

NewsLetter Vol.20 No.2

奨励賞受賞 | 第55回日本消化器免疫学会総会

迷走神経を介した腸管免疫制御機構の検討

三上 洋平¹ 寺谷 俊昭¹ 中本 伸宏¹ 筋野 智久¹ 鈴木 貴博^{1,2}
楳 柏松¹ 宮本健太郎^{1,2} 水野 慎大¹ 長沼 誠¹ 金井 隆典¹

¹慶應義塾大学医学部 内科学教室 (消化器) / ²ミヤリサン製薬株式会社

背景：クローン病(CD)や潰瘍性大腸炎(UC)をはじめとした炎症性腸疾患(IBD)は、本邦では九割増加傾向にある。抗tumor necrosis factor(TNF)療法をはじめとした、新規免疫調節剤の登場により、IBDに対する治療は飛躍的に進歩をとげた。しかし、依然として治療抵抗例や副作用、さらに高額な治療費といった解決すべき点が存在するため、腸管免疫系のさらなる理解と、それに基づくIBDの治療法の確立は喫緊事である。

免疫に於いて、エフェクターT細胞と、そのブレーキ役であるFoxP3+制御性T細胞(Treg細胞)のバランスは、腸管免疫制御に非常に重要な役割を果たしている。これまで、種々の腸内細菌が、エフェクターT細胞や腸管Treg細胞の誘導に関与することは明らかとなったが、その維持機構については不明な点が多い。

近年、免疫細胞は、様々な神経伝達物質受容体を発現しており、神経系による免疫細胞制御機構の存在が見出された。腸管免疫も例外でなく、マクロファージや自然リンパ球をはじめとした腸管のレジデント細胞も神経系による制御を受けることが、近年明らかになってきた。しかし、神経刺激が腸管免疫、特にT細胞に与える影響は不明である(MIKAMI et al., 2018; Tanoue et al., 2016)。

本研究では、マウス腸炎モデルを用い、腸管を支配する迷走神経による腸管免疫制御機構について精査した。

方法：マウス腸管を支配する迷走神経を外科的に遮断する手術法(迷走神経切断術)を確立した(Iwasaki et al., 2018)。このモデルマウスを用いて、迷走神経遮断による腸管免疫の変動を病理学的および免疫学的に評価した。さらに、迷走神経遮断の腸炎に及ぼす影響を確認するために、dextran sodium sulfate(DSS)誘引腸炎モデルを用いて、迷走神経遮断群と開腹のみを行った比較対照群のマウス(シャム手術群)を病理学的および免疫学的に比較検討を行った。さ

らに、変化を認めた腸管免疫細胞における、神経伝達物質受容体の発現パターンを定量PCR法により検討した。

結果：迷走神経遮断を行ったマウスでは、明らかな腸炎を示唆する所見は、病態スコアでも、病理学的スコアでも認められなかった。しかし、FACS解析により、迷走神経遮断を行ったマウスでは、大腸粘膜固有層のTヘルパー細胞におけるFoxP3+Treg細胞が有意に減少していた(図1)。さらに、Treg細胞の中でも、特にHelios陰性の分画が減少していることが明らかになった。これらの結果は、迷走神経遮断により、末梢で誘導されるTreg(誘導性Treg)細胞が選択的に減少していることを示唆している。迷走神経遮断によりTreg細胞が減少したマウスに、DSS誘引腸炎を発症させたところ、シャム手術群と比し迷走神経遮断群では、腸炎病態が有意に増悪した(図2)。

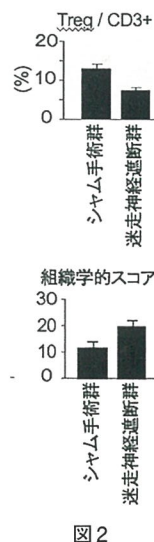
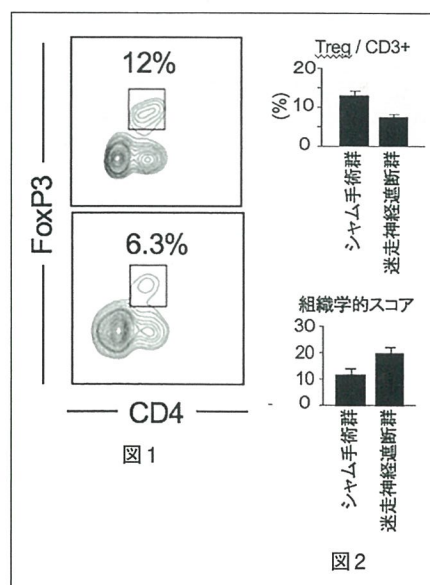
迷走神経遮断の、腸管特異的な影響を検討するために、これまで迷走神経との関与が知られているミエロイド細胞分画における神経伝達物質受容体をコードするmRNA

の発現をqPCR法により解析した。大腸粘膜固有層に存在する樹状細胞のムスカリン型アセチルコリン受容体mRNA発現量は、対照とした末梢リンパ組織のひとつである脾臓の樹状細胞と比して、有意に高値を呈した。

結語：本検討より、迷走神経が、大腸粘膜固有層特異的に、誘導性Tregの維持に重要であることが明らかになった。さらに、迷走神経遮断により腸炎モデルマウスの増悪を認めたことより、迷走神経の腸炎抑制的な機能の一端が示唆された。

【参考文献】

- Iwasaki, Y., Sendo, M., Dezaki, K., Hira, T., Sato, T., Nakata, M., Goswami, C., Aoki, R., Arai, T., Kumari, P., Hayakawa, M., Masuda, C., Okada, T., Hara, H., Drucker, D.J., Yamada, Y., Tokuda, M., Yada, T., 2018. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun* 9, 113. doi:10.1038/s41467-017-02488-y
MIKAMI, Y., Takada, Y., Hagihara, Y., Kanai, T., 2018. Innate lymphoid cells in organ fibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. doi:10.1016/j.cytogr.2018.07.002
Tanoue, T., Atarashi, K., Honda, K., 2016. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nature Publishing Group* 16, 295–309. doi:10.1038/nri.2016.36



この度は、第55回日本消化器免疫学会総会におきまして、私どもの研究をこのような形で評価していただき、奨励賞を賜りましたことは、誠に光栄であり、会長の清野宏先生、理事長の渡辺守先生、審査して下さりました先生方に、深く感謝申し上げます。また、今回の受賞は、金井隆典教授によるご指導と、寺谷俊昭先生のご尽力の賜物であり、この場を借りて心より御礼申し上げます。今回の栄誉を励みとし、これからも一層の研鑽を重ね、さらなる良い成果をあげられるように、引き続き精進して参りたいと存じます。さらに、今後はより一層、消化器免疫難病の病態解明と治療法の開発に寄与して参りたいと考えて居ります。この度の授賞、誠にありがとうございます。(三上洋平)

IBD患者の脂質代謝解析

岩谷 修子¹ 飯島 英樹¹ 天野 孝広¹ 大竹由利子¹ 谷 瑞季¹ 良原 丈夫¹ 辻井 芳樹¹
井上 隆弘¹ 林 義人¹ 新崎信一郎¹ 林 昭夫² 藤田 節子² 竹原 徹郎¹

¹大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 / ²小野薬品工業 創薬基盤研究所

背景：炎症性腸疾患(IBD)は遺伝子変異、腸内細菌叢、環境因子や自己免疫異常など様々な要因によって引き起こされると考えられているが、様々な脂質が腸管免疫の調整に関与し、脂質代謝の変化がIBDの病態に関与していることを示した報告が増えている。例えば食物中の脂肪酸やスフィンゴシン1リン酸は腸管での制御性T細胞の分化やリンパ球の遊走に関与することが報告されている。一方、脂質解析技術が進歩し、詳細な脂質プロファイルの分析が可能となっている。今回、我々はIBD患者と健常者における血漿中脂質代謝物の特徴を明らかにすることを目的として検討を行った。

方法：高脂血症の治療歴のない20歳から49歳の男性のクローン病患者(CD)20名(活動期10名、寛解期10名)、潰瘍性大腸炎患者(UC)20名(活動期10名、寛解期10名)と健常者(HV)10名を対象として空腹時の血液を採取し、血漿に含まれる698分子種を含む22種類の脂質を質量分析法(UPLC-ESI-MS/MS)により解析した。

結果：対象者の年齢、BMIには3群間で有意差は認めなかった。CDとUCの罹病期間に有意差は認めなかった。CDは小腸型30%、小腸大腸型40%、大腸型30%に、UCは直腸炎型10%、左側大腸炎型35%、全大腸炎型55%に分類された。CDの65%に手術歴があり、UCに手術歴はなかった。薬物療法では、CDとUCの両群においてメサラジンの使用率は高く、CDの60%とUCの25%において抗TNF α 抗体製剤を使用していた。また、CDの75%で栄養療法を行っていた。CDとUCの血清アルブミン値はHVと比べて有意に低値であり、CDではHVと比してLDL-ChoとT-Choは有意に低かった。CD、UCいずれにおいてもCRPは軽度の高値で、CDにおいて中等度の血沈の亢進を認めた。

HVとCD、UCの血漿中の22種類の脂質分画をクラスレベルで比較したところ、CDではホスファチジルセリン(PS)、リゾホスファチジルセリン(LPS)、スフィンゴシン1リン酸(S1P)の有意な増加を認め、リゾホスファチジイノシトール(LPI)、ホスファチジルコリン(PC)の有意な低下を認めた。UCではリゾホスファチジル酸(LPA)、PS、S1P、LPSの有意な増加を認め、スフィンゴシン(Sph)の有意な低下を認めた。付加される脂肪酸の種類別に698分子種のレベルで解析を行ったところ、CDでは16種のPSおよび1種のLPSがHVと比較して顕著な増加を認めた。一方、

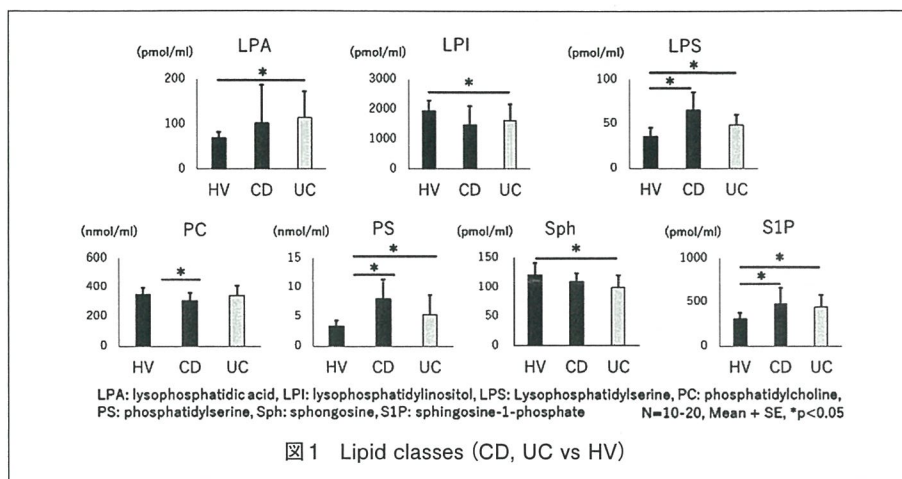


図1 Lipid classes (CD, UC vs HV)

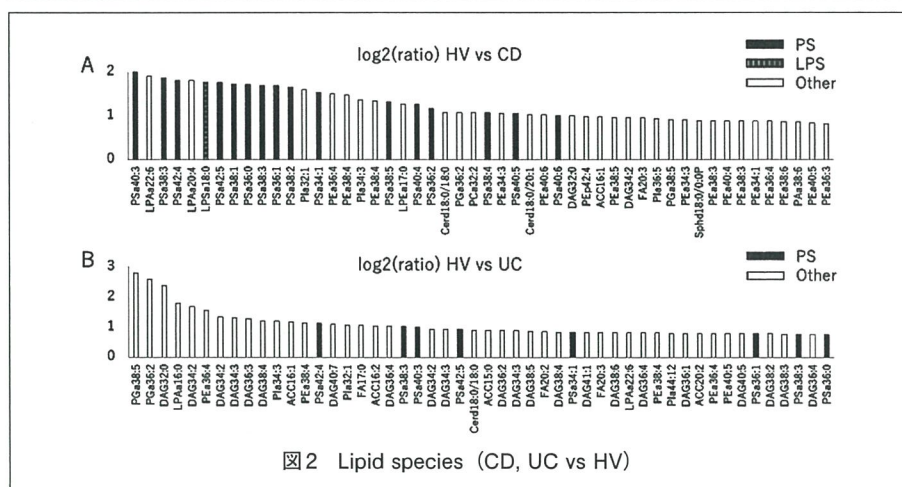


図2 Lipid species (CD, UC vs HV)

UCではPSは8種類がHVと比較して増加し、他に多数のジアシルグリセロール(DAG)とLPAが含まれていた。とくに、PSa40:3, PSa38:3, PSa42:4はCDの活動期、寛解期のいずれにおいてもHVと比べて有意な高値を示し、寛解期のUCにおいてHVと比べて有意な発現上昇を認めた。また、LPS18:0もCDおよびUCにおいてHVと比べて有意な高値を示した。病型別ではPSa40:3がCDの大腸型で小腸型と比べて有意な増加を認め、PSa38:3もCDの大腸型で小腸型と比べて増加傾向を認めた。UCの病型別ではPSa40:3およびPSa38:3の発現に有意差を認めなかった。次に、血漿中の脂質量とCDAI、白血球、CRP、血沈を含む炎症マーカーとの相関について検討した。PSa38:3はCDAIおよび血沈と正の相関を認め、PSa40:3は血沈と正の相関を認めた。さらに、PSa40:3とPSa38:3はヘモグロビン、ヘマトクリット、アルブミ

ンと負の相関を認め、血小板とは正の相関を認め、LPS18:0もアルブミンと血小板との弱い相関を認めた。いずれの脂質でも年齢、手術歴や栄養療法の有無では相関を認めなかった。

結論：IBD患者で様々な脂質が変化し、特にPSが増加していることが明らかとなった。これらの脂質代謝の変化はIBDの種々の炎症マーカーと相関し、IBDの病態と関連することが示唆された。

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受賞させていただき、大変うれしく存じます。竹原徹郎先生、飯島英樹先生をはじめ日頃よりご指導いただいている先生方に心より感謝申し上げます。この受賞を励みに、これからも努力して参りたいと思います。今後とも、ご指導・ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。(岩谷修子)

消化管粘膜傷害に関与する最近注目されている因子の役割解明

樋口 和秀 (大阪医科大学 第二内科)



第55回日本消化器免疫学会総会 (2018年12月 於:東京 会長:清野 宏)
(消化管1) 座長

演題OS1-1: プロスタニン (Prss8) は、トリプシン様セリンプロテアーゼであり、腸炎に対して抗炎症効果を示すとされているが、その機序は不明である。本演題は炎症性腸疾患の観点から検討されている。ヒトにおいては、大腸粘膜における Prss8 mRNA の発現は、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。免疫組織学的染色は、大腸上皮細胞で Prss8 の発現が低下していた。一方、腸管上皮特異的 Prss8 欠損マウスを用いて DSS 腸炎を発生させると、重症度の比較でコントロールマウスと比較して Prss8 欠損マウスにおいては、体重の減少率および組織学的スコアが有意に高いという結果であった。大腸上皮細胞における Toll-like receptor (TLR) 4 の発現が、コントロールマウスと比較して Prss8 欠損マウスにおいて増強していた。大腸上皮細胞株 HT-29 細胞を用いた in vitro の検討では、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の発現が有意に上昇した。以上のことから、炎症性腸疾患において、大腸上皮細胞の Prss8 は、TLR4 の発現を介した腸炎抑制作用を有する可能性が示唆される。Prss8 は治療のターゲットになりえるが、今後、Prss8 の発現をコントロールしている因子はなにか、遺伝的な要因と関係あるのか、その動きは可逆的であるのかなどの解明を期待する。

演題OS1-2: 非特異性多発性小腸潰瘍症の疾患遺伝子として、プロスタグランジン輸送蛋白である SLCO2A1 の変異が報告さ

れ、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いまだ明らかとなっていない。Slco2a1 の全身ノックアウトマウスと腸管上皮特異的ノックアウトマウス作成し、腸管における表現型を解析されている。それらのマウスにおいては、体重変化や自然発症小腸炎・大腸炎は認めなかった。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 の役割を検討され、体重減少は、野生型マウスと比較して腸管上皮特異的ノックアウトマウスで軽減され、全身性ノックアウトマウスでは増悪した。組織学的腸炎スコアも、野生型と比較して腸特異的ノックアウトマウスでは低く、全身性ノックアウトマウスでは高く、Trf と IL-6 の mRNA 発現も高いという結果となっている。細胞外の PGE2 濃度は各群で差はなかったが、細胞内濃度は、全身性ノックアウトマウスで上昇を認めている。以上のことから、Slco2a1 欠損のみでは自然発症腸炎を認めなかったため、潰瘍症の発症には二次的因子が関与することが示唆された。DSS 誘発腸炎において、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。今後、患者のデータと比較検討をしつつ、それ以外の要因などについて検討を重ねてほしい。そのことによって、新たな治療法が見つかる可

能性があるので、きわめて興味深い研究である。

演題OS1-3: 小麦タンパクグルテンの成分であるグリアジンはセリアック病のみならずその小腸粘膜透過性亢進作用を介して種々の疾患に関与している可能性が示唆されている。一方、NSAID 起因性小腸傷害の病態にも粘膜透過性の亢進が関与している。本研究では、NSAID 起因性小腸粘膜傷害におけるグリアジンの関与を検討されている。マウスを5日間グルテンフリー飼料で飼育したのち、グリアジンを12時間ごとに3回経口投与した群 (グリアジン群) と vehicle 投与群 (Ve 群) に分け、インドメタシンを経口投与し小腸粘膜傷害の程度を検討している。その結果、グリアジン群は Ve 群に比し lesion index は高値であり、MPO 活性も有意に高く TNF α および IL-1 β の mRNA 発現も高値を示した。血清 FITC-dextran 濃度は、インドメタシン投与前・後ともにグリアジン群の方が Ve 群より有意に高値であった。グリアジンは小腸粘膜における EGF 受容体のリン酸化レベルを増加させた。エルロチニブはグリアジンによる NSAID 起因性小腸傷害誘発作用および粘膜透過性亢進作用に対する影響を減弱させた。以上のことから、グリアジンは NSAID 起因性小腸粘膜傷害の増悪因子であること、その機序として EGF 受容体シグナルを介した小腸粘膜透過性の亢進が関与する可能性が示唆された。実臨床での意義を今後解明してほしい。

炎症性腸疾患の病態解明の新たな展開

飯島 英樹 (大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学)



第55回日本消化器免疫学会総会 (2018年12月 於:東京 会長:清野 宏)
(消化管2) 座長

一般演題②「消化管2」は炎症性腸疾患の病態に関連した腸管免疫に関わるセッションであり、3演題の座長を担当した。

OS2-1 は、弘前大学の平賀寛人先生らの演題で、ビタミンA 欠乏マウスでは DSS 腸炎及び *Salmonella typhimurium* 経口感染による腸炎の増悪が認められることが示された。さらに、T 細胞、B 細胞を欠損する

SCID マウスでもビタミンA 欠乏により同様の腸炎の増悪が認められ、IL-1 β などの産生亢進を伴うマクロファージのパイロトーシスが起っていた。実際、IL-1 β をその中和抗体により抑制することにより DSS 腸炎による腸管炎症の改善が認められたことから、IL-1 β 産生亢進を伴うパイロトーシスがビタミンA 欠乏下での腸炎の

誘導に重要な働きをしていることが明らかにされた。ビタミンA (レチノイン酸) は、制御性T細胞誘導やIgA 産生形質細胞の分化など粘膜免疫機構の恒常性の維持に重要な働きを持つことがすでに示されているが、本研究はビタミンA の非T 非B 細胞を介したパイロトーシス抑制という腸管免疫に対する新たな作用を示したもので非常に興味

深い報告であった。一方、IBDに対して抗IL-1 β 抗体の治療効果などの明確なエビデンスは乏しく、本研究で得られた知見がIBD患者で見られるビタミンA欠乏の結果として病態にどのように関与し、その改善が新規治療としてどの程度発展させることができるかについて今後の検討が待たれる。

OS2-2は、旭川医科大学の安藤勝祥先生らによる演題で、既報において腫瘍細胞のアポトーシス制御に働くことが報告されているRNA結合タンパクhnRNP A1についての報告であった。抗CD3抗体投与による小腸粘膜障害モデルマウスやDSS誘発大腸炎モデルマウスにおいて、小腸および大腸粘膜のhnRNP A1の発現が増加しており、これらのモデルにおいてhnRNP A1に対するsiRNAの腹腔内投与により腸管粘膜障害が増悪することが報告された。また、hnRNP A1がアポトーシス制御や腸管粘膜の修復に関与するTrefoil factorと結合することが示された。炎症性腸疾患において、リンパ球などの免疫担当細胞も重要であるが、腸管上皮は第一線のバリア機構として働いており、初期炎症誘導に関与す

る細胞として非常に重要である。本研究ではhnRNP A1の発現抑制により腸管上皮のアポトーシスや粘膜修復に寄与するTrefoil factorの安定性が阻害される結果、腸管炎症の増悪が引き起こされることが考えられ、hnRNP A1の発現は腸管恒常性維持のための重要なメカニズムであるとともに、新たな治療標的として注目される。hnRNP A1の誘導メカニズムや小腸・大腸におけるhnRNP A1のターゲット、その後の腸管恒常性、炎症に関わる制御機構、ヒトの腸管炎症状態における関与も含めて、今後のさらなる研究の展開が期待される。

OS2-3は慶應義塾大学の三上洋平先生らによる演題で、マウスの迷走神経遮断モデルを用いて腸管炎症に対する神経・脳腸相関の関与を明らかにしようとしたものであった。炎症性腸疾患の発症・増悪の要因として、脳腸相関の関与は想定されているものの、実際、脳、神経系へのストレスがどのように腸管の炎症に影響するのか、あるいは逆に腸管の炎症が脳、神経系にどのように影響するのかについて科学的なエビデンスが不足している。本研究では、実際に迷走神経の切断がデキストラン硫酸ナト

リウム(DSS)により誘発される腸炎を増悪させた。非常に興味深いことに本モデルでは制御性T細胞(Treg)の誘導が抑制されており、このことがDSS腸炎増悪の一因となっていることが想定される。実際に、どのような機序によりTregの制御が行われているのか大変興味深く、今後の検討が待たれる。特に、本モデルにおいて腸内細菌の構成がどのように変化しており、それによって腸内細菌代謝物(例えば酪酸)の変化によりTregが変化しているのか、あるいは神経系を介した全く新しい制御機構であるのかなどさまざまな可能性を秘めた研究であり、今後のさらなる研究の発展が期待される。

消化管粘膜免疫機構の解明が進んできたが不明な点も多く、本セッションでは粘膜免疫機構の新たな分野に切り込んだ検討が報告された。近年、免疫系をターゲットとした炎症性腸疾患の新たな治療薬が続々と登場しているが、炎症性腸疾患の制圧には道半ばであり、今後もこれらの基礎研究を進展させることにより炎症性腸疾患を中心とした消化管粘膜免疫系疾患の全貌解明および新規治療法の開発が期待される。

潰瘍性大腸炎および類似疾患に対する薬剤の作用機序

猿田 雅之(東京慈恵会医科大学 内科学講座 消化器・肝臓内科)



第55回日本消化器免疫学会総会(2018年12月 於:東京 会長:清野 宏)
(消化管4) 座長

OS5-1:シクロスポリンによるMCT1発現調節を介した酪酸吸収促進効果:重症潰瘍性大腸炎の治療としてカルシニューリン阻害薬シクロスポリンが用いられるが、その詳細なメカニズムは判明していない。演者の太田らは、抗炎症作用および免疫調節作用のある酪酸に注目し、シクロスポリンが腸上皮細胞(IECs)における酪酸の吸収トランスポーター monocarboxylic acid transporter 1(MCT1)の発現調節作用に関与し、腸炎改善効果に関連があるかを検討した。その結果、シクロスポリンの投与により、マウスIECにおけるMCT1の発現亢進作用を示し、MCT1増加に伴う酪酸の取り込み促進を介した腸炎治療効果を示唆するものとなった。

OS5-2:潰瘍性大腸炎に対する青黛による新規治療メカニズムの解明:現在、潰瘍性大腸炎には基準薬である5-ASA製剤だけでなく、各種新規治療薬が登場しているが、5-ASA製剤に不耐であったり、各種

薬剤に抵抗を示すことも多い。近年、中国で古来より慢性炎症疾患に使用される生薬の青黛に注目が集まり、潰瘍性大腸炎に対する有効性と安全性についても既に報告されているが、演者の吉松らは、青黛の腸炎に対する作用機序や有効成分についての検討を行った。その結果、青黛をDSS腸炎モデルのマウスに投与したところ、腸炎抑制作用とともに、大腸粘膜固有層特異的にIL-22産生性のCD3⁺ROR γ t⁺ILC3の数を誘導することを示した。さらに成分解析により、青黛にはインジゴ、インジルピンをはじめとするAryl hydrocarbon receptor(AhR)リガンドが多く含有されることを示し、そのうちインジゴにも腸炎抑制作用があることを示した。さらに、青黛の腸内細菌叢への変化も検討し、青黛食投与マウスの便をDSS腸炎発症の無菌マウスに移植すると腸炎が有意に改善し、腸内細菌叢の変化が腸炎改善効果に寄与している可能性を示した。

OS5-3:免疫関連有事象(irAE)による下痢・大腸炎の経験から:近年、各種腫瘍に対する化学療法として、免疫チェックポイント阻害薬などの免疫抑制のシグナルを阻害する薬剤が頻用されるようになった。一方で、免疫抑制シグナルを阻害することにより潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患に類似した腸炎を発症し、下痢を認めることがあり、immune-related adverse event(irAE)として理解され、新たな問題となっている。irAEによる大腸炎では、初期治療としてプレドニゾロンが投与され有効を示すことが多いが、プレドニゾロン抵抗例では抗TNF- α 抗体製剤を投与し病態制御をはかることが推奨されている。演者の津軽らは、irAEによる大腸炎の2例で、プレドニゾロンで改善した症例と、プレドニゾロン抵抗性で抗TNF- α 抗体インフリキシマブにより奏功した症例を経験し、その臨床的特徴につき提示した。