

NewsLetter Vol.20 No.1

奨励賞受賞 | 第55回日本消化器免疫学会総会

腸管粘膜傷害におけるプロスタグランジン輸送蛋白(Slco2a1)の役割の検討

中田理恵子¹ 細見 周平¹ 奥田 博朗¹ 古瀬 味澄¹ 杉田奈央子¹ 西田 裕¹ 鏑谷 成弘¹
鎌田 紀子¹ 山上 博一¹ 谷川 徹也¹ 渡辺 俊雄¹ 中村 吉伸² 中西 猛夫² 藤原 靖弘¹

¹大阪市立大学大学院医学研究科 消化器内科学 / ²金沢大学 医薬保健研究域 薬学系

背景・目的：非特異性多発性小腸潰瘍症 (CEAS)の疾患遺伝子として、*SLCO2A1*の変異が報告され (Umeno J. et al. *PLOS Genetics* 2015), その発現・機能の低下が病因であると推定されている。しかし、*SLCO2A1*機能低下による腸炎発症メカニズムは未だ明らかとなっておらず、その治療法も確立されていない。*SLCO2A1*とは、prostaglandin E₂ (PGE₂)のトランスポーター (PGT)をコードする遺伝子で、細胞外に放出されたPGE₂は、PGTから細胞内に再取り込みされて不活化される。またPGE₂は腸管粘膜においては、特にEP4を介した粘膜保護作用・腸炎抑制作用があることや (Kabashima K. *J Clin Invest* 2002), COX阻害剤である非ステロイド性抗炎症薬の投与がPGE₂産生を阻害して胃・小腸・大腸にびらんや潰瘍を引き起こすこと (Higuchi K. et al. *J Gastroenterol* 2009)が報告されている。しかし、CEASではPGTの機能低下からPGE₂の濃度上昇が予想され、これらの報告と矛盾があることから、本研究では、*Slco2a1*欠損マウスを用いて、*Slco2a1*の腸管粘膜傷害における役割を明らかにすることを目的とした。

方法：*Slco2a1*の全身性ノックアウトマウス (*Slco2a1*^{-/-}マウス)と、*Slco2a1*^{fllox/fllox}マウスと *Villin-cre*^{Tg/wt}マウスを交配して作出した腸管上皮特異的ノックアウトマウス (*Slco2a1*^{ΔIEC}マウス)において、腸管における表現型を解析した。コントロールとして、*Slco2a1*^{-/-}マウスはB6マウス (Wtマウス)を、*Slco2a1*^{ΔIEC}マウスでは*Slco2a1*^{fllox/fllox}マウスを使用した。次に、各マウスに3.5% dextran sulfate sodium (DSS)水溶液を7日間自由飲水投与し、体重変化、組織学的腸炎スコアの評価、real-time RT-PCRによるmRNA発現の解析を行った。また、PGE₂濃度はELISA法にて測定した。細胞外に放出したPGE₂の測定には、腸管 explant culture 24時間培養後の上清を用い、また細胞内PGE₂の測定には、インドメタシンを含んだリン酸緩衝液中で大腸組織をモジネート

したものを用いて、PGE₂濃度を測定した。

結果：*Slco2a1*^{-/-}マウスと*Slco2a1*^{ΔIEC}マウスの表現型の解析では、4~20週で野生型マウスと比較し、体重変化には差はなく、HE染色においても自然発症の小腸炎・大腸炎は認めなかった。また8週齢マウスの粘膜のmRNA発現の解析でも、*Il-1β*, *Tnf-α*などの炎症性サイトカイン発現に変化は認めなかった。*Slco2a1*を全身性または腸管上皮特異的にノックアウトしても、自然発症腸炎は起こらなかったことから、潰瘍症の発症には2次的因子が関与する可能性が考えられた。そこで、これらノックアウトマウスを用いて、DSS誘発性腸炎モデルにおける*Slco2a1*の役割を検討した。DSS自由飲水後の体重減少率は、野生型マウスと比較して*Slco2a1*^{ΔIEC}マウスで軽減され、*Slco2a1*^{-/-}マウスでは増悪した (図1-a)。HE染色における組織学的腸炎スコアも、野生型マウスと比較して*Slco2a1*^{ΔIEC}マウスでは

低く、*Slco2a1*^{-/-}マウスでは高かった (図1-b)。腸管における炎症性サイトカインについては、*Il-1β*, *Tnf-α*, *Il-6*のmRNA発現が*Slco2a1*^{-/-}マウスでday 3, day 7と徐々に増加し、野生型マウスに比較して有意に高値を示した (図1-c)。また細胞内のPGE₂の濃度は*Slco2a1*^{-/-}マウスと野生型マウスで差を認めなかったが、細胞内のPGE₂の濃度は*Slco2a1*^{-/-}マウスで有意に高値を示した (図2-a)。P_{gts2}で上昇は認めなかったものの、*Slco2a1*^{-/-}マウスにおいて*Hpgd*のmRNA発現は有意に低下しており (図2-b), PGE₂の輸送・代謝の低下が、組織内のPGE₂貯留に関与していることが示唆された。

結論：*Slco2a1*欠損のみでは自然発症腸炎を認めなかったことから、潰瘍症の発症には2次的因子が関与することが示唆された。DSS誘発性腸炎において、*Slco2a1*は腸管恒常性維持に重要な因子であることが明らかとなったが、*Slco2a1*の腸管上皮特異

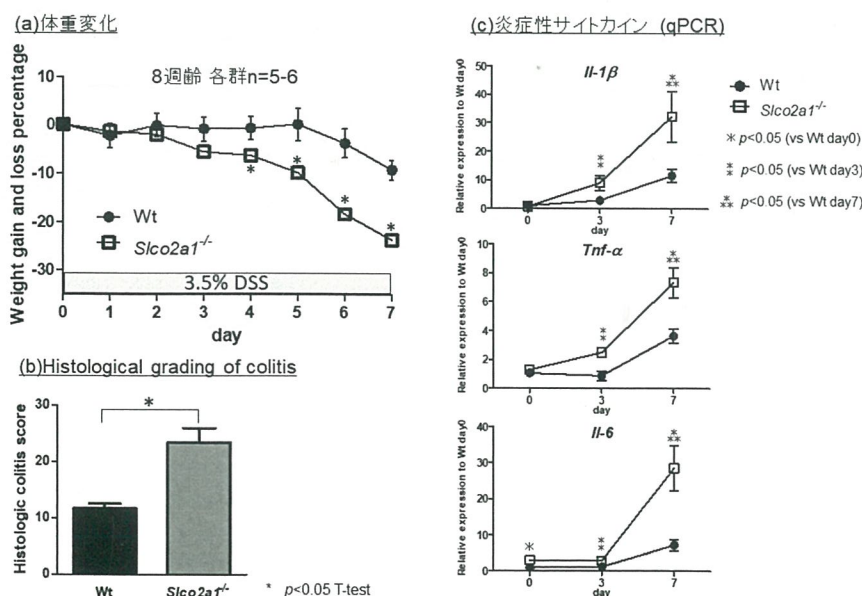
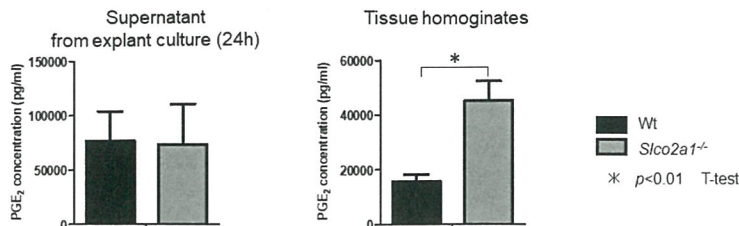


図1 *Slco2a1*^{-/-}マウスにおけるDSS腸炎モデルの評価

(a)PGE₂ (ELISA) colon, 8週齢 各群n=5-6



(b)プロスタグランジン関連分子 (qPCR)

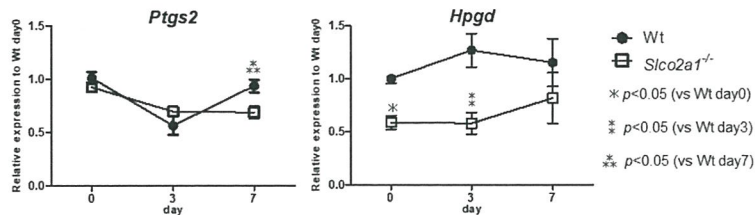


図2 Slco2a1^{-/-}における DSS 腸炎モデルでの PGE₂ の濃度変化についての検討

的ノックアウトマウスでは腸炎悪化を認めなかったことから、腸管上皮以外の細胞におけるSlco2a1が炎症制御や組織修復に重要であることが示唆された。またSlco2a1の全身性ノックアウトにおいて、PGE₂の輸送や代謝の障害を認め、炎症増悪の原因になる可能性が考えられた。

このたび第55回日本消化器免疫学会総会におきまして、栄えある奨励賞をいただきまして身にあまる光栄と深く感謝いたします。選出いただきました先生方、学会員の皆様に厚く御礼申し上げます。またこのような賞をいただきましたのも、日頃より藤原教授、細見先生にご指導いただきました賜物であり、この場をお借りして感謝申し上げます。今後もこの受賞を励みに、精進して参りたいと思いますので、ご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。(中田理恵子)

奨励賞受賞 | 第55回日本消化器免疫学会総会

炎症性腸疾患におけるプロスタシン(Prss8)の機能解析

杉谷 義彦¹ 西田 淳史¹ 森田 康大¹ 米倉 伸彦¹ 今井 隆行¹ 酒井 滋企¹
西野 恭平¹ 今枝 広丞¹ 稲富 理¹ 馬場 重樹² 杉本 光繁³ 安藤 朗¹

¹滋賀医科大学 消化器内科 / ²滋賀医科大学 栄養治療部 / ³滋賀医科大学 光学医療診療部

目的：潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される炎症性腸疾患は、再燃と寛解を繰り返す慢性炎症性疾患である。炎症性腸疾患の病態については、遺伝的素因や食事などの環境素因が関与すると考えられており、腸内細菌叢や消化管の過剰な免疫応答が発症の要因と考えられている。プロスタシン(Prss8)は、1994年に米国のJulie Chaoらのグループがヒト精液より精製した分子量40 kDaのトリプシン様酵素活性をもつセリンプロテアーゼであり、皮膚、膀胱、および肝臓などで抗炎症作用があることが報告されている。大腸においてPrss8は、上皮Naチャネルの活性化やtight junctionなどのバリア機能に関与すると報告されている。Keppnerらの報告において、Prss8変異ラットを用いた検討では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎が、対照群と比較してPrss8変異マウスで腸炎の増悪を認めた。しかしながら、大腸上皮Naチャネルの活性化やtight junctionに関連する蛋白の発現については、Prss8変異群と対照群で有意差は認められず、その機序は不明であった。そこで、我々は、実験腸炎モデルを用いて、腸炎に対するPrss8の効果とその機序を解析し、炎症性腸疾患の病態におけるPrss8の関与について検討することを目的とした。

方法：健康人と炎症性腸疾患患者の大腸粘膜におけるPrss8 mRNAの発現をreal-time PCR法で検討した。次に大腸組織に

おけるPrss8の発現を免疫組織化学染色法を用いて検討した。腸炎におけるPrss8の機能を解析するため、Prss8^{flax/flax}マウスとVillin-Creマウスを交配させ腸管上皮特異的Prss8欠損マウス(Prss8^{ΔIEC})を作製し、DSSを用いて腸炎を誘導した。腸炎の重症度を体重変化、腸管長、組織学的所見を用いて評価した。ヒト大腸上皮細胞株HT-29細胞を用いて、大腸上皮細胞におけるPrss8の機能を検討した。

結果：大腸粘膜におけるPrss8 mRNAの発現は、健康人と比較して活動期潰瘍性

大腸炎および活動期クローン病で有意な低下が認められた。免疫組織化学染色法を用いた検討では、Prss8の発現は大腸上皮細胞に認められた。さらに、活動期潰瘍性大腸炎及び活動期クローン病患者では、健康人と比較して大腸上皮細胞におけるPrss8の発現の低下が認められた(図1)。DSS腸炎の重症度の比較では、体重減少率、Disease activity index、および腸管重量/腸管長比は、コントロールマウスと比較して、Prss8^{ΔIEC}マウスでは有意に高い結果であった。また、組織学的所見とHistological

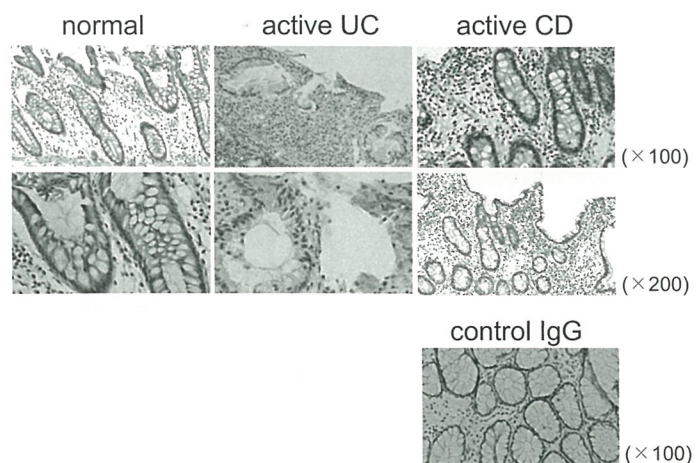
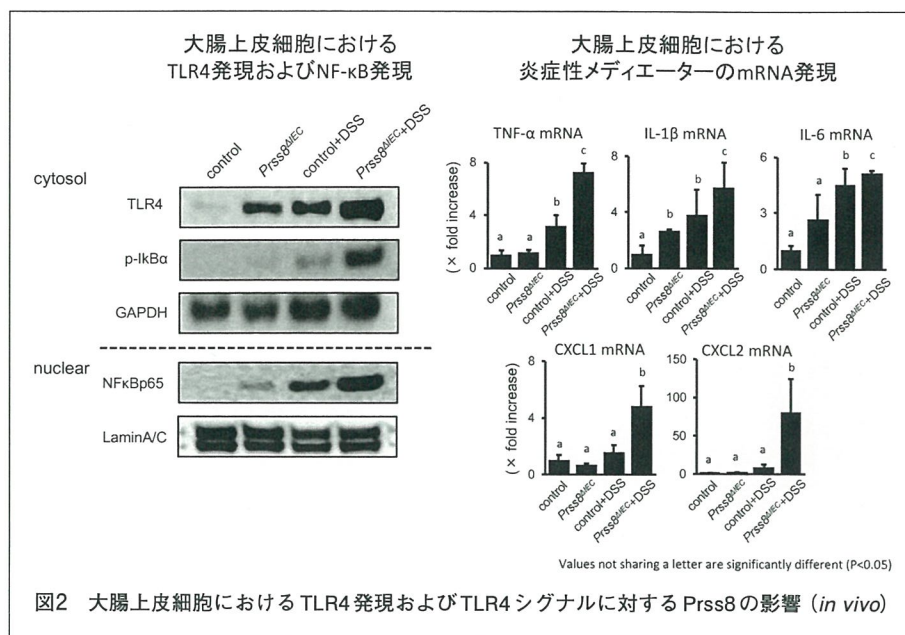


図1 IBD 患者の大腸粘膜における Prss8 の発現



scoreにおいても、Prss8^{ΔIEC}マウスは、コントロールマウスと比較して、腸炎の増悪が認められた。

Prss8^{ΔIEC}マウスの腸炎増悪の機序を解析するにあたり既報より、肝臓において Prss8 は、Toll-like receptor (TLR) 4 の発現を抑制し、門脈から肝臓へ流入する lipopolysaccharide (LPS) や飽和脂肪酸などのリガンドによって惹起される過剰な炎症反応を予防していることを示していることから、大腸上皮細胞における TLR4 の発現を検討した。HT-29 細胞を用いた immunoblot 法による検討を行ったところ、Prss8 siRNA 導入細胞では、control siRNA 導入細胞と

比較して、TLR4 の発現上昇が認められた。また、Prss8 siRNA 導入細胞では control siRNA 導入細胞と比較して、LPS 刺激による炎症性サイトカイン (TNF-α, IL-1β, IL-6) 及びケモカイン (CXCL1, CXCL2) の有意な発現上昇が認められた。実際に、コントロールマウスと比較して Prss8^{ΔIEC}マウスにおいて、大腸上皮細胞における TLR4 の発現が増強していた。また、DSS 腸炎においても、コントロールマウスと比較して Prss8^{ΔIEC}マウスで TLR4 の発現上昇が認められた。また、TLR4-NF-κB 経路の下流の細胞内シグナル分子である phospho-IkBα の発現および核内転写因子である NF-

kBp65 の核内移行を immunoblot 法を用いて検討したところ、いずれも DSS 腸炎において、コントロールマウスと比較して、Prss8^{ΔIEC}マウスでは、その発現上昇が認められた。さらに、大腸組織より単離した上皮細胞における炎症性メディエーターの mRNA 発現も、DSS 腸炎において、コントロールマウスと比較して Prss8^{ΔIEC}マウスで炎症性メディエーターの mRNA 発現上昇が認められた (図2)。

結論：炎症性腸疾患患者の大腸粘膜で Prss8 の発現低下が認められ、炎症性腸疾患の病態に関与する可能性が考えられた。腸内細菌、特にグラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分である LPS を認識する TLR4 は、TLR4-NF-κB 経路において、大腸の炎症に関わっているが、大腸上皮細胞の Prss8 が、TLR4 の発現制御を介した腸炎抑制作用を有する可能性が示唆され、炎症性腸疾患の病態への関与が考えられた。今後、Prss8 の腸炎に対する効果の解析をすすめて、炎症性腸疾患の治療の可能性について検討していきたい。

この度は第55回日本消化器免疫学会総会において、学術奨励賞を賜り、大変嬉しく存じます。会長の渡辺守先生をはじめ、関係の諸先生方及びスタッフの皆様には厚く御礼を申し上げます。また、日頃よりご指導頂いております安藤教授、西田先生をはじめ、滋賀医科大学内科の各先生方にこの場をお借りして、改めて感謝の意を表したいと思います。今回の受賞を励みに日々の研鑽を積んでいきたいと存じます。(杉谷義彦)

奨励賞受賞 | 第55回日本消化器免疫学会総会

潰瘍性大腸炎の青黛による新規治療におけるメカニズム解明

吉松 裕介 寺谷 俊昭 三上 洋平 筋野 智久 種本 俊 野村 絵奈
大野 恵子 杉本 真也 南木 康作 水野 慎大 長沼 誠 金井 隆典

慶應義塾大学医学部 内科学教室 (消化器)

背景：潰瘍性大腸炎 (UC) は大腸の慢性炎症を特徴とする再燃寛解を繰り返す難病であり、本邦では若年層を中心に増加傾向にある。多くの UC 治療薬の開発により制御可能な症例は増えたが、既存治療抵抗例や不効例、高額な医療費など、依然として多くの問題が存在している。我々は UC 患者に対する新規治療法の確立として、古来より中国で慢性炎症性疾患に対して利用されてきた安価な生薬である青黛に着目した。青黛の有用性を科学的に実証するため、多施設二重盲検ランダム化比較試験 (RCT)¹⁾ を行った。我々の先行研究²⁾ で実証した有効量 2 g/日をベースに、プラセボ、0.5 g, 1 g, 2 g の 4 群に振り分け、それぞれの投与

量で青黛を 8 週投与し、安全性・有効性について比較した。主要評価項目の治療 8 週における臨床的奏効率 (ITT 解析) は 0.5~2.0 g/日の青黛は 70~81% とプラセボに比して有意に高い有効性を示し、粘膜治癒も高率であった。安全性についても青黛内服患者のうち 15% で軽度の肝障害を認めたがいずれも内服継続下ないし試験終了後に自然軽快した。このように、RCT により青黛の UC 患者に対する短期的 (8 週間) な安全性、有効性を示した。また、同研究において健常者および UC 患者の便を用いて腸内細菌叢の解析を行った。健常者、青黛内服前、内服後の便を比較したところ、主座標解析において、有意に腸内細菌叢に変化を

認めた。

また、属レベルでの検討では、*Bifidobacterium* や *Bacteroides* などの菌で青黛内服により UC 患者の腸内細菌叢が健常者に近づくように回復することが分かった。このことから腸内細菌叢を介した腸炎改善効果の可能性も一つとして考えられるが、青黛の腸炎改善効果における有効成分および作用機序は明らかではなく、全国的にみると、本研究とは別に、青黛長期内服例を中心に肺動脈性肺高血圧症をはじめとした有害事象が複数例報告されており、我々はその薬効メカニズムの検討を実施した。

方法・結果：まず、青黛の成分解析を行ったところ、インジゴ、インジルピンをはじめ

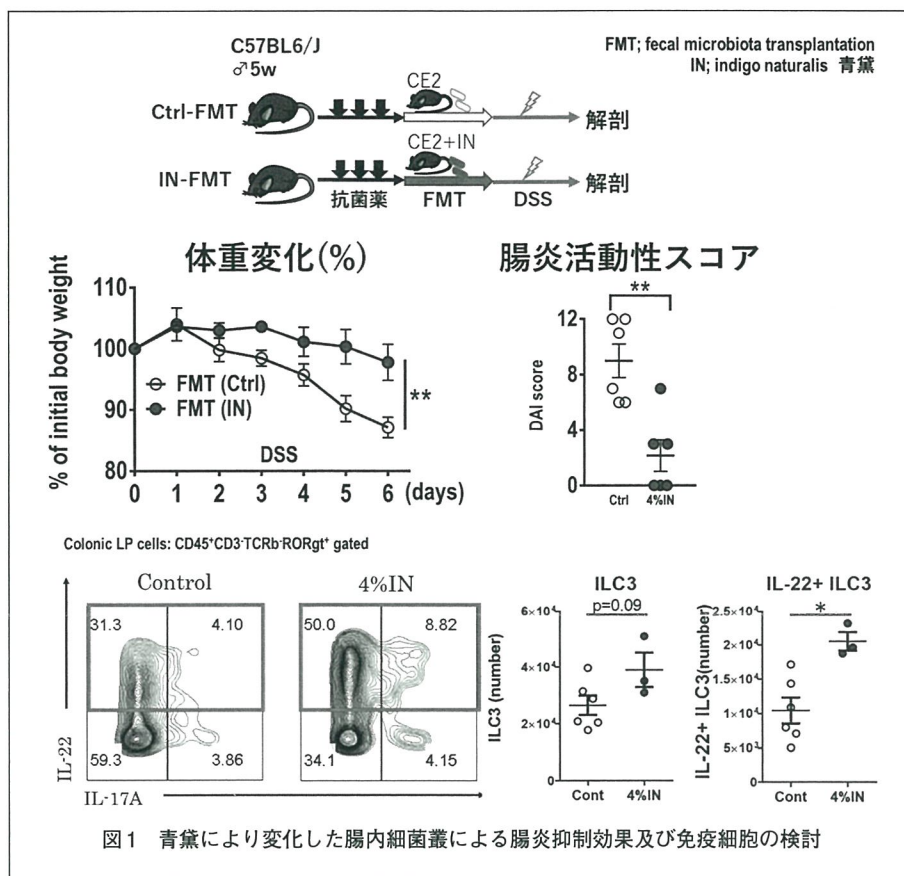


図1 青黛により変化した腸内細菌叢による腸炎抑制効果及び免疫細胞の検討

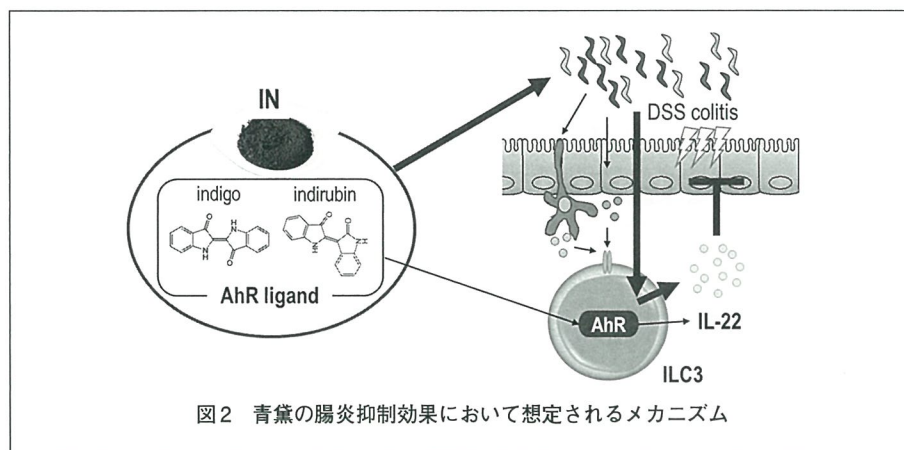


図2 青黛の腸炎抑制効果において想定されるメカニズム

めとする芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor; AhR) のリガンドが多く含有されていた。AhR リガンドは、group 3 innate lymphoid cell (ILC3) からの IL-22 産生を介して粘膜治癒を促すことが知られているため、青黛の ILC3 に対する作用を検討した。

コントロール食、4%青黛食を3週間給餌させたマウスにDSSを投与したところ、青黛は体重、腸炎活動性、組織学的にいずれにおいてもマウスDSS腸炎を抑制する効果を有するとともに大腸粘膜固有層 (colonic lamina propria; cLP) 特異的にIL-22産生性のILC3 (CD45+Lin-⁻Thy1+RORγt+) の数を誘導することを示した。さらに、青黛主成分の1つでAhRリガンドであるインジゴについても青黛同様にマウスDSS腸炎を抑制した。一方、未処置マウスに青黛を投与したところcLPにおいてILC3の変化を認めな

かった。ILC3の分化誘導およびサイトカイン産生には腸内細菌が関与していることが知られていることから、次に我々は、青黛による腸内細菌の変化による腸炎抑制効果の可能性を検討した。抗菌薬を投与した状態で、前述同様に青黛を摂餌させてDSS腸炎モデルを用いて検証したところ、青黛の腸炎抑制効果がキャンセルされた。そこで、コントロール食と青黛食投与マウスの便について16S rRNAメタゲノム解析により腸内細菌叢を比較したところ、主座標解析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA) において両群間で腸内細菌叢の有意な変化を認めた。また属レベルでの検討では *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などの菌で変化を認めた。そこで、コントロール食、4%青黛食を3週間摂餌させたマウスの便を、抗菌薬で無菌状態にしたマウスに移植した糞便移植 (Fecal Microbiota Transplantation;

FMT) モデルを作成し、DSSを投与したところ、青黛食投与マウスの便を移植した群は、コントロール食投与マウスの便を移植した群と比較して、体重、腸炎活動性においてDSS腸炎を有意に改善した (図1)。また、その際の免疫細胞を検証したところ、ILC3 (CD45+CD3-TCRb-RORγt+) は増加傾向で、また、IL-22産生ILC3は有意に増加していた。このことから、青黛により変化した腸内細菌によりILC3が増加している可能性を考えた。

結語：本検討より、青黛は、腸内細菌叢を変化させることにより、その腸内細菌が ILC3 に働きかけてIL-22産生を促し、腸炎抑制効果を有するのではないかと考えた (図2)。

考察：UCに対する腸内細菌を用いた治療の有用性に関しては、既にいくつかの報告がある。まず、本邦での臨床試験³⁾においては、単回の単ドナーの便を用いて行ったFMTにおいて、UC病態への有効性や便中の菌叢の変化は認められなかった。一方で、複数ドナーの混合便を40回FMTした海外のRCT⁴⁾では臨床的な有効性およびFMTによる便中の菌叢の変化が示されている。移植便には善玉菌と悪玉菌が混在しており、単ドナーからではなかなか治療効果が得られないこと、単回投与では菌叢の定着が難しいことが想定された。我々は、青黛内服により誘導される菌について、*Bifidobacterium* などマウス-ヒト間での腸内細菌叢の変化が一致している部分はあり、今後、特定した菌種を無菌マウスに移植した際にILC3-IL-22が誘導されたうえで、腸炎抑制効果を見ることができれば、UCにおけるFMTによる治療へも応用できるのではないかと考えている。

- 1) Naganuma M, Sugimoto S, Kanai T, et al. Gastroenterology, 2018
- 2) Sugimoto S, Naganuma M, Kanai T, et al. Digestion, 2016
- 3) Mizuno S, Nanki K, Kanai T, et al. Intestinal Research, 2017
- 4) Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, et al. Lancet, 2017

このたびは第55回日本消化器免疫学会総会において奨励賞をいただき、大変光栄に存じます。また、会長の渡辺守教授および審査員の先生方、本研究の発表にあたり青黛関連の研究において日頃からお指導いただいております金井隆典教授、長沼誠准教授、筋野智久先生、三上洋平先生、寺谷俊昭先生、杉本真也先生をはじめ当科の関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。研究自体がまだまだ道半ばのため、発表後の質疑応答の際は、一部のご質問に対してうまく答えられず、お聞き苦しい点があったかと存じます。今後は、今回の受賞に慢心することなく、さらなるメカニズムの解明に向けて、先生方から頂きましたご質問・ご指導にお応えしていくとともに、より一層尽力して参りますので、今後ともご指導・ご鞭撻のほどなにとぞよろしくお願いいたします。(吉松裕介)