の濃度を増量して直腸内に計6回反復投与することにより誘起される大腸線維症の病態を WT および TRPM2KO マウスで比較検討した (Fig. 14A)。実験期間中における体重増加は TNBS の反復投与により Control 群と比較して抑制されたが、その程度は WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは抑制され、4~7 週間目ではその抑制は有意であった ($P < 0.0001$) (Fig. 14B)。TNBS 最終投与 2 週間後において、大腸の短縮が観察されたが、その程度は WT マウス (8.70 ± 0.116 cm) と比較して TRPM2KO マウス (9.55 ± 0.203 cm) では有意に抑制された ($P = 0.0027$) (Fig. 14C)。

HE 染色下に結腸組織において組織学的評価を行ったところ、TNBS 最終投与 2 週間後の大腸では、炎症性細胞の浸潤、上皮の一部脱落、浮腫、杯細胞および陰窩の傷害を特徴とする中程度の組織学的傷害が観察されたが (Fig. 15A)、その程度は WT マウス (6.38 ± 0.324) と比較して TRPM2KO マウス (3.63 ± 0.324) では有意に抑制された ($P < 0.001$) (Fig. 15B)。

MT 染色下に線維化について組織学的評価を行ったところ、TNBS 最終投与 2 週間後の大腸では、粘膜層および粘膜下層における青色で染色される膠原線維の沈着に特徴づけられる線維症が観察されたが (Fig. 16A)、その程度もまた WT マウス (2.67 ± 0.0860) と比較して TRPM2KO マウス (1.06 ± 0.181) では有意に抑制された ($P < 0.0001$) (Fig. 15B)。

大腸線維症の病変部では、COL1A1、TIMP1 および ACTA2 などの線維化関連因子の mRNA 発現の増加が観察されたが、これらの増加はいずれも TRPM2KO マウスでは有意に抑制された (それぞれ、 $P < 0.0001$ 、 $P = 0.0005$ および $P < 0.0001$) (Fig. 17)。同様に、大腸線維症の病変部では TRPM2 mRNA の発現も増加していたが、TRPM2KO マウスでは TRPM2 mRNA は検出されなかった (Fig. 18)。

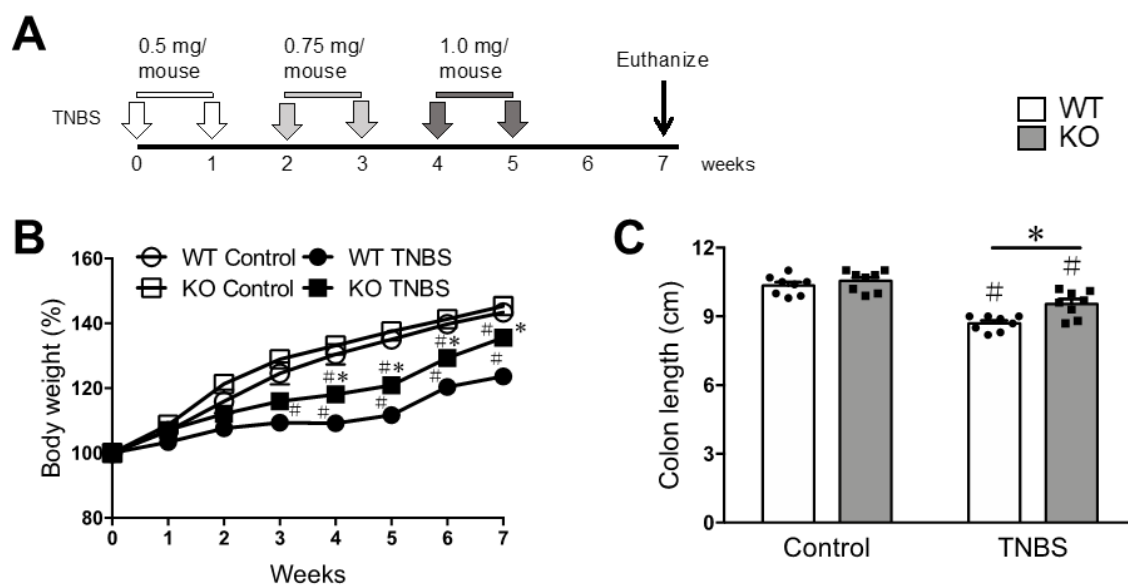


Fig. 14. Effect of TRPM2 deficiency on chronic colitis-associated fibrosis induced by repeated TNBS injections. Chronic colitis-associated fibrosis was induced by repeated weekly intracolonic TNBS injections (0.5, 0.5, 0.75, 0.75, 1.0, and 1.0 mg/mouse in 30% ethanol) for 5 weeks. Colonic fibrosis was examined 7 weeks after the onset of TNBS injections (A). Body weight was determined weekly (B). Colon length (C) was determined 7 weeks after the onset of TNBS injections. Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (B, C). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

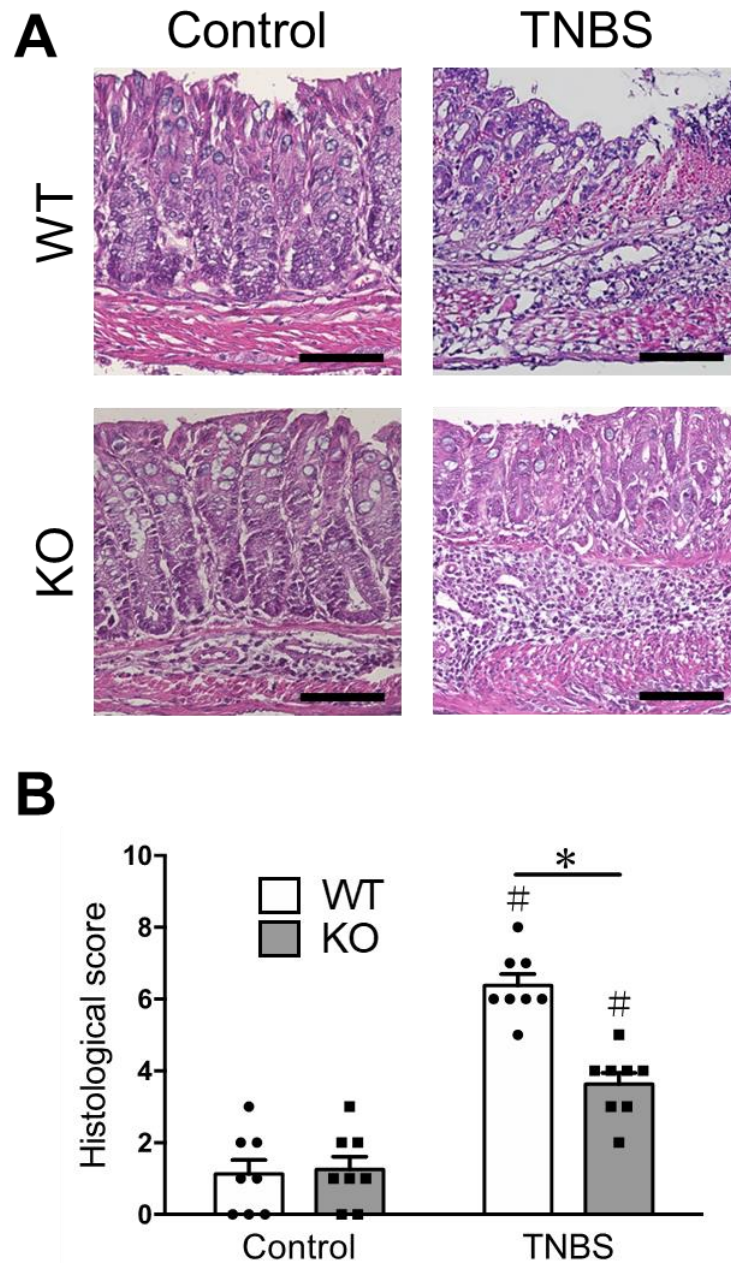


Fig. 15. Effect of TRPM2 deficiency on chronic colitis-associated fibrosis induced histological damage. Histological score (A) was determined 7 weeks after the onset of TNBS injections. Representative image of HE-stained sections (A) and histological score (B) of colon tissue obtained from WT and TRPM2KO mice 7 weeks after the onset of TNBS injections. Scale bars : 50 μ m (A). Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using Kruskal–Wallis analysis, followed by Dunn’s multiple-comparison test (B). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

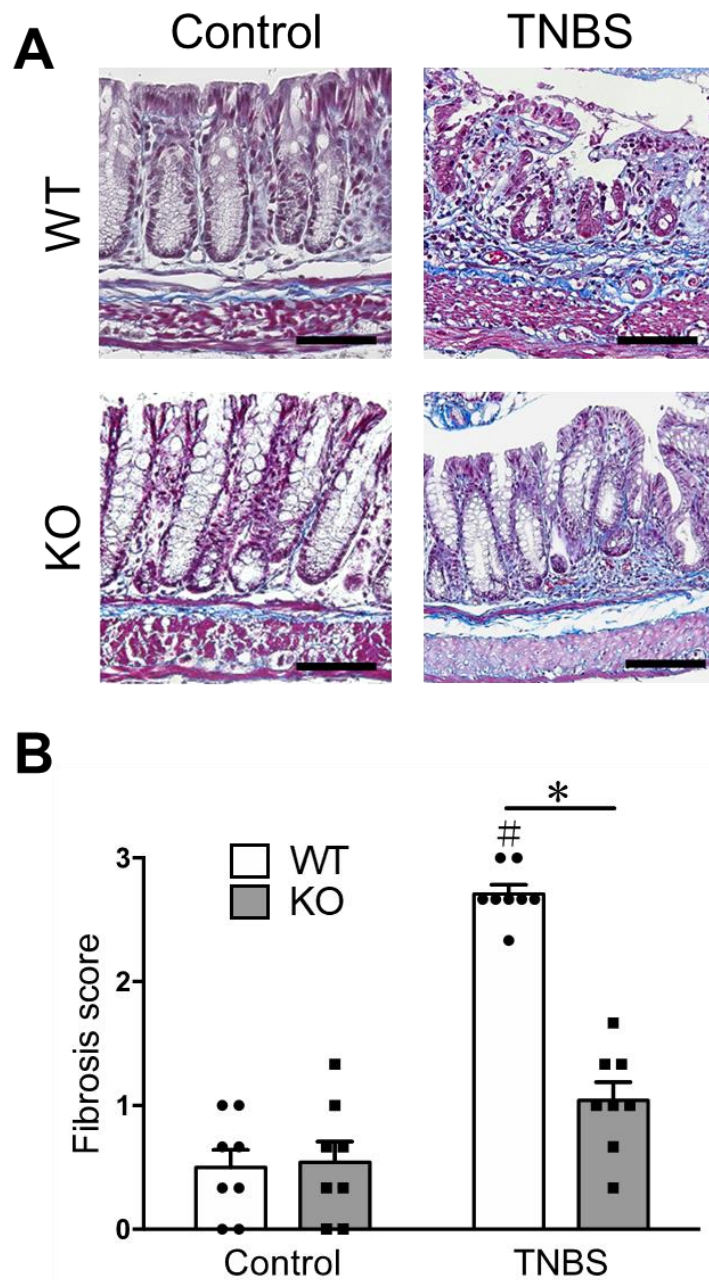


Fig. 16. Effect of TRPM2 deficiency on chronic colitis-associated fibrosis induced pathogenesis of fibrosis. Representative image of Masson's trichrome (MT)-stained sections (A) and fibrosis score (B) of colon tissue obtained from WT and TRPM2KO mice 7 weeks after the onset of TNBS injections. Scale bars : 50 μ m (A). Data are presented as the mean \pm S.E.M. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a Kruskal–Wallis analysis, followed by Dunn's multiple-comparison test (B). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

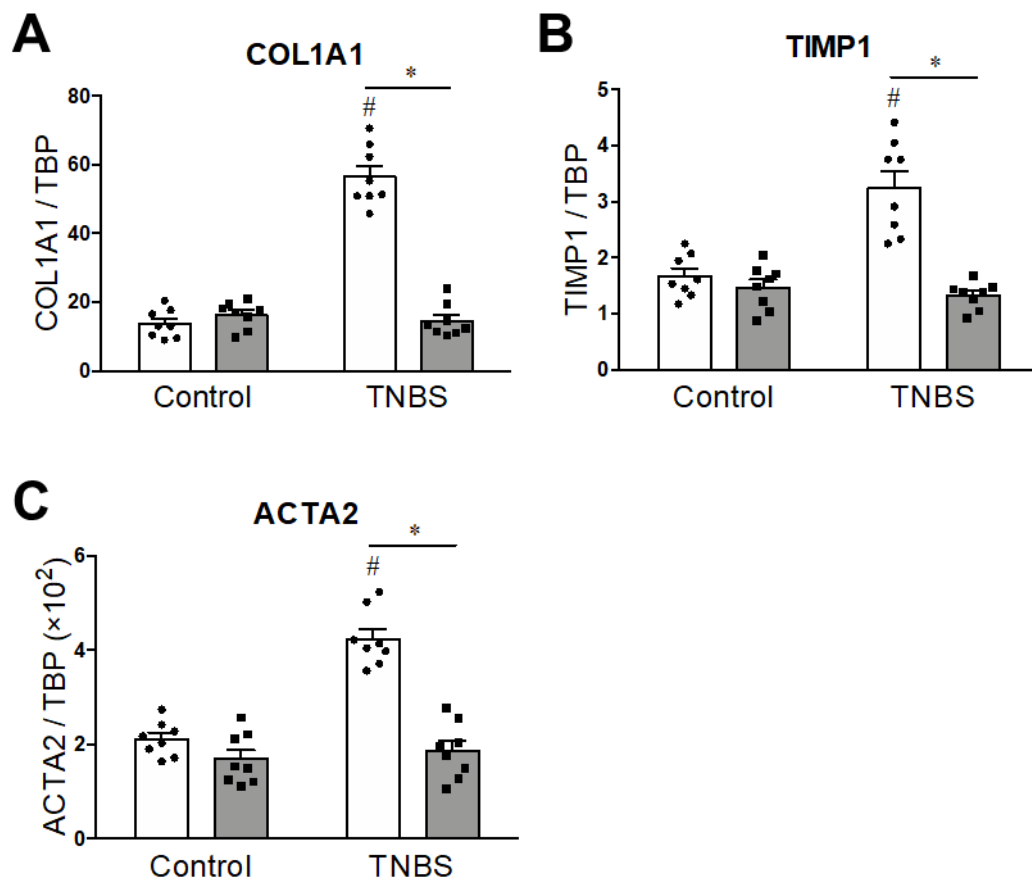


Fig. 17. Effect of TRPM2 deficiency on chronic colitis-associated fibrosis induced the mRNA expression of COL1A1, TIMP1 and ACTA2. The mRNA expression of COL1A1, TIMP1, ACTA2 in colon of WT and TRPM2KO mice (A-C). Data are presented as the mean ± SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A-C). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

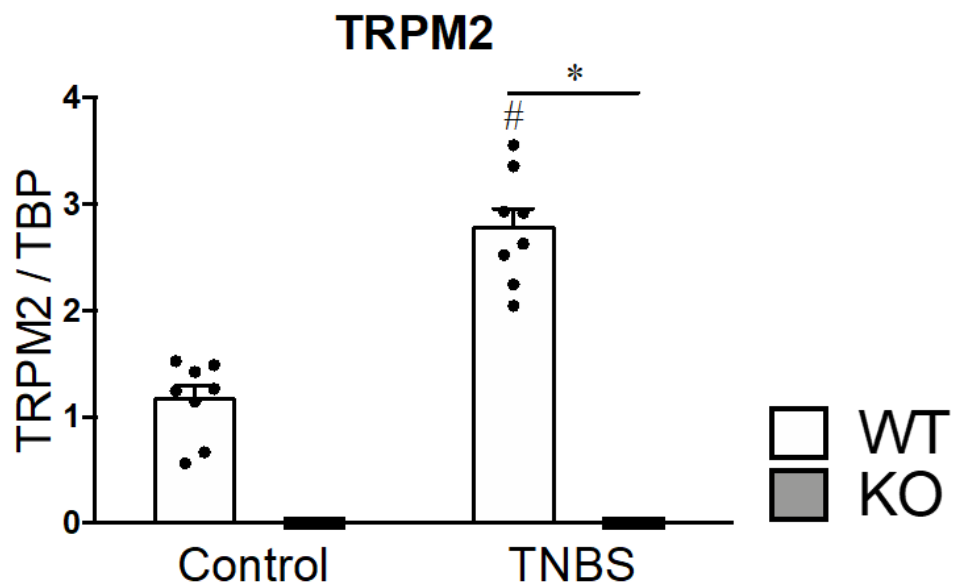


Fig. 18. The mRNA expression of TRPM2 in chronic colitis-associated fibrosis. The mRNA expression of TRPM2 in colon of WT and TRPM2KO mice (A). Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

2. TNBS 反復直腸内投与により誘起される大腸線維症におけるサイトカイン、ケモカインおよび転写因子発現に対する TRPM2KO の影響

TNBS 誘起大腸線維症における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それらの転写因子の mRNA 発現を RT-qPCR により測定した。TNBS の反復直腸内投与は、最終投与 2 週間後には、WT において、炎症性サイトカインである TNF- α 発現は有意に増加したが ($P = 0.0002$)、IL-1 β および CXCL2 発現は変化が認められなかった (Fig. 19A–C)。この TNF- α 発現の増加は TRPM2KO マウスでは有意に抑制された ($P = 0.0002$)。

WT マウスにおいて、Th17 分化誘導および線維化誘導に関与する TGF- β 1 発現は有意に増加したが ($P < 0.0001$)、Th1 分化誘導に関与する IL-12a、Th1 細胞から産生される IFN- γ などの Th1 関連サイトカイン、Th17 分化誘導に関与する IL-6、IL-23a、Th17 細胞から産生される IL-17a などの Th17 関連サイトカイン、さらに Th1 および Th17 の転写因子であるそれぞれ T-bet および Ror γ t 発現は何ら変化が認められなかった (Fig. 20A–H)。

一方、Th2 分化誘導に関与する IL-4 ($P < 0.0001$)、Th2 細胞から産生される IL-5 ($P < 0.0001$)、IL-13 ($P < 0.0001$) などの Th2 関連サイトカインおよびその転写因子である GATA-3 ($P < 0.0001$) 発現は TNBS 反復直腸内投与により WT マウスでは有意に増加したが、これらの増加はいずれも TRPM2KO マウスでは有意に抑制された (それぞれ $P < 0.0001$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P < 0.0001$ および $P = 0.0025$) (Fig. 21A–D)。

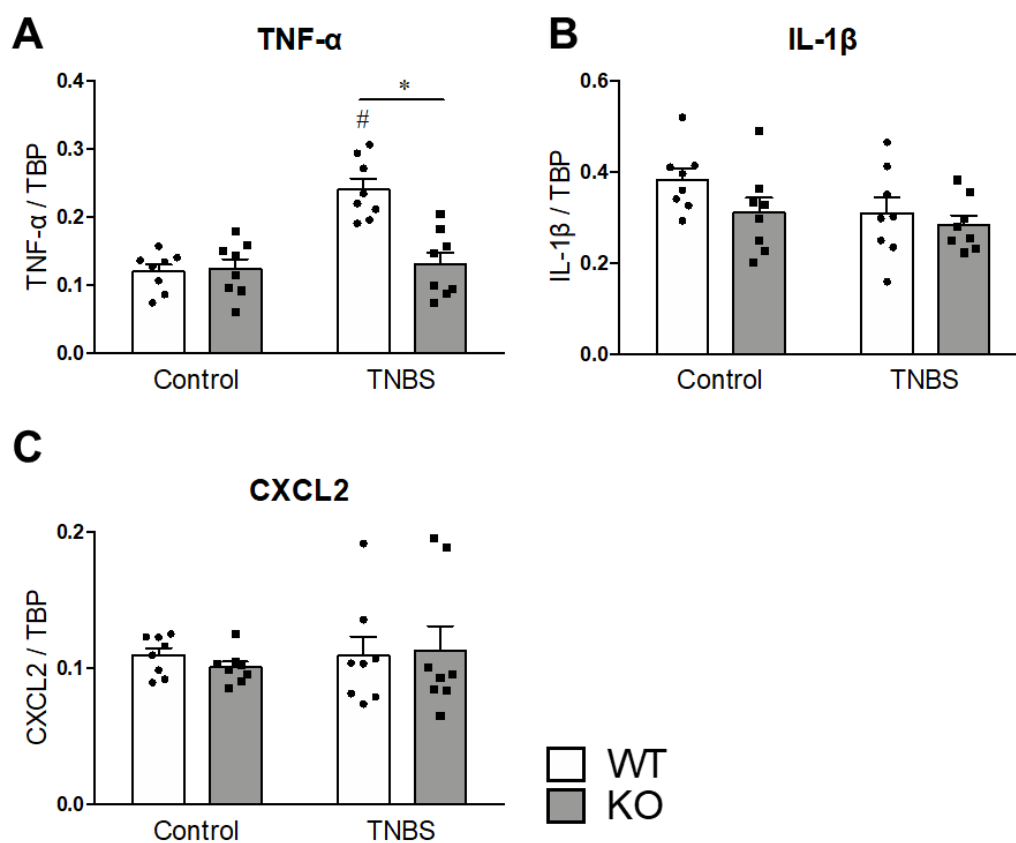


Fig. 19. Effect of TRPM2 deficiency on the upregulation of various proinflammatory cytokines/chemokines and in the colon with chronic colitis-associated fibrosis induced by repeated TNBS injections. The mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , CXCL2 in the colon of WT and TRPM2KO mice 7 weeks after the onset of TNBS injection (A-C). Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A-C). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

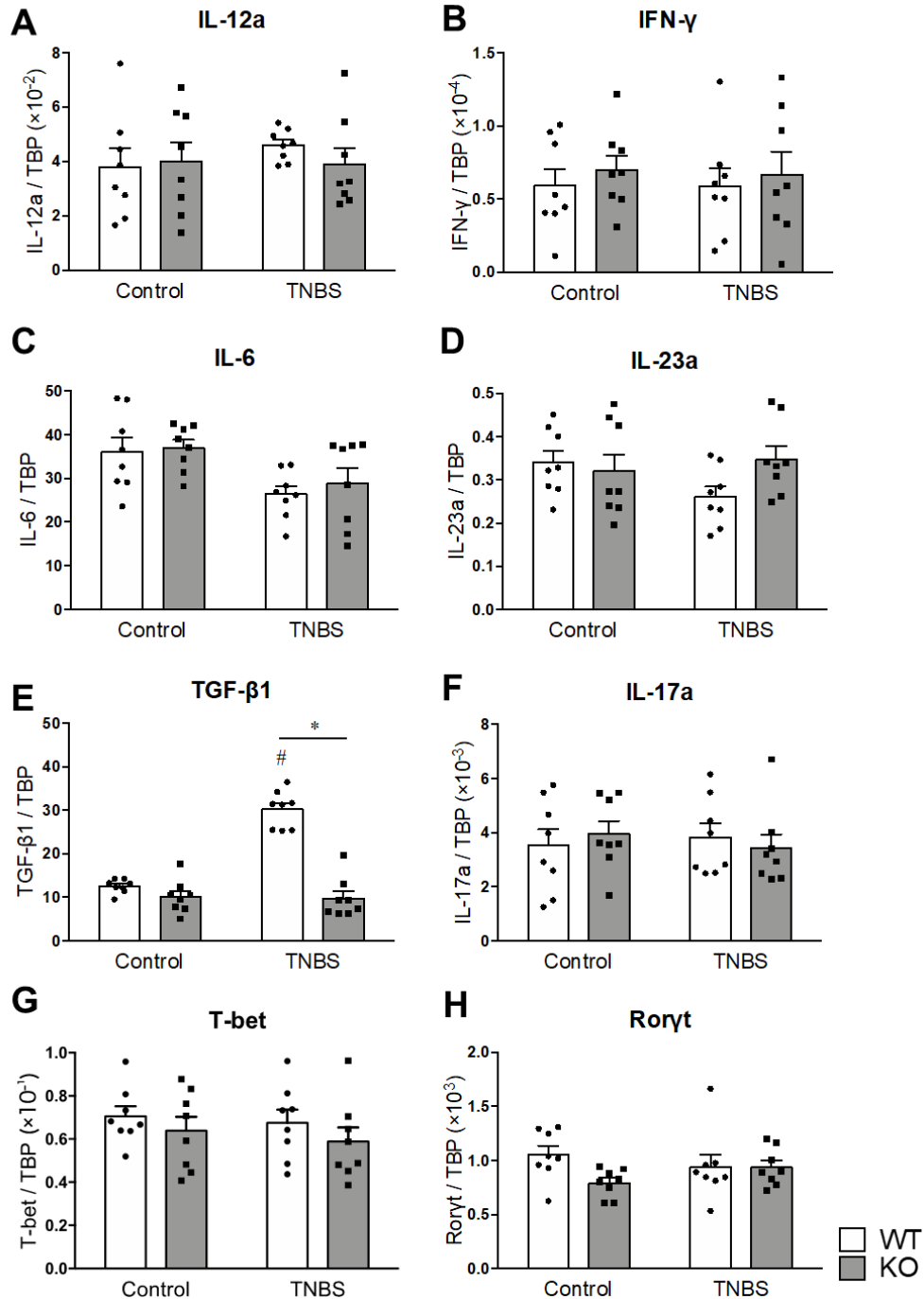


Fig. 20. Effect of TRPM2 deficiency on the upregulation of various Th1/Th17 related cytokines and their transcription factors in the colon with chronic colitis-associated fibrosis induced by repeated TNBS injections. The mRNA expression of IL-12a, IFN- γ , IL-6, TGF- β 1, IL-17a, IL-23a in the colon of WT and TRPM2KO mice 7 weeks after the onset of TNBS injection (A-H). Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A-H). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

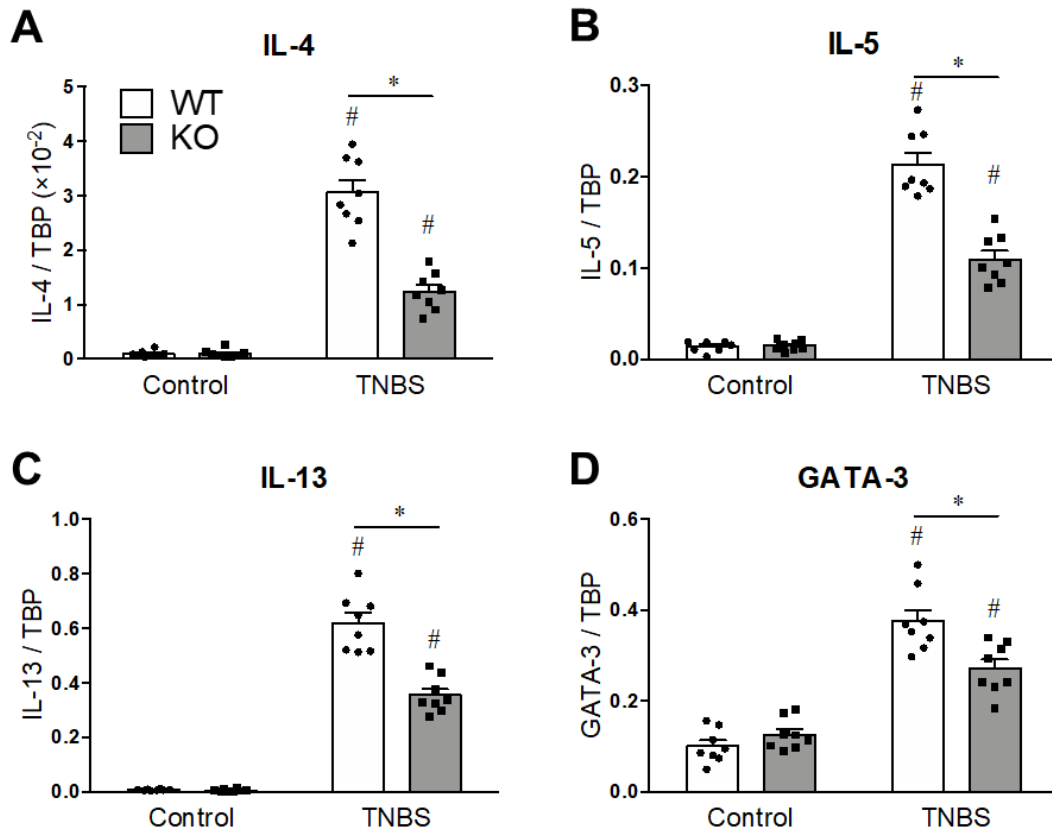


Fig. 21. Effect of TRPM2 deficiency on the upregulation of various Th2 related cytokines and this transcription factors in the colon with chronic colitis-associated fibrosis induced by repeated TNBS injections. The mRNA expression of IL-4, IL-5, IL-13, GATA-3 in the colon of WT and TRPM2KO mice 7 weeks after the onset of TNBS injection (A-D). Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A-D). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. control (without TNBS).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

3. 骨髄キメラマウスを用いた TNBS 反復直腸内投与により誘起される大腸線維症に対する骨髄細胞由来細胞および非骨髄細胞由来細胞に発現する TRPM2KO の影響

マクロファージなどの炎症免疫細胞 (骨髄由来細胞) および上皮、血管内皮および神経 (非骨髄由来細胞) のいずれに発現する TRPM2 が大腸炎関連線維症の病態に関与しているのかを明らかにするため、TRPM2KO マウスを用いて骨髄キメラマウスを作製し検討を行った。WT または TRPM2KO マウス (ドナーマウス) から採取した骨髄細胞を致死線量の X 線を照射することで内因性の骨髄細胞を死滅させた WT または TRPM2KO マウス (レシピエントマウス) に移植することで、計 4 種類の骨髄キメラマウスを作製した (WT マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植したマウス: WT→WT、WT マウスの骨髄を TRPM2KO マウスに移植したマウス: WT→KO、TRPM2KO マウスの骨髄を WT マウスに移植したマウス: KO→WT、TRPM2KO マウスの骨髄を TRPM2KO マウスに移植したマウス: KO→KO) (Fig. 4)。

TNBS の反復直腸内投与は、いずれの種類の骨髄キメラマウスにおいても体重の増加が抑制される傾向が認められたが、TNBS の最終投与 2 週間目 (TNBS 投与開始 7 週間目) においては、WT マウスの骨髄細胞を移植した WT→WT および WT→KO マウスと比較して、TRPM2KO マウスの骨髄細胞を移植した KO→WT および KO→KO マウスでは体重減少は有意に抑制された (それぞれ $P = 0.0025$ および $P = 0.0007$) (Fig. 22A)。

TNBS 最終投与 2 週間目には大腸の短縮が観察されたが、その程度は WT マウスの骨髄細胞を移植した WT→WT および WT→KO マウス (WT→WT: 10.1 ± 0.158 cm および WT→KO: 10.0 ± 0.112 cm) と比較して、TRPM2KO マウスの骨髄細胞を移植した KO→WT および KO→KO マウス (KO→WT: 10.8 ± 0.160 cm および KO→KO: 11.0 ± 0.126 cm) では有意に抑制された (それぞれ $P = 0.0035$ および $P = 0.0007$) (Fig. 22B)。

HE 染色下の組織学的評価において、TNBS 最終投与 2 週間目の大腸においては、WT マウスの骨髄細胞を移植した WT→KO および WT→KO マウスでは、上皮の部分的脱落、浮腫、炎症性細胞浸潤、杯細胞および陰窩の傷害などの中等度の損傷が認められた (WT→WT: 5.75 ± 0.366 および WT→KO: 6.50 ± 0.327) が、それらの変化は TRPM2KO マウスの骨髄細胞を移植した KO→WT および KO→KO マウス (KO→WT: 2.50 ± 0.189 および KO→KO: 2.13 ± 0.295) では有意に抑制された (いずれも $P < 0.0001$) (Fig. 23)。

MT 染色による線維化の組織学的評価においても、WT マウスの骨髄を移植した WT→WT および WT→KO マウスでは、粘膜層および粘膜下層に膠原繊維の沈着に特徴づけられる線維症が観察された (WT→WT: 2.75 ± 0.105 および WT→KO: 2.52 ± 0.140) が、それらの変化はいずれも TRPM2KO マウスの骨髄細胞を移植した KO→WT および KO→KO マウス (KO→WT: 0.458 ± 0.108 および KO→KO: 0.583 ± 0.151) では有意に抑制された (いずれも $P < 0.0001$) (Fig. 24)。

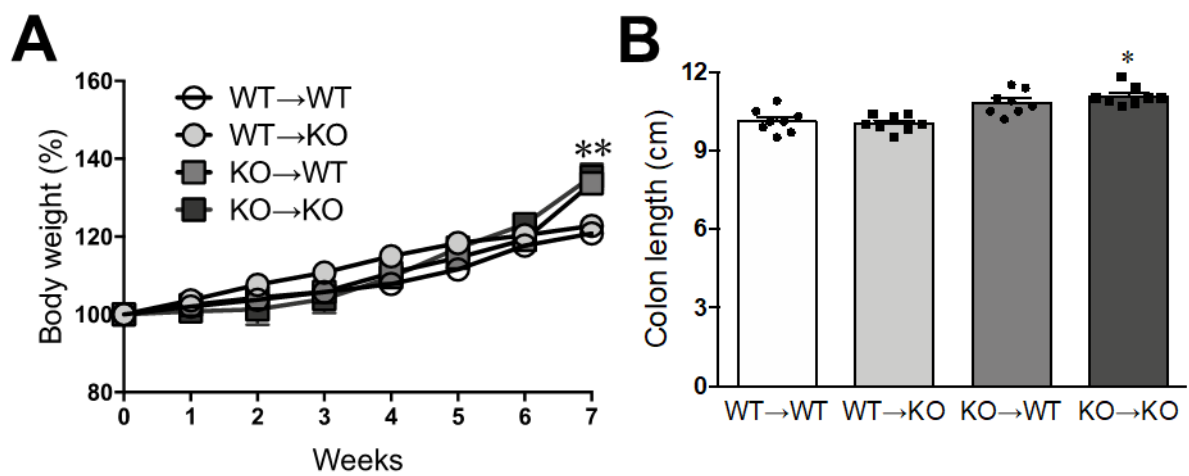


Fig. 22. Involvement of TRMP2 expressed in BM-derived hematopoietic and no-hematopoietic cells on chronic colitis-associated fibrosis induced by repeated TNBS injections. Body weight was determined weekly (A). Colon length (B) was determined 7 weeks after the onset of TNBS treatment. Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A, B). *P < 0.05 vs. WT→WT.

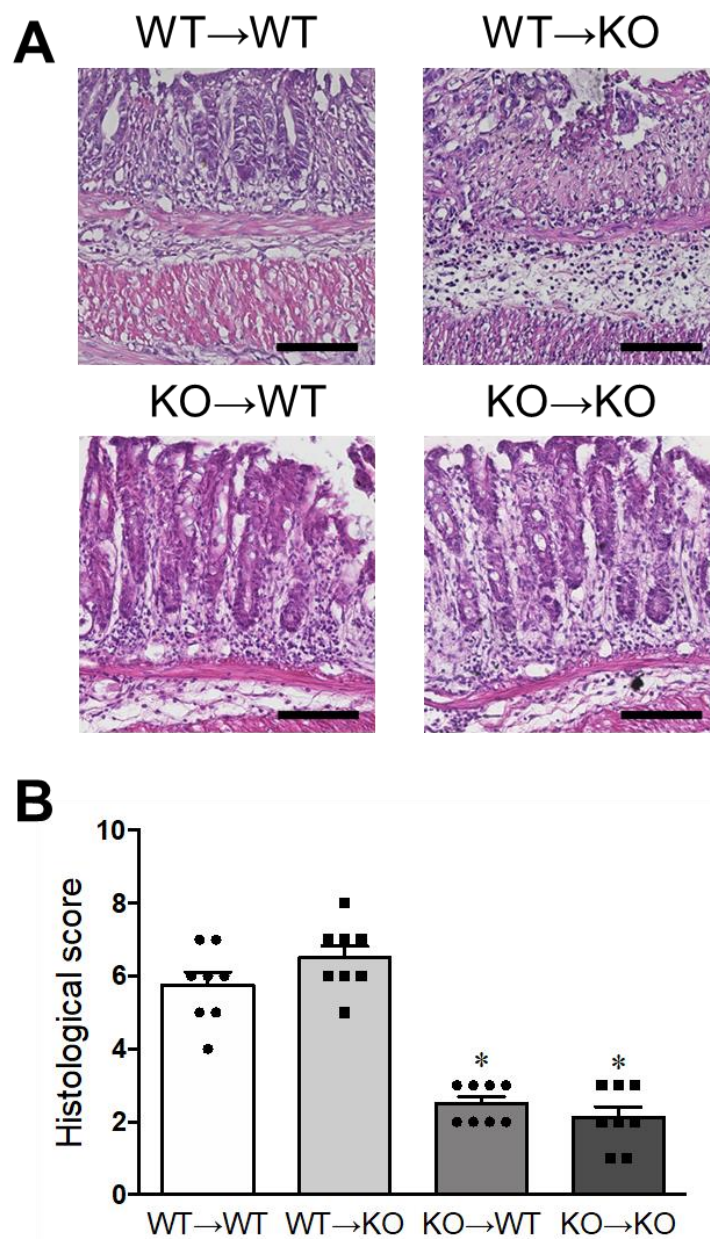


Fig. 23. Involvement of TRMP2 expressed in BM-derived hematopoietic and no-hematopoietic cells on chronic colitis-associated fibrosis induced histological damage. Representative images of HE-stained sections (A) and histological score (B) of colon tissues 7 weeks after the onset of TNBS treatment. Scale bars : 50 μ m (B). Data are presented as the mean \pm S.E.M. (n=8). Statistical significance was analyzed using a Kruskal–Wallis analysis, followed by Dunn’s multiple-comparison test (B). *P < 0.05 vs. WT→WT.

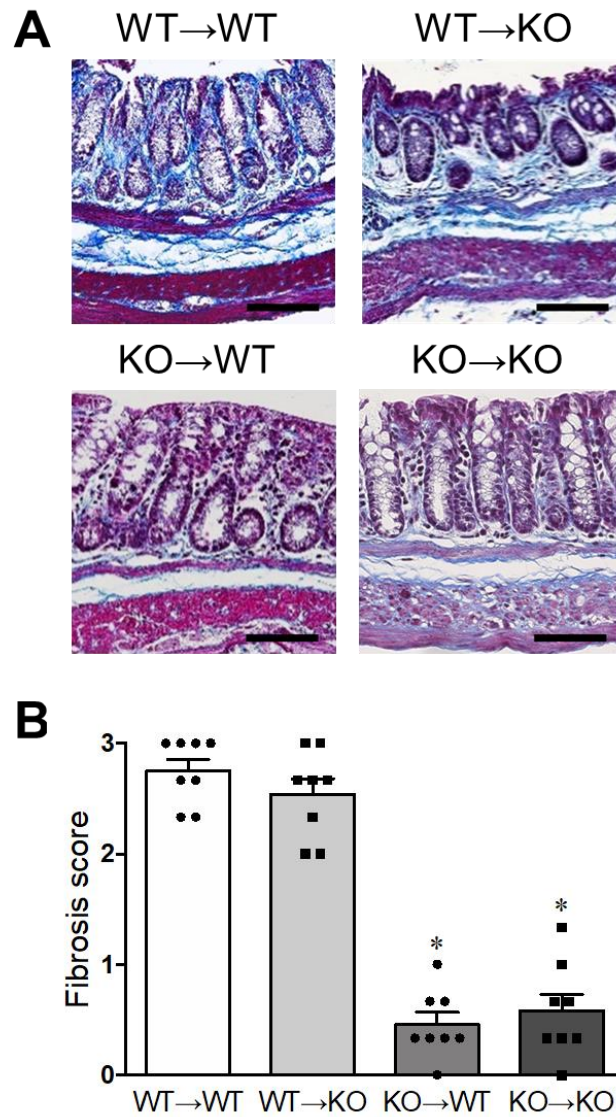


Fig. 24. Involvement of TRMP2 expressed in BM-derived hematopoietic and no-hematopoietic cells on chronic colitis-associated fibrosis induced pathogenesis of fibrosis. Representative images of MT-stained sections (A) and fibrosis score (B) of colon tissues 7 weeks after the onset of TNBS treatment. Scale bars : 50 μ m (B). Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a Kruskal–Wallis analysis, followed by Dunn’s multiple-comparison test (B). *P < 0.05 vs. WT→WT.

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

4. 骨髄分化マクロファージにおける H₂O₂ 誘発サイトカインおよびケモカイン発現および MAPK リン酸化に対する TRPM2KO の影響

急性大腸炎および大腸炎関連線維症の病態制御に関連する炎症免疫応答における TRPM2 の役割をさらに詳細に検討するため、マウスから採取した骨髄細胞をマクロファージに分化させ、*in vitro* 条件下に H₂O₂ によるサイトカインおよびケモカイン発現、ならびに各種 MAPK の活性化について WT マウスと TRPM2KO マウスで比較検討した。WT マウスの骨髄分化マクロファージに H₂O₂ (10 nM) を処置したところ、3 時間後には炎症性サイトカインである TNF- α (P < 0.0001)、IL-1 β (P < 0.0001)、ケモカインである CXCL-2 (P < 0.0001)、Th1 分化誘導に関与する IL-12a (P < 0.0001)、Th17 分化誘導に関与するサイトカインである IL-6 (P = 0.0015)、IL-23a (P = 0.0043)、Th17 分化誘導ならびに線維化因子である TGF- β (P < 0.0001)、さらに Th2 分化誘導に関与する IL-4 発現 (P = 0.0041) の顕著な増加が観察された (Fig. 25A-C および Fig. 26)。これに対して、TRPM2KO マウスの骨髄分化マクロファージでは H₂O₂ 処置によるこれらのサイトカイン発現の増加はいずれも有意に抑制された (それぞれ P < 0.0001、P < 0.0001、P < 0.0001、P = 0.0043、P = 0.0011、P < 0.0001、P = 0.0046)。TRPM2 発現も同様に H₂O₂ 処置により WT マウスの骨髄分化マクロファージでは有意に増加したが (P < 0.0001)、TRPM2KO マウスでは発現は検出されなかった (Fig. 25D)。

骨髄分化マクロファージにおける H₂O₂ 処置による MAPK の活性化について、ウェスタンブロットにより WT および TRPM2KO マウスで比較検討した。WT マウスの骨髄分化マクロファージにおける H₂O₂ 処置は、1 時間後には ERK (P = 0.0024)、JNK (P < 0.0001) および p38 MAPK (P < 0.0001) のリン酸化を有意に増加させたが、それらの増加はいずれも TRPM2KO マウスの骨髄分化マクロファージでは抑制された (それぞれ P = 0.0005、P < 0.0001 および P < 0.0001) (Fig. 27)。

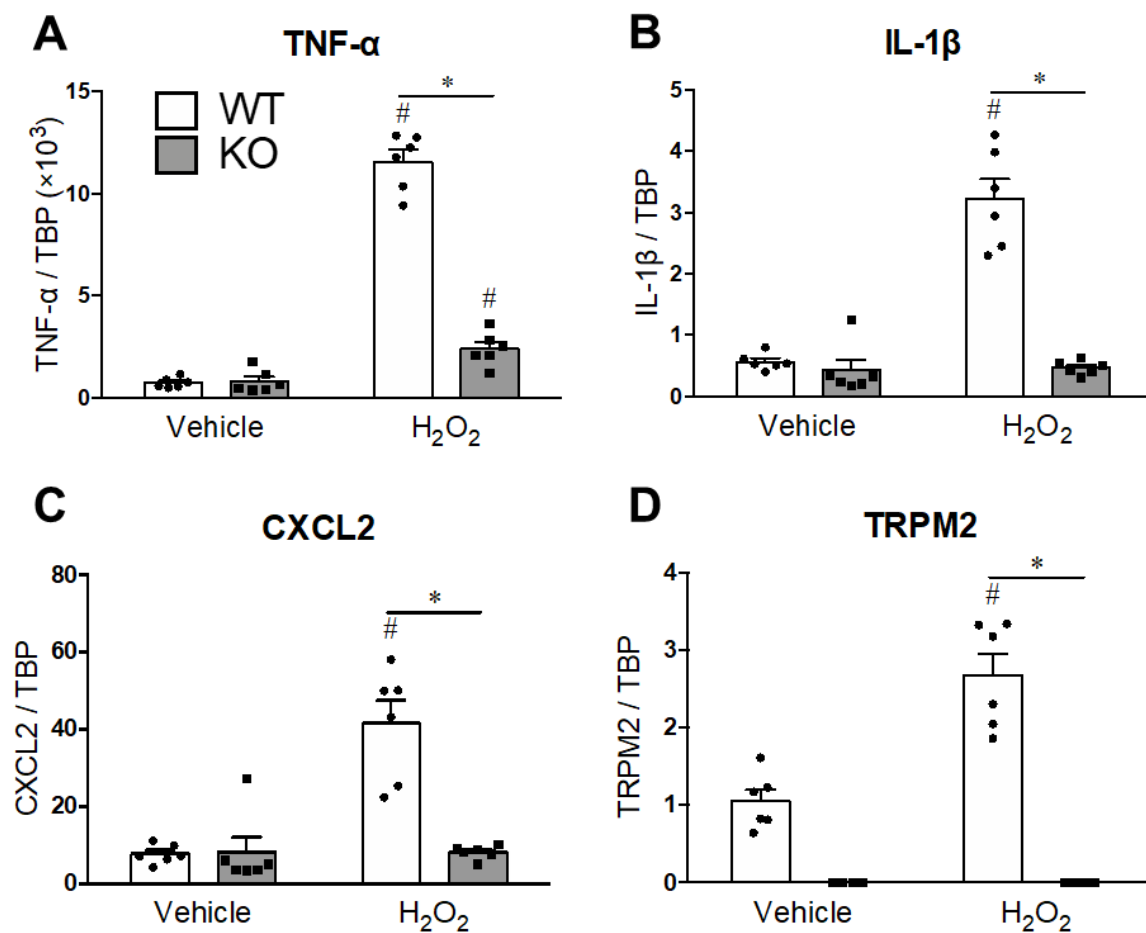


Fig. 25. Effect of TRPM2 deficiency on H₂O₂-induced upregulation of various proinflammatory cytokines/chemokine and TRPM2 in bone marrow-derived macrophages (BMDMs). The mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , CXCL2 and TRPM2 (A–D) in BMDMs stimulated with H₂O₂ 3 h after treatment. Data are presented as the mean \pm SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A–D). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. vehicle (without H₂O₂).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

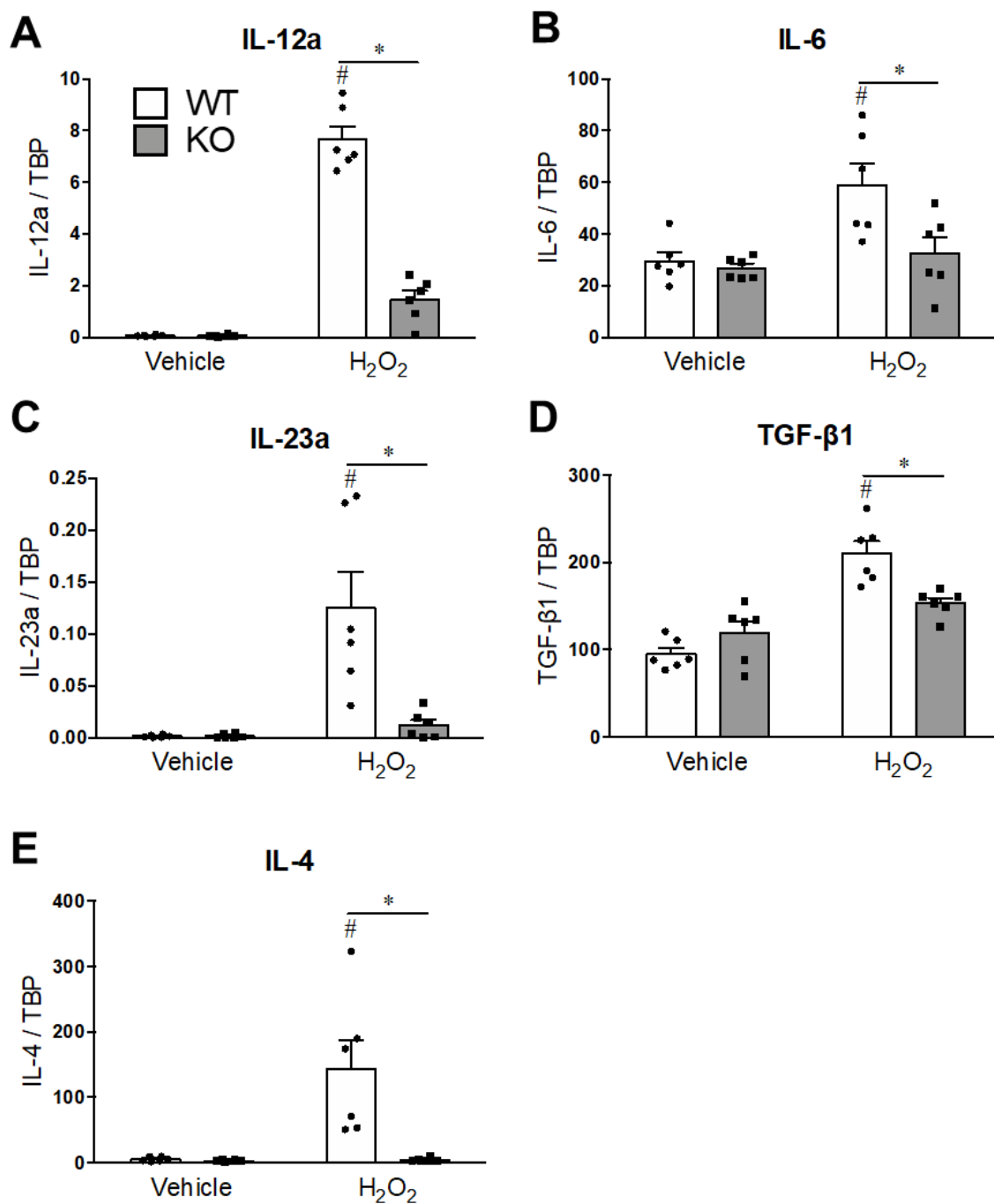


Fig. 26. Effect of TRPM2 deficiency on H₂O₂-induced upregulation of various Th1/Th2/Th17 related cytokines and TRPM2 in bone marrow-derived macrophages (BMDMs). The mRNA expression of IL-12a, IL-6, IL-23a, TGF-β1 and IL-4 (A–E) in BMDMs stimulated with H₂O₂ 3 h after treatment. Data are presented as the mean ± SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (A–E). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. vehicle (without H₂O₂).

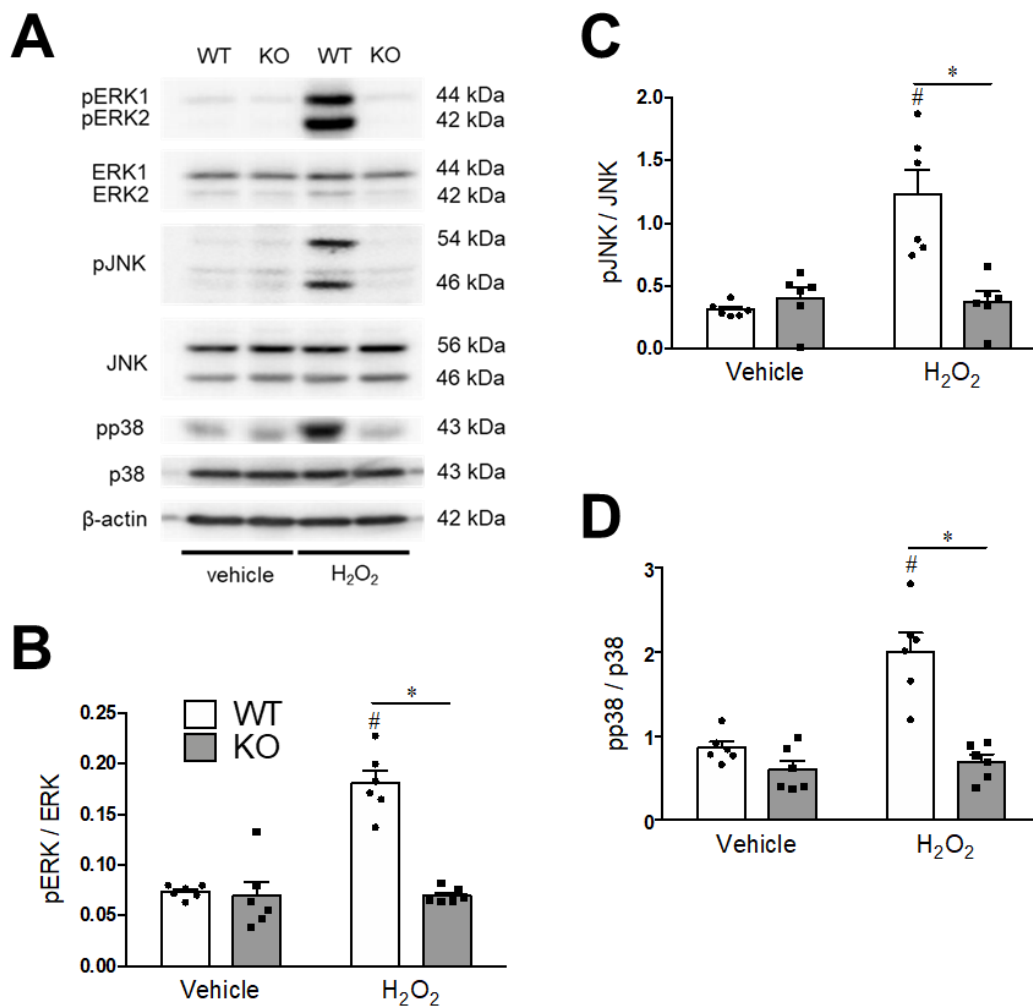


Fig. 27. Effect of TRPM2 deficiency on H₂O₂-induced upregulation of phosphorylation of MAPKs in BMDMs. ERK, JNK, and p38 MAPK phosphorylation in BMDMs stimulated with H₂O₂ 1 h after treatment. Representative images of western blotting (A) and quantitative results of densitometric analyses (B–D). Data are presented as the mean ± SEM. (n = 8). Statistical significance was analyzed using a two-way ANOVA with the Holm–Sidak test (B–D). *P < 0.05 vs. WT, #P < 0.05 vs. vehicle (without H₂O₂).

Nakamoto T., et al., *J. Pharmacol. Sci.* **2024**, 154, 18-29.

第4節 考察

第 1 章において、TNBS 単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎の病態にマクロファージなど炎症免疫細胞に発現する TRPM2 が関与すること、またその作用は Th1/Th17 免疫応答の活性化を介していることを明らかにした。これまでに、TRPM2 は種々の炎症反応への関与に加えて [64-66]、慢性期の肺においては肺胞マクロファージに発現している TRPM2 が PARP 経路を介した ADP リボース産生によって CXCL2 を産生し、肺線維症に寄与していることや [64, 65]、血管においては TRPM2 が単球接着の増強、血管炎症の促進、病変部位へのマクロファージ浸潤および平滑筋細胞遊走を促進し、動脈硬化に寄与していること [66, 67]、また腎臓においても TRPM2 が TGF- β 1 による JNK および NF- κ B の活性化させ、腎線維症に寄与していること [87] などの病態の進展増悪に関与することが報告されている。以上のように慢性期の病態である線維化に対しても TRPM2 が関与していることが、消化管以外の臓器で明らかになりつつある。そこで本章では、CD 患者で高頻度に観られる慢性期の病的線維化における TRPM2 の役割を明らかにするため、低濃度の TNBS 反復投与により誘起される大腸線維症モデルを作製し、TRPM2KO マウスを用いて検討した。

低濃度の TNBS の反復直腸内投与は、対照群と比較して体重増加が抑制されたが、その程度は WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に軽度であった。TNBS 最終投与 2 週間後には大腸の短縮が観察されたが、その程度もまた WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。TNBS の最終投与 2 週間後においては、急性大腸炎モデルの際に認められた明らかな肉眼的損傷は観察されなかったが、炎症性細胞浸潤、杯細胞および陰窩の傷害、上皮の部分的脱落などの組織学的傷害が観察され、MT 染色下では粘膜層および粘膜層に膠原線維の蓄積が認められた。さらに、病変局所では I 型コラーゲンの 1 α 鎖である COL1A1 [94-96]、細胞外基質を産生する筋線維芽細胞に発現する ACT2A [97, 98] および細胞外基質を分解するメタロプロテアーゼを阻害する TIMP1 [99] などの各種線維化マーカーの mRNA 発現の増加が認められた [100]。これらの知見は、TNBS の反復直腸内投与により大腸に慢性炎症に伴う線維化が生じていることを示唆している。これらの変化はいずれも WT マウスと比較して TRPM2KO マウスでは有意に抑制された。したがって、TRPM2 は急性大腸炎のみならず、慢性期の線維化の病態進展にも関与しているものと推察される。

TNBS の反復直腸内投与により誘起される大腸炎関連線維症の大腸においては、Th2 関連サイトカインの IL-4、IL-5、IL-13、その転写因子である GATA-3、さらには TGF- β 1 発現が増加していたが、Th1 および Th17 関連サイトカインの発現は変化が認められなかった。以前の報告においても、TNBS 誘起大腸炎の慢性期では Th2 免疫応答の活性化が生じていること [101]、また TGF- β 1 の産生増加に起因した線維症が生じていることなどが示されている [102]。TGF- β 1 は、Th17 細胞の分化に関与しているが、ヒト CD および実験動物における大腸炎関連線維症の進行に関与する線維化を促進するメディエーターとしても知られている [103]。TRPM2KO マウスでは、これら大腸炎関連線維症の大腸で観られる Th2 関連サイトカインならびに TGF- β 1 発現の増加は有意に抑制された。さらに、骨髄キメラマウスの検討において、全身の TRPM2KO マウスと同様な大腸炎関連線維症の抑制は、TRPM2KO マウスの骨髄細胞を移植した KO \rightarrow WT マウスおよび KO \rightarrow KO マウスで認められた。したがって、大腸炎関連線維

症の病態進展においても、骨髄由来細胞に発現する TRPM2 が重要な役割を演じているものと推察される。これらの結果は、骨髄由来細胞に発現する TRPM2 が急性大腸炎のみならず、慢性期の大腸炎関連線維症の病態進展にも関与していることを示唆している。TRPM2 は慢性期に観られる Th2 免疫応答および TGF- β 1 を介した線維化シグナルの活性化に寄与しているものと推察される。

マクロファージは腸管免疫系ならびに粘膜恒常性の調節において重要な役割を演じている [28]。IBD の急性期においては、マクロファージの活性化は Th1/Th17 免疫反応を促進し、病態の進展を引き起こす [29-34]。一方、慢性期においては、マクロファージは Th2 免疫応答を介して炎症の収束、組織の修復、リモデリング、線維化メディエーターの産生を促進することで、IBD の症状は軽快する [35-37] が、時にこれらが過剰に生じた際には様々な合併症の成因となる病的線維化へとつながる [36-38]。実際、マクロファージは、Th1、Th2 および Th17 免疫応答の活性化や線維化に関連する種々のサイトカインを産生する [104, 105]。本実験の病態である TNBS 誘起大腸炎では明らかになっていないが、同じ IBD の病態モデルである DSS 誘起大腸炎においてはマクロファージの浸潤は WT と TROM2KO で同程度であったにも関わらず、WT と比較して TRPM2KO で病態の悪化が抑制されていることが明らかになっている [63]。今後、TNBS 誘起急性大腸炎および大腸炎関連線維症においてもマクロファージの浸潤については詳しく検討していく必要があるが、マクロファージに発現する TRPM2 が免疫応答制御に関与している可能性が高いと推察される。そこで、マクロファージにおける各種サイトカイン発現の制御における TRPM2 の関与について、マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在化で培養することでマクロファージに分化させ、*in vitro* 条件下に検討した。WT マウスの骨髄分化マクロファージに TRPM2 活性化を引き起こす H₂O₂ を処置したところ、3 時間後には TNF- α 、IL-1 β および CXCL2 などの炎症性サイトカインやケモカインに加えて、Th1 細胞の分化に関与する IL-12a、Th17 細胞の分化に関与する IL-6、IL-23a、Th2 細胞の分化に関与する IL-4、さらには Th17 細胞の分化および線維化の促進に関与する TGF- β 1 発現がいずれも増加することを観察した。TRPM2KO マウスの骨髄分化マクロファージでは、H₂O₂ 処置によるこれらサイトカイン発現の増加はいずれも有意に抑制されたことから、マクロファージにおける TRPM2 の活性化は IL-12a、IL-6、IL-23a、IL-4 および TGF- β 1 発現の増加を引き起こすことが示唆された。すなわち、マクロファージにおける TRPM2 の活性化は、Th1、Th2 および Th17 細胞の分化や線維化シグナルの活性化に寄与しているものと推察される。一方、TRPM2 はマクロファージ以外にも T 細胞などにも発現していることが報告されている [59]。実際、TRPM2 は T 細胞における IFN- γ や IL-17 などのサイトカイン産生に対して促進的に機能していることが示されている [60]。したがって、マクロファージに加えて、T 細胞における TRPM2 もまた急性大腸炎や大腸炎関連線維症の病態進展に寄与している可能性も考えられる。

さらに本研究では、WT マウスの骨髄分化マクロファージにおける H₂O₂ 処置は、ERK、JNK および p38 MAPK のリン酸化を増加させること、またこれらリン酸化の増加もまた TRPM2KO マウスの骨髄分化マクロファージでは有意に抑制されることを観察した。ヒト単球における H₂O₂ 処置が TRPM2 活性化により Pyk2 チロシンキナーゼの活性化を介して ERK を活性化することで、CXCL2 などのケモカイン発現を引き起こすことが報告されている [53]。また、マクロファージにおけるリポ多糖および IFN- γ により引き起こされる一酸化窒素産生の増加に TRPM2 の活性化を介した ERK、JNK および p38 MAPK の活性

化が関与していること [106]、さらに TRPM2 の阻害が JNK 活性化を低下させることで、TGF- β 1 による腎線維化が抑制されることなどが報告されている [54]。Pyk2 は細胞内 Ca^{2+} に応答して、その下流の ERK、JNK、p38 MAPK などの MAPK 経路を活性化することが知られている [107]。したがって、TRPM2 が炎症時に産生される活性酸素により活性化されることで、細胞内への Ca^{2+} 流入が生じ、Pyk2 の活性化、さらにその下流の p38、JNK および ERK などの MAPK 経路の活性化が誘起され、各種サイトカインやケモカイン発現の増加が生じるものと推察される。

本研究において、急性大腸炎および大腸炎関連線維症の病変局所、さらには H_2O_2 処置後の骨髄分化マクロファージでは TRPM2 発現が増加することを観察した。同様な病変部における TRPM2 発現の増加は過去の研究においても認められているが [108]、TRPM2 発現増加の機序については不明である。この点についてはさらなる検討が必要である。

また、Th1/Th2/Th17 関連サイトカインの発現タイミングやスイッチの詳細についても明らかになっていない。Th1 への分化誘導に関わる IL-12 は Th2 免疫応答の活性化に対して抑制的に [109]、一方 Th2 への分化誘導に関わる IL-4 は Th1/Th17 免疫応答の活性化に対して抑制的に作用することが知られている [110, 111]。TNBS は Th1/Th17 免疫応答の活性化を介した大腸炎を惹起することから、急性期には Th1/Th17 免疫応答の活性化により Th2 免疫応答は抑制される。炎症が落ち着き、Th1/Th17 免疫応答が低下するに従い、Th2 免疫応答の抑制も解除され、慢性期には Th2 有意な環境に変化するもの推察される。一方、TGF- β 1 の発現増大は急性期および慢性期のいずれにおいても観察された。Th17 への分化誘導には TGF- β 1 に加えて IL-6 が関与していることから、慢性における Th2 優位な環境への変化には TGF- β 1 に加えて他のサイトカインが関与しているのかもしれない。Th1/Th17 から Th2 優位な環境への変化の機序を明らかにするには、経時的なサイトカイン発現変化を詳細に解析する必要がある。

以上本章では、TNBS 誘起大腸炎関連線維症の病態進展に TRPM2 が関与することが明らかとなった。この過程には、Th2 免疫応答ならびに TGF- β 1 を介した線維化シグナルの活性化が関与しているものと推察される。本研究において、TRPM2KO マウスで観察された TNBS 誘起大腸炎関連線維症の抑制は、急性大腸炎を抑制した結果である可能性も考えられる。すなわち、TRPM2KO マウスでは、TNBS 誘起大腸炎が抑制されたため、その後の修復反応に伴う顕著な線維化も生じなかった可能性は否定できない。しかし、マクロファージにおける TRPM2 の活性化は IL-4 や TGF- β 1 発現を増加させたことから、TRPM2 の活性化は直接的に Th2 免疫応答および線維化シグナルの活性化を引き起こす可能性も十分に考えられる。ゆえに、TRPM2 は CD における急性大腸炎に加えて、慢性期の病的線維化に起因する種々の合併症に対しても有用な治療標的であると考えられる。

小括

本章では、TNBS の反復直腸内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 の役割を明らかにするために、TRPM2KO マウスを用いて検討し、次の知見を得た。

1. TNBS 誘起大腸炎関連線維症の病態進展に TRPM2 が関与していることを明らかにした。
2. TRPM2 は炎症性サイトカインやケモカインに加えて、Th2 免疫応答および TGF- β 1 を介した線維化シグナルの活性化に関与していることを明らかにした。
3. 骨髄由来細胞に発現する TRPM2 が Th2 免疫応答および TGF- β 1 を介した線維化シグナルの活性化に関与していることを明らかにした。
4. 骨髄分化マクロファージにおいて、H₂O₂ による TRPM2 の活性化がヘルパーT 細胞の分化に関与する各種サイトカイン発現および線維化を誘起する TGF- β 1 発現を増加することを明らかにした。またその作用には MAPK キナーゼの活性化が関与している可能性が推察される。

総括

第1章では、TNBSの単回直腸内投与により誘起される急性大腸炎がTRPM2KOマウスではWTマウスと比較して有意に抑制されることを見出した。急性大腸炎の病変局所では、炎症性サイトカインやケモカインに加えて、Th1およびTh17免疫応答の活性化が生じており、これらの反応もまたTRPM2KOマウスでは有意に抑制されることを観察した。さらに、骨髄キメラマウスを用いた検討から、これらの作用はマクロファージなどの骨髄由来細胞に発現するTRPM2が関与することを明らかにした。以上の結果より、CDの急性期を模擬したTNBS単回投与により惹起される急性大腸炎の病態に骨髄由来細胞に発現するTRPM2が関与していることが判明した。この作用にはTh1およびTh17免疫応答の活性化が寄与しているものと推察される。

第2章では、TNBSの反復直腸内投与により誘起される大腸炎関連線維症がTRPM2KOマウスではWTマウスと比較して有意に抑制されることを見出した。大腸炎関連線維症の病変局所では、炎症性サイトカインやケモカインに加えて、Th2免疫応答およびTGF- β 1を介した線維化シグナルの活性化が生じており、これらの反応もまたTRPM2KOマウスでは有意に抑制されることを観察した。骨髄キメラマウスを用いた検討から、これらの反応はマクロファージなどの骨髄由来細胞に発現するTRPM2が関与することを明らかにした。さらに、骨髄分化マクロファージにおけるH₂O₂処置はTh1、Th17およびTh2分化誘導に関与するサイトカイン、線維化の促進に関与するTGF- β 1発現の増加、さらにはERK、JNKおよびp38 MAPKの活性化を誘起したが、これらの反応はいずれもTRPM2KOマウスでは有意に抑制されることを観察した。以上の結果より、CDの慢性期を模擬したTNBS反復投与により惹起される大腸炎関連線維症の病態にマクロファージなどの炎症免疫細胞に発現するTRPM2が関与することが判明した。この作用には、MAPK経路の活性化を介したTh2免疫応答およびTGF- β 1を介した線維化シグナルの活性化が寄与しているものと推察される。

第1章および第2章で得られた結果より、マクロファージなどの炎症免疫細胞に発現するTRPM2はTh1/Th17免疫応答の活性化による急性大腸炎の病態進展に加えて、慢性期にはTh2免疫応答およびTGF- β 1を介した線維化シグナルの活性化を介して大腸炎関連線維症の病態進展にも関与していることが判明した (Fig. 28)。

今後、ヒトCDの病態におけるTRPM2の役割を明らかにしていくことで、TRPM2を標的とした、急性期の大腸炎のみならず、慢性期の病的線維化に起因する合併症に対しても有効な新たな治療薬の開発に繋がることが期待される。

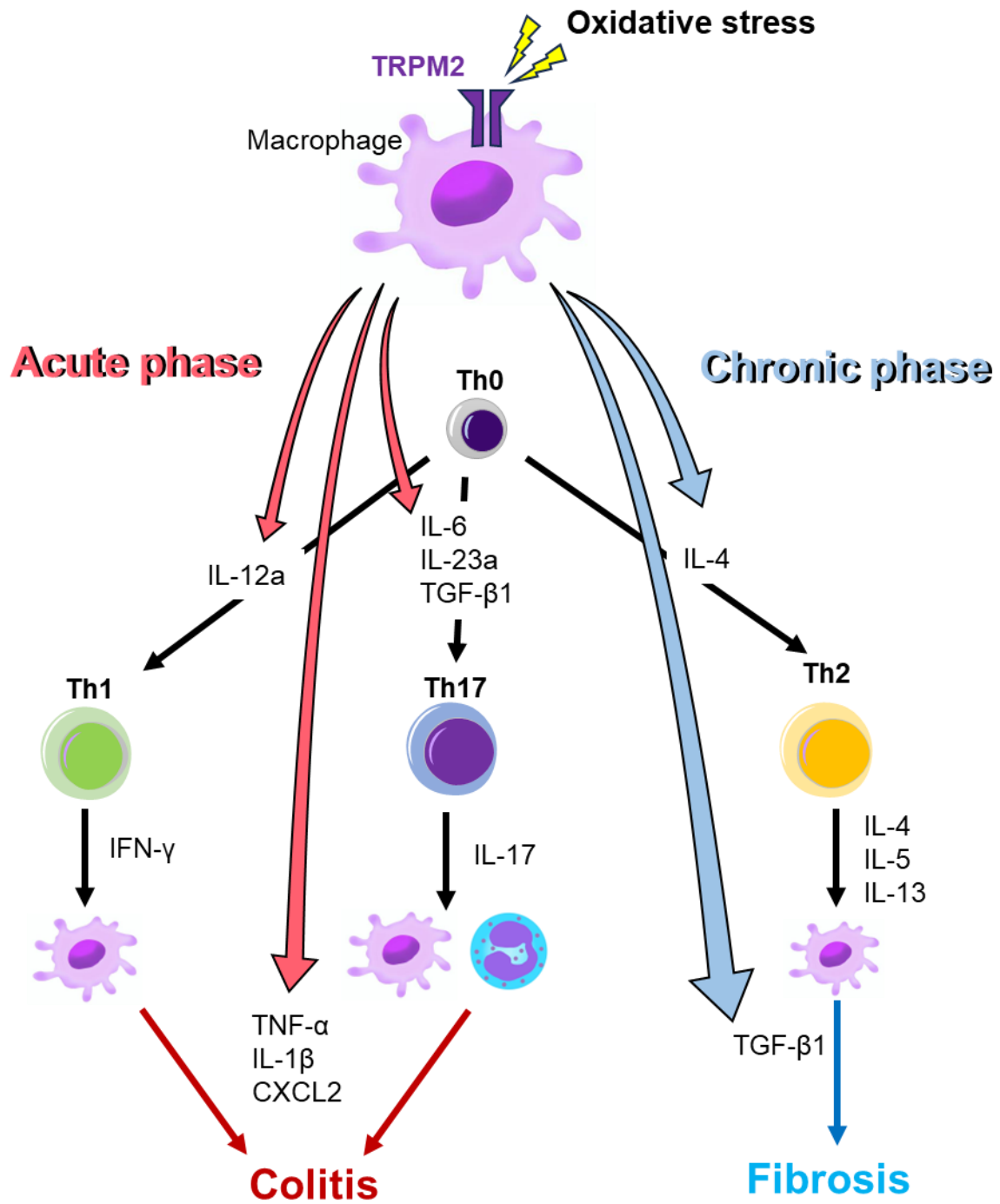


Fig. 28. Schematic representation of TRPM2 pathways in the pathogenesis of TNBS-induced acute colitis and chronic colitis-associated fibrosis.

引用文献

1. Natalie A. Molodecky, Ing Shian Soon, Doreen M. Rabi, William A. Ghali, Mollie Ferris, Greg Chernoff, Eric I. Benchimol, Remo Panaccione, Subrata Ghosh, Herman W. Barkema, Gilaad G. Kaplan. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. **2012**, 142, 46–54.
2. Buie MJ, Quan J, Windsor JW, Coward S, Hansen TM, King JA, Kotze PG, Garry RB, Ng SC, Mak JWY, Abreu MT, Rubin DT, Bernstein CN, Banerjee R, Yamamoto-Furusho JK, Panaccione R, Seow CH, Ma C, Underwood FE, Ahuja V, Panaccione N, Shaheen AA, Holroyd-Leduc J, Kaplan GG; Global IBD Visualization of Epidemiology Studies in the 21st Century (GIVES-21) Research Group; Balderramo D, Chong VH, Juliao-Baños F, Dutta U, Simadibrata M, Kaibullayeva J, Sun Y, Hilmi I, Raja Ali RA, Paudel MS, Altuwajiri M, Hartono JL, Wei SC, Limsrivilai J, El Ouali S, Vergara BI, Dao VH, Kelly P, Hodges P, Miao Y, Li M. Global Hospitalization Trends for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the 21st Century: A Systematic Review With Temporal Analyses. *Clin Gastroenterol Hepatol*. **2023**, (9), 2211-2221.
3. 難病情報センター, 令和 3 年度末特定医療費 (指定難病) 受給者証所持者数, <https://www.nanbyou.or.jp/entry/5354>
4. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. **2012**, 380, 1590-1605.
5. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. **2017**, 389, 1756-1770.
6. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*. **2019**, 12, 113-122.
7. 日本消化器病学会. 炎症性腸疾患 (IBD) 診療ガイドライン. **2020** 改訂第 2 版
8. Danese S, Mantovani A. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene*. **2010**, 29, 3313-3323.
9. Rieder F, Zimmermann EM, Remzi FH, Sandborn WJ. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut*. **2013**, 62, 1072-1084.
10. Rieder F, Fiocchi C, Rogler G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. **2017**, 152, 340-350.
11. Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet*. **2012**,

380, 1606-1619.

12. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World. J. Gastroenterol.* **2014**, 20, 6-21.
13. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol.* **1996**, 157(3), 1261-70.
14. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* **2003**, 52(1), 65-70.
15. Olsen T, Rismo R, Cui G, Goll R, Christiansen I, Florholmen J. TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation. *Cytokine.* **2011**, 56(3), 633-40.
16. Annunziato F, Santarlasci V, Maggi L, Cosmi L, Liotta F, Romagnani S. Reasons for rarity of Th17 cells in inflammatory sites of human disorders. *Semin Immunol.* **2013**, 25(4), 299-304.
17. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* **2008**, 57(12), 1682-9.
18. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Sato T, Yamazaki M, Okamoto S, Ishii H, Totsuka T, Iiyama R, Okamoto R, Ikeda M, Kurimoto M, Takeda K, Akira S, Hibi T. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology.* **2001**, 121(4), 875-88.
19. Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med.* **2009**, 15, 199-207.
20. Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine.* **2015**, 75(1), 14-24.
21. Kmiec Z, Cyman M, Slebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci.* **2017**, 62, 1-16.
22. Gui X, Li J, Ueno A, Iacucci M, Qian J, Ghosh S. Histopathological Features of Inflammatory Bowel Disease are Associated with Different CD4⁺ T Cell Subsets in Colonic Mucosal Lamina Propria. *J Crohns Colitis.* **2018**, 12, 1448-1458.

23. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. **2009**, 126(2), 177-85.
24. Cao H, Diao J, Liu H, Liu S, Liu J, Yuan J, Lin J. The Pathogenicity and Synergistic Action of Th1 and Th17 Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. **2022**, 29(5), 818-829.
25. Chen L, Ruan G, Cheng Y, Yi A, Chen D, Wei Y. The role of Th17 cells in inflammatory bowel disease and the research progress. *Front Immunol*. **2022**, 13, 1055914.
26. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut*. **2009**, 58(12), 1629-36.
27. Ogino T, Nishimura J, Barman S, Kayama H, Uematsu S, Okuzaki D, Osawa H, Haraguchi N, Uemura M, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Takeda K, Doki Y, Mori M. Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163^{low} myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. **2013**, 145(6), 1380-91.
28. Smith M A, Rahman Z F, Hayee B, Graham J S, Marks J B, D Gavin W Sewell , Palmer D P, Wilde J, Foxwell M J B, Gloger S I, Sweeting T, Marsh M, Walker P A, Bloom L S, Segal W A. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med*. **2009**, 206(9), 1883-97.
29. Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol*. **2004**, 20(2), 82-8.
30. Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. **2000**, 6(1), 21-33.
31. Rogler G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*. **2004**, 20(4), 311-7.
32. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol*. **2016**, 16(2), 102-11.
33. Hale JS, Youngblood B, Latner DR, Mohammed AU, Ye L, Akondy RS, Wu T, Iyer SS, Ahmed R. Distinct memory CD4⁺ T cells with commitment to T follicular helper- and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity*. **2013**, 38(4), 805-17.
34. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. **2008**, 8, 958-969.

35. Gordon S, Martinez O F. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. **2010**, 32(5), 593-604.
36. Shouval DS, Biswas A, Goettel JA, McCann K, Conaway E, Redhu NS, Mascanfroni ID, Adham ZA, Lavoie S, Ibourk M, Nguyen DD, Samsom JN, Escher JC, Somech R, Weiss B, Beier R, Conklin LS, Ebens CL, Santos FSMG, Ferreira AF, Sherlock M, Bhan AK, Müller W, Mora JR, Quintana FJ, Klein C, Muise AM, Horwitz BH, Snapper SB. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity*. **2014**, 40(5), 706-19.
37. Lin Y, Yang X, Yue W, Xu X, Li B, Zou L, He R. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. *Cell Mol Immunol*. **2014**, 11, 355-366.
38. C Montell, G M Rubin. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. **1989**, 2(4), 1313-23.
39. David E Clapham. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. **2003**, 426(6966), 517-24.
40. Matsuura H, Sokabe T, Kohno K, Tominaga M, Kadowaki T. Evolutionary conservation and changes in insect TRP channels. *BMC Evol Biol*. **2009**, 9, 228.
41. Feng Qian., Konrad Noben-Trauth. Cellular and molecular function of mucolipins (TRPML) and polycystin 2 (TRPP2). *Pflugers Arch*. **2005**, 451(1), 277-85.
42. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*. **1998**, 58(7), 1515-20.
43. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*. **2001**, 61(9), 3760-9.
44. Grimm C, Kraft R, Schultz G, Harteneck C. Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine [corrected]. *Mol Pharmacol*. **2005**, 67(3), 798-805.
45. Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Düfer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J. Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol*. **2008**, 10(12), 1421-30.
46. Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V. Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem*. **2003**, 278(33),

30813-20.

47. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol.* **2003**, 13(13), 1153-8.
48. Launay P, Cheng H, Srivatsan S, Penner R, Fleig A, Kinet JP. TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science.* **2004**, 306(5700), 1374-7.
49. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* **2006**, 25(9), 1804-15.
50. Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature.* **2005**, 438(7070), 1022-5.
51. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* **2002**, 108(5), 705-15.
52. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature.* **2007**, 448(7150), 204-8.
53. Fujiwara Y, Daniel L Minor Jr. X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J Mol Biol.* **2008**, 383(4), 854-70.
54. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell.* **2002**, 1, 163-73.
55. Peralta-Leal A, Rodríguez-Vargas JM, Aguilar-Quesada R, Rodríguez MI, Linares JL, de Almodóvar MR, Oliver FJ. PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Biol Med.* **2009**, 47, 13-26.
56. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* **2001**, 411(6837), 595-9.
57. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress

- and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch.* **2005**, 451(1), 212-9.
58. Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**, 109, 6745-6750.
 59. Beck A, Kolisek M, Bagley LA, Fleig A, Penner R. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes. *FASEB J.* **2006**, 20(7), 962-4.
 60. Melzer N, Hicking G, Gobel K, Wiendl H. TRPM2 cation channels modulate T cell effector functions and contribute to autoimmune CNS inflammation. *PloS. one.* **2012**, 7, 47617.
 61. Naziroglu M. Activation of TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion by NADPH Oxidase and Protein Kinase C Molecular Pathways: a Patch Clamp Study. *J Mol Neurosci.* **2017**, 61, 425-435.
 62. Ding R, Yin YL, Jiang LH Reactive. Oxygen Species-Induced TRPM2-Mediated Ca²⁺ Signalling in Endothelial Cells. *Antioxidants.* **2021**, 10(5), 718.
 63. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y. TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med.* **2008**, 14, 738-747.
 64. Yonezawa R, Yamamoto S, Takenaka M, Kage Y, Negoro T, Toda T, Ohbayashi M, Numata T, Nakano Y, Yamamoto T, Mori Y, Ishii M, Shimizu S. TRPM2 channels in alveolar epithelial cells mediate bleomycin-induced lung inflammation. *Free Radical Biol Med.* **2016**, 90, 101-113.
 65. Wang Y, Chen L, Wang K, Da Y, Zhou M, Yan H, Zheng D, Zhong S, Cai S, Zhu H, Li Y. Suppression of TRPM2 reduces renal fibrosis and inflammation through blocking TGF-beta1-regulated JNK activation. *Biomed Pharmacother.* **2019**, 120, 109556.
 66. Zhang Y, Ying F, Tian X, Lei Z, Li X, Lo CY, Li J, Jiang L, Yao X. TRPM2 Promotes Atherosclerotic Progression in a Mouse Model of Atherosclerosis. *Cells.* **2022**, 11(9), 1423.
 67. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* **2009**, 15, 341-352.
 68. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, Neurath MF.

- Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc.* **2017**, 12(7), 1295-1309.
69. Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C, Chakravarti S. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. *Gastroenterology.* **2003**, 125, 1750-1761.
 70. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* **2006**, 6(4), 329-33.
 71. Weltman JK, Karim AS. Interleukin-5: a proeosinophil cytokine mediator of inflammation in asthma and a target for antisense therapy. *Allergy Asthma Proc.* **1998**, 19(5), 257-61.
 72. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res.* **2001**, 2(2), 71-9.
 73. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* **2004**, 202, 175-90.
 74. Stark JM, Tibbitt CA, Coquet JM. The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation. *Front Immunol.* **2019**, 10, 2318.
 75. Matsuoka K, Inoue N, Sato T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kishi Y, Sakuraba A, Hitotsumatsu O, Ogata H, Koganei K, Fukushima T, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut.* **2004**, 53(9), 1303-8.
 76. Naziroglu M. Activation of TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion by NADPH Oxidase and Protein Kinase C Molecular Pathways: a Patch Clamp Study. *J Mol Neurosci.* **2017**, 61, 425-435.
 77. Theiss AL, Vijay-Kumar M, Obertone TS, Jones DP, Hansen JM, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. Prohibitin is a novel regulator of antioxidant response that attenuates colonic inflammation in mice. *Gastroenterology.* **2009**, 137, 199-208.
 78. Utsumi D, Matsumoto K, Amagase K, Horie S, Kato S. 5-HT3 receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *Br J Pharmacol.* **2016**, 173, 1835-1849.
 79. Matsumoto K, Deguchi A, Motoyoshi A, Morita A, Maebashi U, Nakamoto T, Kawanishi S, Sueyoshi M, Nishimura K, Takata K, Tominaga M, Nakahara T, Kato S. Role of transient receptor potential vanilloid subtype 4 in the regulation of azoymethane/dextran sulphate sodium-induced

- colitis-associated cancer in mice. *Eur J Pharmacol.* **2020**, 867, 172853.
80. Utsumi D, Matsumoto K, Tsukahara T, Amagase K, Tominaga M, Kato S. Transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential ankyrin 1 contribute to the progression of colonic inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: Links to calcitonin gene-related peptide and substance P. *J Pharmacol Sci.* **2018**, 136(3), 121-132.
 81. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology.* **1997**, 112(4), 1169-78.
 82. Hölttä V, Klemetti P, Sipponen T, Westerholm-Ormio M, Kociubinski G, Salo H, Räsänen L, Kolho KL, Färkkilä M, Savilahti E, Vaarala O. IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* **2008**, 14(9), 1175-84.
 83. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mudter J, Galle PR, Bhan A, Autschbach F, Sullivan BM, Szabo SJ, Glimcher LH, Blumberg RS. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med.* **2002**, 195(9), 1129-43.
 84. Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H, Shinoda K, Tumes DJ, Okamoto Y. Th2 Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* **2017**, 35, 53-84.
 85. Alfredsson J, Wick MJ. Mechanism of fibrosis and stricture formation in Crohn's disease. *Scand J Immunol.* **2020**, 92(6), e12990.
 86. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」(久松班)、令和 4 年度分担研究報告書、潰瘍性大腸炎・クローン病 診断基準・治療指針、令和 5 年 3 月作成
 87. Kurata Y, Tanaka T, Cernecka H, Eitner F, Nangaku M. TRPM2 Plays a Minor Role in AKI and Kidney Fibrosis. *Kidney360.* **2022**, 3, 153-157.
 88. Yoo JH, Ho S, Tran DH, Cheng M, Bakirtzi K, Kukota Y, Ichikawa R, Su B, Tran DH, Hing TC, Chang I, Shih DQ, Issacson RE, Gallo RL, Fiocchi C, Pothoulakis C, Koon HW. Anti-fibrogenic effects of the anti-microbial peptide cathelicidin in murine colitis-associated fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* **2015**, 1, 55-74.
 89. Kurahara LH, Hiraishi K, Hu Y, Koga K, Onitsuka M, Doi M, Aoyagi K, Takedatsu H, Kojima D, Fujihara Y, Jian Y, Inoue R. Activation of Myofibroblast TRPA1 by Steroids and Pirfenidone

- Ameliorates Fibrosis in Experimental Crohn's Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* **2018**, *5*, 299-318.
90. Assouvie A, Daley-Bauer LP, Rousselet G. Growing Murine Bone Marrow-Derived Macrophages. *Methods Mol Biol.* **2018**, 1784, 29-33.
 91. Rios FJ, Touyz RM, Montezano AC. Isolation and Differentiation of Murine Macrophages. *Methods Mol Biol.* **2017**, 1527, 297-309.
 92. Manzanero S. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol Biol.* **2012**, 844, 177-81.
 93. Noguchi T, Hidaka K, Kobayashi S, Matsumoto K, Yoshioka M, Hu X, Maloney DJ, Yang SM, Kato S. A quinazoline-based bromodomain inhibitor, CN210, ameliorates indomethacin-induced ileitis in mice by inhibiting inflammatory cytokine expression. *Drug Dev Res.* **2021**, *82*, 1235-1246.
 94. Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-an update. *Inflamm Bowel Dis.* **1995**, *1*(3), 220-7.
 95. Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, Bercik P, Van Kampen C, Galeazzi F, Sime PJ, Gaudie J, Collins SM. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2005**, *289*(1), 116-28.
 96. Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S, Gay R. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology.* **1988**, *94*(2), 257-65.
 97. Sandbo N, Taurin S, Yau DM, Kregel S, Mitchell R, Dulin NO. Downregulation of smooth muscle alpha-actin expression by bacterial lipopolysaccharide. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*(2), 262-9.
 98. Löfdahl M, Kaarteenaho R, Lappi-Blanco E, Tornling G, Sköld MC. Tenascin-C and alpha-smooth muscle actin positive cells are increased in the large airways in patients with COPD. *Respir Res.* **2011**, *12*(1), 48.
 99. Orphanides C, Fine LG, Norman JT. Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int.* **1997**, *52*(3), 637-47.
 100. Johnson LA, Rodansky ES, Sauder KL, Horowitz JC, Mih JD, Tschumperlin DJ, Higgins PD. Matrix stiffness corresponding to strictured bowel induces a fibrogenic response in human colonic fibroblasts. *Inflamm Bowel Dis.* **2013**, *19*, 891-903.

101. Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, Engelhard VH and Okusa MD. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* **2007**, 178, 5899-5911.
102. Giuffrida P, Caprioli F, Facciotti F, Di Sabatino A. The role of interleukin-13 in chronic inflammatory intestinal disorders. *Autoimmun Rev.* **2019**, 18, 549-555.
103. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis.* **2001**, 7, 16-26.
104. Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2011**, 51, 267-288.
105. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci.* **2018**, 19(6), 1801.
106. Miyake T, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S. TRPM2 contributes to LPS/IFN-gamma-induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* **2014**, 444, 212-217.
107. Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Grönroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K, Dikic I. Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* **1999**, 274(21), 14893-901.
108. Matsumoto K, Takagi K, Kato A, Ishibashi T, Mori Y, Tashima K, Mitsumoto A, Kato S, Horie S. Role of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels in visceral nociception and hypersensitivity. *Exp Neurol.* **2016**, 285, 41-50.
109. Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine.* **2015**, 75, 14-24.
110. Mitchell RE, Hassan M, Burton BR, Britton G, Hill EV, Verhagen J, Wraith DC. IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation. *Sci Rep.* **2017**, 7, 11315.
111. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* **2006**, 7, 937-45.

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬物治療学分野 加藤伸一教授ならびに林周作 准教授、安田浩之 助教に心から御礼申し上げます。

本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 芦原英司 教授ならびに薬理学分野 田中智之 教授に心から御礼申し上げます。

学部、博士課程を通して8年もの間、本研究の遂行にあたり、研究に対する懇切丁寧な指導、助言をはじめとした多大なご協力をいただきました同志社女子大学 薬学部 医療薬学科 病態生理学研究室 松本健次郎 教授に厚く御礼申し上げます。

博士課程の研究生活において、温かく応援していただき、いついかなる時も支えてくださった徳山 珧雅 学士、村山有希 学士、そして実験にご協力頂いた川中啓希、末永美菜子、倉本翔平、安藤 香奈子、山中勇人、辻佑加、小山樹那、木下真緒、佐藤陽、東浦拓真、牧野裕佳の諸氏をはじめとした京都薬科大学 薬物治療学分野研究員の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、博士課程へと進む私の意志を理解し、6年間の学部生活に加えて4年間の大学院生活をも支えていただいた両親に心から深く感謝いたします。