HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大腸炎モデルの発症におけるSTAT1を介したLy6c陽性マクロファージの誘導に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	木井, 修平
Description	配架番号：2739
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15240号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88259
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KII_Shuhei_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　木井修平

学 位 論 文 題 名

大腸炎モデルの発症におけるSTAT1を介したLy6c陽性マクロファージの誘導に関する研究(Studies on the STAT1-mediated induction of Ly6c-expressing macrophages in the onset of an experimental colitis model)

【背景と目的】　炎症性腸疾患は、再発と寛解を繰り返しながら腸管に慢性的な炎症を起こす疾患である。クローン病や潰瘍性大腸炎が代表疾患であり、本邦で患者数は増加傾向にある。炎症性腸疾患の発症や増悪には遺伝・腸内細菌・環境など多因子が関わっていると考えられているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。炎症性腸疾患の治療は多岐にわたり、生物学的製剤である抗TNF-α 抗体が治療薬として使用されるようになって治療成績は改善した。一方、耐性や二次無効例の問題があり、新規治療法の開発も望まれている。本研究ではTNF-α とは異なる標的分子としてSTAT1とその下流のシグナル伝達経路に着目した。一般にSTAT1は、細胞の増殖や分化、活性化あるいはアポトーシスを誘導し、様々な宿主免疫応答を調節する転写活性化因子であることが知られている。これまでに炎症性腸疾患患者の大腸組織において STAT1 が活性化し、特に単球や好中球でリン酸化した STAT1 が多く発現していたとの報告があるが、炎症性腸疾患の病態発症と STAT1 の活性化に関わるメカニズムについては報告が少ない。本研究において、STAT1シグナル伝達経路と炎症性腸疾患の発症・増悪との関与について明らかにすることを目的として、マウス急性大腸炎モデルを構築し、STAT1 シグナル伝達経路と腸炎の発症・増悪との関与について検証を行った。
【材料と方法】　野生型 C57BL/6マウスおよび同系のSTAT1欠損マウスに3%（w/v）DSS溶液を給水瓶から 7 日間自由摂取させることで大腸炎を発症させ、その後は通常の水を飲水させた。DSS 溶液を投与後の 10 日間の体重推移を評価し、7 日目に大腸組織や血液を採取して、腸管の長さ、組織学的スコア、大腸組織における免疫細胞、定量PCR法による遺伝子発現レベルの評価を行った。大腸組織における免疫細胞中のLy6c発現細胞についてセルソーターを使用して単離し、定量PCR法による遺伝子発現レベルの評価を行った。またSTAT1の下流標的分子を探索、同定するために、急性大腸炎モデルで腸炎を発症した野生型C57BL/6マウスにCCR2阻害剤を投与し、病態に及ぼす影響を検討した。さらに *in vitro* 実験にて野生型 C57BL/6マウスおよび同系のSTAT1欠損マウスの脾臓の細胞および腹腔滲出細胞を採取し、各種IFNの添加によるLy6c陽性細胞の誘導とその形質についてフローサイトメトリーにて解析、評価した。潰瘍性大腸炎患者の臨床検体を使用し、大腸組織における各種炎症・免疫担当細胞の浸潤とSTAT1の活性化を免疫組織化学染色により検討した。
【結果】　DSS 誘発急性大腸炎モデルの大腸組織において、IL-6、TNF-α 産生に加えて、IFN-α/β の誘導とSTAT1の活性化を確認した。STAT1欠損マウスでは野生型マウスに比べて体重減少、腸管短縮の程度が改善し、腸炎の病態が改善していた。DSS投与7日目でのマ

ウス血清中の IL-6、TNF-α は STAT1 欠損マウスにおいて有意に低下し、大腸の組織学的スコアは STAT1 欠損マウスで有意に低下していた。大腸炎を発症しているマウスの大腸組織に浸潤する免疫細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、Ly6c 高発現細胞の集積が野生型マウスに比べて STAT1 欠損マウスでは減弱していた。Ly6c 高発現細胞では Ly6c 中発現細胞に比べて IL-6、CCL2、CCR2 の遺伝子発現が増強する一方で Ly6c 中発現細胞では Ly6c 高発現細胞に比べて TNF-α および IFN-α/β の遺伝子発現が増強していた。*in vitro* 実験において、野生型マウス由来の脾臓細胞と腹腔滲出細胞を IFN-α、あるいは IFN-β で刺激した結果、Ly6c 発現細胞が有意に誘導され、IFN-γ で軽度誘導された。一方、IFN-α/β 刺激による Ly6c 発現細胞の誘導は STAT1 欠損マウスの脾臓の細胞および腹腔滲出細胞においては微量であった。急性大腸炎モデルにおいて野生型マウスに CCR2 阻害剤を投与したところ、コントロールに比べて大腸炎の病態は有意に改善した。潰瘍性大腸炎患者の大腸組織において STAT1 の活性化が認められるとともに、CCR2 を発現している CD68 陽性マクロファージの集積が確認された。

【考察】潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患の発症メカニズムの解明は、病態の改善、治療において重要である。本研究より、大腸炎の発症において STAT1 シグナル伝達経路の活性化が関与する可能性が示唆された。また本研究で、大腸炎を発症している大腸組織に STAT1 依存的に Ly6c 発現細胞が集積することが明らかとなり、さらに上流分子として、I 型 IFN が関与している可能性も示唆された。ケモカインレセプターである CCR2 の阻害実験結果から、急性大腸炎モデルにおいて STAT1 の活性化を介した CCL2-CCR2 の発現を通して、Ly6c を発現するマクロファージが炎症組織に誘導され、大腸炎の発症に関与する可能性が考えられた。さらに Ly6c 高発現細胞群では Ly6c を中程度発現する細胞群に比べて IL-6、CCL2、CCR2 の遺伝子発現が増強している一方で、Ly6c を中程度発現する細胞群では Ly6c 高発現細胞群に比べて TNF-α および IFN-α/β の遺伝子発現が高値であることが明らかとなった。本研究データから、ウイルス感染や細菌感染などの刺激により上皮細胞や繊維芽細胞などの免疫細胞より産生された IFN-α/β に加えて、Ly6c 陽性細胞により産生される I 型 IFN により STAT1 が活性化され、さらに Ly6c 発現マクロファージが誘導される可能性が考えられた。Ly6c を中程度発現する細胞群は IFN-α/β を産生し、Ly6c 高発現細胞をパラクライン機構により誘導するとともに、Ly6c 高発現細胞は CCL2 の産生を介して、オートクライン機構により自身に発現する CCR2 に結合し、炎症反応の亢進に関与することが考えられた。さらに Ly6c 高発現細胞群は IL-6 を産生して炎症反応を惹起するとともに、Ly6c を中程度発現する細胞は TNF-α に加え IFN-α/β を産生して Ly6c 高発現細胞群を誘導することが考えられた。これらの 2 種類の機能の異なる Ly6c 陽性マクロファージの誘導とそれらの協働により、大腸組織における炎症の惹起、病態の増悪、持続に関与することが考えられた。

【結論】　本研究において、IFN-α/β による STAT1 の活性化を介して機能の異なる 2 種類の Ly6c 発現マクロファージが誘導され、大腸炎の発症、病態の悪化に関与している可能性が示唆された。本研究で得られた知見により STAT1 シグナル伝達経路とその下流標的による炎症性腸疾患の発症メカニズムの解明と新たな治療法の開発への貢献が期待されると考えられる。