



Blockade of the fractalkine-CX3CR1 axis ameliorates experimental colitis by dislodging venous crawling monocytes

久保井, 良和

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3437号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490193>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Blockade of the fractalkine-CX3CR1 axis ameliorates
experimental colitis by dislodging venous crawling monocytes

フラクタルカイン-CX3CR1 経路の遮断は、静脈上を匍匐する単球を
遊離させることにより実験的大腸炎を改善する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学分野 新規治療探索医学

(指導教員： 今井俊夫 特命教授)

久保井 良和

学位論文の内容要旨

【背景】クローン病 (Crohn's disease, CD) や潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) などの炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease, IBD) は、消化管における再発性の慢性炎症を特徴とする疾患である。IBD では、炎症性サイトカインの産生亢進に伴う過剰な炎症反応により、腸粘膜障害が引き起こされる。IBD の病態は、炎症部位への白血球の過剰な動員・集積、末梢血中の単球やマクロファージの活性化の亢進と関連している。IBD は、主に単球やマクロファージから産生される腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン 6 (IL-6)、インターロイキン 1 β (IL-1 β) などの炎症性サイトカインにより病態が増悪することが報告されている。とりわけ、TNF- α の抗体等の阻害剤は、IBD の症状を緩和するために広く用いられている。しかし、抗体等による TNF- α の阻害は、全身の炎症・免疫応答をも抑制してしまうことが課題となっている。そのため、過剰な腸炎の炎症を局所的に抑制しうる薬剤の開発が望まれている。

ケモカインとその受容体は、細胞種特異的な白血球の効率的な組織への輸送に中心的な役割を果たしている。その中でも、フラクタルカイン (FKN) /CX3CL1 は、活性化した内皮細胞や上皮細胞で発現が誘導され、膜結合型ケモカインとして細胞膜上に局在して接着分子として機能すること、また膜近傍でメタロプロテアーゼの切断により可溶性ケモカインとして細胞遊走活性を示すことが報告されている。一方、FKN の受容体である CX3CR1 は、主に末梢血中の単球、特に血管内腔上を徘徊する単球集団に強く発現することが知られている。

実際に、CD および UC 患者の病変部では FKN の発現が上昇しており、IBD 患者由来の腸管血管内皮細胞を *in vitro* で TNF- α およびインターフェロン γ で処理すると、FKN の発現が著しく増加することが報告されている。また、IBD 患者の末梢血では、CX3CR1 を高発現する単球が増加しており、これら単球は TNF- α 、IL-6、IL-1 β を強く発現することが示されている。以上の報告から、FKN は、CX3CR1 を高発現する単球の炎症粘膜への浸潤を介して、IBD の病態形成に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかしながら、炎症粘膜内の血管内腔上での単球の挙動や IBD の病態形成への寄与は、明らかになっていない。

【目的】マウス大腸炎モデルにおける FKN-CX3CR1 系の役割、特に大腸炎症部位の血管内腔上における CX3CR1 高発現単球の挙動と性状、およびこれら単球の病態形成への関与を明らかにする。

【方法】オキサゾロン誘発大腸炎 (OXA-IBD) モデルおよび CD45RA⁻ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎 (T cell transfer-IBD) モデルを用いて、抗 FKN 抗体の薬理効果を検討した。大腸組織での FKN 発現と CX3CR1 陽性細胞の局在は、免疫組織染色を用いて解析した。炎症性サイトカイン等の発現は、RT-PCR を用いて定量した。大腸炎症部位の血管の走行

と血管内腔への白血球の集積は組織透明化により、大腸炎症部位の血管内腔上での単球の動態は、二光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* ライブイメージングにより解析した。

【結果】抗 FKN 抗体の投与によって、OXA-IBD モデルと T cell transfer-IBD モデルのいずれにおいても、体重減少、便性状スコア、炎症細胞浸潤、大腸の短縮や肥厚の改善が認められた。OXA-IBD モデルでは、大腸病変部位の血管で FKN の発現が顕著に上昇していた。大腸病変部位では、炎症性サイトカインやケモカインなどの mRNA の発現上昇、CX3CR1 陽性マクロファージ数の増加、血管走行の異常および静脈血管内腔上での単球の著しい集積が認められ、これらは抗 FKN 抗体投与によりに減少した。また、病変部の静脈血管内腔上に集積した単球は、炎症性サイトカインやケモカインを強く発現していた。これら集積した単球は、静脈血管内皮上を匍匐する性質を有するパトローリング単球（CD115 陽性 Gr-1 陰性）であり、抗 FKN 抗体投与により速やかに血管内腔上から遊離・排除された。

【結論】抗 FKN 抗体は、IBD モデル病変部の血管内腔上を匍匐して炎症性サイトカインやケモカインを強く発現する単球を静脈血管内腔上から引きはがすことで、病態を改善することが示された。FKN-CX3CR1 系の阻害は、従来のサイトカインを阻害する薬剤とは異なり、炎症部位局所の血管内腔上の匍匐単球を除去する新たな機構により、IBD 治療の新たな選択肢となることが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	乙 第 2182 号	氏 名	久保井 良和
論 文 題 目 Title of Dissertation	フラクタルカイン・CX3CR1 経路の遮断は、静脈上を匍匐する単球を遊離させることにより実験的大腸炎を改善する Blockade of the fractalkine-CX3CR1 axis ameliorates experimental colitis by dislodging venous crawling monocytes		
審 査 委 員 Examiner	主 査 南 康 博 Chief Examiner 副 査 小 川 正 歩 Vice-examiner 副 査 久 保 亮 治 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

クローン病 (Crohn's disease, CD) や潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) などの炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease, IBD) は、消化管における再発性の慢性炎症を特徴とする疾患である。IBD では、炎症性サイトカインの産生亢進に伴う過剰な炎症反応により、腸粘膜障害が引き起こされる。IBD の病態は、炎症部位への白血球の過剰な動員・集積、末梢血中の単球やマクロファージの活性化の亢進と関連している。IBD は、主に単球やマクロファージから産生される腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン 6 (IL-6)、インターロイキン 1 β (IL-1 β) 等の炎症性サイトカインにより病態が増悪することが報告され、TNF- α の抗体等の阻害剤は、IBD の症状を緩和するために広く用いられている。一方、抗体等による TNF- α の阻害は、全身の炎症・免疫応答をも抑制してしまうため、過剰な腸炎の炎症を局所的に抑制しうる薬剤の開発が望まれている。

ケモカインとその受容体は、細胞種特異的な白血球の効率的な組織への輸送に中心的な役割を果たしている。特に、フラクタルカイン (FKN) /CX3CL1 は、活性化した内皮細胞や上皮細胞で発現が誘導され、膜結合型ケモカインとして細胞膜上に局在して接着分子として機能することや膜近傍でメタロプロテアーゼによる切断で可溶性ケモカインとして細胞遊走活性を示すことが報告されている。一方、FKN の受容体である CX3CR1 は、主に末梢血中の単球、特に血管内腔上を匍匐する単球集団に強く発現している。

実際、CD、UC 患者の病変部では FKN の発現が上昇しており、IBD 患者由来の腸管血管内皮細胞を *in vitro* で TNF- α およびインターフェロン γ で処理すると、FKN の発現が著しく増加する。また、IBD 患者の末梢血では、CX3CR1 を高発現する単球が増加しており、これら単球は TNF- α 、IL-6、IL-1 β を強く発現することが示されている。以上から、FKN は、CX3CR1 を高発現する単球の炎症粘膜への浸潤を介して、IBD の病態形成に重要な役割を果たすことが示唆されるが、炎症粘膜内の血管内腔上での単球の挙動や IBD の病態形成への寄与は不明な点が多い。

そこで、本研究ではマウス大腸炎モデルにおける FKN-CX3CR1 系の役割、特に大腸炎症部位の血管内腔上における CX3CR1 高発現単球の挙動と性状、および病態形成への関与を解析した。オキサゾロン誘発大腸炎 (OXA-IBD) モデルおよび CD45RA⁻ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎 (T cell transfer-IBD) モデルを用いて、抗 FKN 抗体の薬理効果を検討した。大腸組織での FKN 発現と CX3CR1 陽性細胞の局在は、免疫組織染色法により、また炎症性サイトカイン等の発現は、RT-PCR を用いて定量した。大腸炎症部位の血管の走行と血管内腔への白血球の集積は組織透明化により、大腸炎症部位の血管内腔上での単球の動態は、二光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* ライブイメージングにより解析した。

抗 FKN 抗体の投与によって、OXA-IBD モデルと T cell transfer-IBD モデルのいずれにおいても、体重減少、便性状スコア、炎症細胞浸潤、大腸の短縮や肥厚の改善が認められた。OXA-IBD モデルでは、大腸病変部位の血管で FKN の発現が顕著に上昇し、大腸病変部位では炎症性サイトカインやケモカインなどの mRNA の発現上昇、CX3CR1 陽性マクロファージ数の増加、血管走行の異常および静脈血管内腔上での単球の著しい集積が認められ、これらは抗 FKN 抗体投与により減少した。また、病変部の静脈血管内腔上に集積した単球は炎症性サイトカインやケモカインを強く発現し、静脈血管内皮上を匍匐する性質を有するパトリローリング単球 (CD115 陽性 Gr-1 陰性) であり、抗 FKN 抗体投与により速やかに血管内腔上から遊離・排除された。

本研究は、マウス大腸炎モデルを用いて、FKN-CX3CR1 系の役割、特に大腸炎症部位の血管内腔上における CX3CR1 高発現単球の挙動・性状および病態形成への関与を解析したものである。その結果、抗 FKN 抗体が、IBD モデル病変部の血管内腔上を匍匐して炎症性サイトカインやケモカインを強く発現する単球を静脈血管内腔上から遊離させることにより病態を改善することを実証した点において、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。