

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患におけるセロトニン関連遺伝子発現の検討

研究協力者 石原 俊治 島根大学医学部内科学講座第二 准教授

研究要旨：炎症性腸疾患 (IBD) の病態におけるセロトニン代謝異常を検討するため、炎症存在下における腸管粘膜のトリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase: TPH-1) とセロトニン再取り込みトランスポーター (serotonin reuptake transporter :SERT) の遺伝子発現について検討した。潰瘍性大腸炎 (UC) ならびに慢性腸炎モデルマウスの腸管粘膜では、炎症によって TPH-1 の発現は高い傾向を示し、SERT の発現は優位に低下した。UC の大腸粘膜において、通常光観察では寛解期の粘膜であるが、NBI 拡大観察で不規則な血管構造を呈する Irregular と定義した部位では炎症が残存しており、同部位の SERT の発現は低下していた。DSS 腸炎モデルマウスを用いた検討において、炎症が改善する過程で SERT の発現低下が遷延することが示された。以上のことから、IBD の大腸粘膜では、炎症存在下では SERT の発現が低下しており、さらに寛解期粘膜あるいは腸炎の回復過程においてもセロトニン機能障害が遅延する可能性が示唆された。

共同研究者：多田育賢、岡 明彦、楠 龍策、
福庭暢彦、川島 耕作、森山一郎、結城崇史、
木下芳一
所属 島根大学医学部内科学講座第二

膜組織ならびに腸炎モデルマウスの腸管組織を用いて解析した。また、寛解期粘膜および腸炎の回復過程における SERT/TPH-1 の発現に関する検討も行った。

A. 研究目的

寛解期の炎症性腸疾患 (IBD) において過敏性腸症候群 (IBS) 様症状を呈することが近年報告されている。神経伝達物質であるセロトニンの代謝異常が IBS の病態に関与することが一般的に知られているが、IBD の病態におけるセロトニンの関与に関しては未だ不明な点が多く、一定の見解が得られていない。そこで我々は、IBD におけるセロトニン代謝異常について検討した。

セロトニンは腸クロム親和性細胞の一つである EC 細胞にて、トリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase:TPH-1) を律速酵素として合成される。主な除去機構として、セロトニン再取り込みトランスポーター (serotonin reuptake transporter :SERT) を介して腸粘膜細胞に取り込まれる。腸管粘膜局所のセロトニン代謝にはこの 2 つの遺伝子の発現が強く影響するものと考えられており、腸管の炎症存在下におけるそれらの変化を、潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の大腸粘

B. C. 研究方法と結果

① 潰瘍性大腸炎 (UC) ならびに慢性腸炎モデルマウスの腸管粘膜における SERT/TPH-1 の発現に関する検討

UC 患者 (n=21) に下部消化管内視鏡検査を行い、通常光観察で活動性粘膜、非活動性粘膜 (寛解期粘膜) よりそれぞれ生検を行った。コントロール群として大腸癌切除症例の摘出標本における非病変部位を用いた (n=6)。それぞれの検体を Real time PCR にて SERT、TPH-1 ならびに IL-8 を定量した。なお、内在性コントロール遺伝子は cytokeratin20 を用いた。

活動性粘膜は非活動性粘膜およびコントロール群と比較し、優位に SERT の発現は低下していた。逆に TPH-1 は活動性粘膜と比較し、高い傾向を認めた。SERT と IL-8 は負の相関を示した ($R=-0.41$)。

続いて慢性腸炎マウスにおける検討を行った。クローン病モデルマウスの SAMP1/Yit の腸管膜リンパ節 (MLN) から CD4 陽性 T 細胞を分離し SCID

マウスの腹腔内へ移入することで腸炎モデルを作製した。(Burns RC et al, Gastroenterology. 2001)。T細胞移入直後と4週後に回腸末端部を摘出し、Real time PCRにてSERT、TPH-1ならびにMIP-2を定量した。

4週間後の小腸粘膜においてMIP-2が高発現しており、腸炎が発症していた。腸炎発症後の小腸粘膜において優位にSERTの発現は優位に低下し、TPH-1の発現は亢進していた。

② 寛解期UC粘膜におけるSERT/TPH-1の発現に関する検討

非活動性粘膜(寛解期粘膜)のNBI拡大観察を行い、腺管周囲を規則正しい血管が走行している部位をRegular、それ以外の不規則な血管走行と乱れた腺管構造を呈する部位をIrregularと定義した。これは、不規則な血管構造を呈する部位は、局所の血管新生や炎症に違いがあると想定したためであった。病理学的な炎症をMatts分類にて評価したが、Regular、Irregularともに差は認めなかった。しかし、IrregularにおいてIL-8が高発現しており、炎症の残存を認めた。両者のSERTとTPH-1の発現をReal time PCRにて定量したところ、TPH-1の発現に差は見られなかったが、IrregularにおいてSERTの発現は優位に低下していた。

③ デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎モデルの大腸粘膜におけるSERTの発現推移に関する検討。

C57BL/6Nマウスに2.0%DSSを7日間経口投与した後、Day14、Day21、Day28の大腸を摘出し、Real time PCRにてSERT、TPH-1ならびにMIP-2を定量した。DSS投与前と比較し、DSS投与後のSERTの発現は優位に低下した。Day28までMIP-2の発現は徐々に改善したにもかかわらず、SERTの発現は低下を続け、改善を認めなかった。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト生検組織を用いた実験のプロトコールについては、島根大学の実験動物委員会のおよび倫理委員会の承認を得た。

D. 考察

UCならびに慢性腸炎モデルの腸管粘膜では、炎症によってSERTの発現は低下していた。このこと

から、炎症存在下ではセロトニンの排除機能が障害されている可能性が示唆され、過去の報告に合致する結果であった。(Coates MD et al, Gastroenterology. 2004)。一方、TPH-1の発現が亢進しており、セロトニン産生が増加している可能性も否定できないが、優位な差は認めなかった。

UCの大腸粘膜において、通常光では寛解している粘膜であっても、NBI拡大観察でIrregularと定義した部位では炎症が残存しており、SERTの発現は低下していた。この結果から、粘膜治癒が得られたと思われる粘膜においてもSERT機能障害が遷延する可能性が示唆された。DSS腸炎モデルマウスを用いた検討においても、炎症が改善する過程でSERTの発現低下が遷延することが示された。

今回の検討では、SERT機能障害と臨床像との対比ができておらず、今後の検討課題と考えられる。また、炎症がSERT機能障害を引き起こすのか、もしくはSERT自体が炎症を促進するものかはcontroversialな状態であり、更なる機能解析が必要と考えられた。

E. 結論

IBDの大腸粘膜では、炎症存在下ではSERTの発現が低下しており、さらに寛解期粘膜あるいは腸炎回復期においてもセロトニン機能障害が遷延する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kawashima K, Ishihara S, Yamamoto A, Ohno Y, Fukuda K, Onishi K, Kinoshita Y: Development of diffuse alopecia with psoriasis-like eruption during the administration of infliximab for Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. (in press)
- ② Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, Oka A, Tada Y, Kinoshita Y: Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in

intestinal inflammation. Digestion. 85:103-7, 2012.

③ Otani A, Ishihara S, Aziz MM, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Ansary MM, Kinoshita Y: Intrarectal administration of milk fat globule epidermal growth factor-8 protein ameliorates murine experimental colitis. Int J Mol Med. 29:349-56, 2012.

④ Kusunoki R, Ishihara S, Sato M, Sumita Y, Mishima Y, Okada M, Tada Y, Oka A, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Sato S, Amano Y, Murakawa Y, Kinoshita Y: Rare case of Takayasu's arteritis associated with Crohn's disease. Intern Med. 50:1581-5, 2011.

⑤ Li YY, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Yuki T, Amano Y, Ansary MU, Kinoshita Y: Autophagy is required for toll-like receptor-mediated interleukin-8 production in intestinal epithelial cells. Int J Mol Med. 27:337-44, 2011.

⑥ 岡 明彦, 石原俊治, 木下芳一: 制御性B細胞からみたIBD治療へのアプローチ. IBD Research 5:259-64, 2011.

2. 学会発表

① 多田育賢, 石原俊治, 楠 龍策, 岡 明彦, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一

ミニシンポジウム: 大腸IBD病態5
炎症性腸疾患の血清中MFG-E8蛋白の測定と臨床的意義の検討

第97回日本消化器学会総会, 東京,
2011. 05. 14

② 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 岡 明彦, 福庭暢彦, 天野祐二, 木下芳一

ミニシンポジウム: 大腸 総合2
緩解期潰瘍性大腸炎粘膜におけるNBI拡大所見と局所炎症所見の対比

第97回日本消化器学会総会, 東京,
2011. 05. 15

③ 岡 明彦, 石原俊治, 木下芳一

シンポジウム: 消化器疾患と免疫

制御性B細胞による腸管免疫抑制機構とその破綻による腸炎発症機序の解明 - クローン病モデルマウスの病態解析からの知見とその応用 -

JDDW2011, 福岡, 2011. 10. 21

④ 楠 龍策, 石原俊治, 木下芳一

シンポジウム: 炎症と消化器癌

MFG-8の消化管炎症および炎症発癌への関与 - ノックアウトマウスを用いた解析 -

JDDW2011, 福岡, 2011. 10. 21

⑤ 岡 明彦, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 福庭暢彦, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一

クローン病モデルマウスのT細胞に対する制御性B細胞の影響

第53回日本消化器病学会大会, 福岡,
2011. 10. 20

⑥ 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 岡 明彦, 楠 龍策, 福庭暢彦, 森山一郎, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一

当院における難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムスの使用経験

第53回日本消化器病学会大会, 福岡,
2011. 10. 20

⑦ 多田育賢, 石原俊治, 楠 龍策, 岡 明彦, 福庭暢彦, 結城崇史, 川島耕作, 天野祐二, 木下芳一

クローン病モデルマウスの腸管局所におけるSERTおよびTPH-1の発現に関する検討

第53回日本消化器病学会大会, 福岡,
2011. 10. 20

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患における eNOS の役割

研究協力者 佐々木 誠人 愛知医科大学消化器内科 准教授

研究要旨：炎症性腸疾患の治療ターゲットの1つである接着因子を制御する eNOS と腸炎との関係を検討した。In vitro では eNOS の活性化が接着因子の発現を抑制した。また eNOS の遺伝子多型による検討から、eNOS 活性の低い-786T>Cにおいて、UC の難治例が有意に多かった。以上から、炎症性腸疾患における eNOS 活性の重要が示唆された。

A. 研究目的

Mucosal addressin cell adhesion molecular-1 (MAdCAM-1) など血管内皮の接着因子は、炎症性腸疾患における抗体療法のターゲットとなる重要な分子である。接着因子の発現を調整する因子の1つに endothelial NOS (eNOS) があるが、その活性には個人差 (遺伝子多型) があることが知られている。そこ炎症性腸疾患における eNOS の役割ならびに、臨床像への影響を検討する。

B. 研究方法

スタチンならびに tetrahydrobiopterin (以下 BH4) を用いて eNOS を活性化し、サイトカインによる接着因子の発現の変化を in vitro において ELISA 法、ウェスタン・ブロット法により検討した。また、血管内皮細胞に eNOS を強発現した際の接着因子の発現についても検討した。潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の eNOS 遺伝子多型と臨床像 (分類、病型、難治性) につき検討した。

(倫理面への配慮)

患者に十分な informed consent を行い文書による同意を得るとともに、患者が調査を拒否できる機会を設け、患者のプライバシー及び個人情報の保護に努めた。

C. 研究結果

スタチンにより TNF- α による vascular cell

adhesion molecule-1 (VCAM-1) の発現は有意に抑制された。BH4 は用量依存性に VCAM-1 の発現を有意に抑制し、MAdCAM-1 も抑制した。eNOS 強制発現により、TNF- α 刺激による MAdCAM-1 の発現は抑制された。eNOS 遺伝子多型 (-786T, T>C ならびに-922A, A>G) と UC の病型 (直腸炎型, 左半大腸炎型, 全大腸炎型), 臨床経過 (初回発作型, 再燃寛解型) には関連がなかった。-786T/T に比べ eNOS 活性の低い-786T>C において難治症例 (PSL 抵抗例, PSL 依存例) が有意に多かったが、活性に差のない-922A>G、-922A/A においては差がなかった。

D. 考察

細胞実験と UC 患者の臨床像から、eNOS は接着因子の制御を介して腸炎を制御する可能性が示された。eNOS 遺伝子多型による潰瘍性大腸炎の臨床経過の推測が可能であり、治療戦略に利用できるのではないかと考えられた。

E. 結論

eNOS は接着因子の制御を介して炎症性腸疾患の病態に関与すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 高田真由子、水野真理、近藤好博、土方康孝、河村直彦、徳留健太郎、小笠原尚高、佐々木誠人、米田政志、春日井邦夫：ニューモシスチス肺炎を併発した潰瘍性大腸炎(UC)の1例. 第214回日本内科学会東海地方会, 名古屋, 2011. 6. 11.
- 2) 岡庭紀子、増井竜太、川村百合加、伊藤義紹、近藤好博、井澤晋也、土方康孝、河村直彦、徳留健太郎、飯田章人、水野真理、小笠原尚高、舟木康、佐々木誠人、春日井邦夫：Crohn病と鑑別を要した腸結核の1例, 日本消化器病学会東海支部第114回例会, 岐阜, 2011. 6. 18
- 3) 岡庭紀子、水野真理、高田真由子、川村百合加、井上匡央、野口誠司、吉峰崇、田村泰弘、近藤好博、伊藤義紹、増井竜太、井澤晋也、土方康孝、徳留健太郎、河村直彦、飯田章人、小笠原尚高、舟木康、佐々木誠人、春日井邦夫：当院における高齢発症潰瘍性大腸炎患者の臨床的特徴, 第8回日本消化管学会総会学術集会, 仙台, 2011. 2. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

Glycosyltransferase for treating
Inflammatory Bowel Disease (European Patent
No. 2127668) 17. 08. 2011

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた潰瘍性大腸炎におけるアミノ酸と
TCA サイクル関連分子のプロファイリング

研究協力者 吉田 優 神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 准教授

研究要旨：メタボロミクスは、生命科学における包括的・網羅的な研究手法である。今回、ヒト炎症性腸疾患の血清ならびに組織を用いて、メタボローム解析を行った。ガスクロマトグラフ質量分析計を用いたアミノ酸と TCA サイクル関連分子プロファイリングによって明らかになった潰瘍性大腸炎患者大腸組織や血清におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子の変動は、潰瘍性大腸炎の病態生理に深く結びつく可能性を示唆しているとともに、アミノ酸と TCA サイクル関連分子プロファイリングは潰瘍性大腸炎の早期診断に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

炎症性腸疾患は、クローン病と潰瘍性大腸炎に代表される慢性の腸管炎症を主体とした原因不明の疾患である。これまでの広範な基礎研究や臨床研究から、遺伝的素因に加えて環境因子が作用し、過剰な免疫応答が生体に生じてその結果として炎症性腸疾患が発症すると考えられている。近年、免疫と炎症におけるアミノ酸の役割が明らかになるにつれ、炎症性腸疾患に対するアミノ酸の関与が注目され始めた。そこで本研究では、潰瘍性大腸炎患者のアミノ酸プロファイルがその病態に起因するの否かを検討するため、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) を用いて潰瘍性大腸炎患者の大腸生検組織と血清中のアミノ酸と TCA サイクル関連分子の分析を実施した。

B. 研究方法

神戸大学附属病院、ならびに、兵庫医大病院通院中の炎症性腸疾患患者から提供されたサンプルを用いて実験を実施した。本研究は両病院の倫理委員会の許可を得るとともに、患者に対する十分なインフォームドコンセントのもと行った。大腸組織に関しては 22 例の潰瘍性大腸炎患者の大腸内視鏡における生検組織を、また、血清は 13 例の潰瘍性大腸炎患

者と 21 例のクローン病患者、および 17 例の健常人のものを使用した。得られた血清と大腸組織から水溶性代謝産物を抽出し、GCMS 測定のための誘導体化処理を行った後、GCMS-QP2010plus を用いて、アミノ酸と TCA サイクル関連分子を分析した。

(倫理面への配慮)

神戸大学倫理委員会の規約に沿い、倫理的配慮を行った。

C. 研究結果

1) 潰瘍性大腸炎大腸組織におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリング

はじめに、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜組織を用いてアミノ酸と TCA サイクル関連分子の解析を行った。盲腸を非病変組織として、また、直腸を病変組織として測定を実施し、19 種類のアミノ酸と 7 種類の TCA サイクル関連分子の存在を決定した。そのうち 16 種類のアミノ酸と 5 種類の TCA サイクル関連分子の存在量が病変組織において非病変組織に比べて有意に低下していた。

2) 炎症性腸疾患患者の血清におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリング

健常者、潰瘍性大腸炎患者、ならびに、クローン病患者の血清サンプルを用いてアミノ酸と TCA サイ

クル関連分子の解析を行った。その結果、血清中において20種類のアミノ酸と7種のTCAサイクル関連分子の存在を見出した。血清から得られたアミノ酸とTCAサイクル関連分子のデータに基づいて多変量解析のひとつであるPLS-DAを実施し、PLS-DA loading plotsにおいて各群における特徴的なアミノ酸・TCAサイクル関連分子を見出した。潰瘍性大腸炎患者ではアスパラギン酸とグリシン、クローン病患者ではフマル酸とリンゴ酸、プロリンが特徴的な物質であった。また、炎症性腸疾患患者と健常者においては、血清中のヒスチジンとグルタミン、トリプトファン量に有意な違いが認められた。

D. 考察

メタボロミクスとは、遺伝的背景、環境因子、発達過程などを含めた、ある条件下での低分子量代謝産物の特徴や相互関係を包括的、かつ、網羅的に探究する研究手法である。すなわち、メタボローム解析を実施することで、細胞や組織の代謝過程について様々な情報を得ることができる。今回の実験では、低分子代謝産物の中でもアミノ酸とTCAサイクル関連分子に着目し、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織と血清中のアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングを、GCMSを用いて実施した。潰瘍性大腸炎患者の大腸組織を用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングでは、16種類のアミノ酸と5種類のTCAサイクル関連分子の存在量が、病変組織において非病変組織に比べて有意に低下することを確認した。このことは潰瘍性大腸炎の病変組織において炎症により損傷した粘膜を修復するために必要なエネルギー代謝が十分に行われていないことを示唆していると考えた。また、アミノ酸やTCAサイクル関連分子のレベルの低下が潰瘍性大腸炎そのものの病勢とあまり相関関係がなかったことから、アミノ酸やTCAサイクル関連分子のプロファイルが潰瘍性大腸炎の病態生理と深く関係すると考えた。さらに、血清を用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングにおいて、健常者と潰瘍性大腸炎患者の間に有意な違いを認めたことから、この血清プロファイルの違いは病変組織でのアミノ酸

代謝と関係する可能性が示唆された。さらに、詳細な解析により潰瘍性大腸炎とクローン病、健常人間を特徴づける分子の同定も可能であったことから、血清を用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングが潰瘍性大腸炎やクローン病の新しい診断ツールとして有用である可能性が示唆された。今回の研究では、今まで汎用的に臨床の場で用いられてきたCRPが上昇していない患者サンプルでも著明な変化が認められたことから、確定診断の難しい早期の段階においても診断ツールとして有用ではないかと考えられた。

E. 結論

GCMSを用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子プロファイリングによって明らかになった潰瘍性大腸炎患者大腸組織や血清におけるアミノ酸とTCAサイクル関連分子の変動は、潰瘍性大腸炎の病態生理に深く結びつく可能性を示唆しているとともに、GCMSを用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子プロファイリングは潰瘍性大腸炎の早期診断に有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ooi M, Nishiumi S, Yoshie T, Shiomi Y, Kohashi M, Fukunaga K, Nakamura S, Matsumoto T, Hatano N, Shinohara M, Irino Y, Takenawa T, Azuma T, and Yoshida M*. The GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis. *Inflammation Res.* 2011 Sep;60(9):831-40.

2. 学会発表

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

難治性潰瘍性大腸炎患者における Th1 型反応からみたバイオマーカー検索

研究協力者 石黒 陽 弘前大学光学医療診療部 准教授

研究要旨：難治性潰瘍性大腸炎患者における Th1 型反応を司る候補遺伝子 CXCL-9 と、その ligand である CXCR3 発現細胞 CD8b の P 糖蛋白発現はサイクロスポリン適応バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

難治性潰瘍性大腸炎における粘膜障害機序解明を目的とする。ステロイド抵抗性難治性潰瘍性大腸炎組織における網羅的解析から明らかとなった Th-1 型反応を司る候補遺伝子 CXCL-9 と、その ligand である CXCR3 発現細胞 CD8b の P 糖蛋白発現からサイクロスポリン適応バイオマーカーとしての意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎患者 26 名、健常者 10 名について PBMC を分離 CD8b 細胞における P 糖蛋白発現を FACS にて解析した。免疫調節薬との関連について χ^2 検定を行った。また、免疫調節薬の Cut off 値を決定した。これに基づき重症潰瘍性大腸炎 13 名について SH 投与前に解析し、治療反応性について 1mg/kg の PSL を投与後 7 日で判定した。またその後の経過と発現の変化について検討した。

C. 研究結果

潰瘍性大腸炎患者 32 名について PBMC を分離後 CD8b 細胞における P 糖蛋白発現を FACS にて解析した。ステロイド依存・抵抗例 18 名、反応例 12 名について ROC curve を描くと AUC が 0.9643、Std. Error が 0.03315、99% CI : 0.8789 to 1.050、 $P < 0.0001$) であった。

重症潰瘍性大腸炎 13 名について SH 投与前に解析し (Cut off 0.7%)、治療反応性について 1mg/kg の PSL を

投与後 7 日で判定した結果、陰性の 6 名は、UCAI の有意な低下をみた。一方陽性の 7 名で、UCAI は 1 週間で有意な変化はなく、CSA を投与後に有意に低下した。

D. 考察

TNF- α 、IFN- γ で上皮細胞株である HT-29 を刺激すると、それぞれ時間依存性・濃度依存性に、RIG-I の発現が増強する。Th1 型の腸炎モデルである IL-10KO マウスでは上皮、LP とともに RIG-I の発現が亢進している。また HT-29 において RIG-I に対する siRNA を transfect すると、IFN- γ で誘導される CXCL-9 (MIG) の産生が有意に低下する (ref1)。これらのケモカインは CXCR3 陽性 T 細胞を走化させることが報告されている。今回の検討ではヒト潰瘍性大腸炎患者において CD8b 細胞は、ステロイド抵抗例においてより CXCR3、CD38、P 糖蛋白を発現しており、また granzyme B を発現していた。

これまでの報告では潰瘍性大腸炎における Th-1 反応に関する報告はきわめて少ない。しかし 2010 年の GWAS の結果からはクローン病ではなく、潰瘍性大腸炎における IFN-g 近傍の異常が報告され、さらに、IFN-g プロモーター領域のメチル化異常が潰瘍性大腸炎において報告されている。これまで潰瘍性大腸炎のサイトカインプロファイルとされている Th-2 反応が少なくとも一部の患者においては異なる可能性が示唆され、治療抵抗性の観点からさらなる解析が必要である。

E. 結論

CD8b の P 糖蛋白発現は SH ではなく、サイクロスポリン適応バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawaguchi S, Ishiguro Y, Imaizumi T, Mori F, Matsumiya T, Yoshida H, Ota K, Sakuraba H, Yamagata K, Sato Y, Tanji K, Haga T, Wakabayashi K, Fukuda S, Satoh K. Retinoic acid-inducible gene-I is constitutively expressed and involved in IFN-gamma-stimulated CXCL9-11 production in intestinal epithelial cells. Immunol Lett. 2009 24;123(1). :9-13.

2. 学会発表

石黒 陽、櫻庭 裕丈、福田 眞作

work shop 6 内視鏡による IBD の病態追求 潰瘍性大腸炎粘膜所見に関する拡大 NBI による粘膜治癒過程の検討 第 96 回日本消化器内視鏡学会総会 2011 年 8 月 19 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

CAP 療法の治療効果予測因子としての温感の有用性

研究協力者 飯塚 政弘 秋田赤十字病院附属あきた健康管理センター 所長

研究要旨：潰瘍性大腸炎(UC)難治例を対象に、血球成分除去療法(CAP)治療効果予測因子として温感の有用性について検討した。その結果、CAP 施行中に温感が認められた場合の寛解率は 86.7%で温感が認められない場合の寛解率(47.1%)に比べて有意に高値を示し($p<0.01$)、CAP 施行時の温感の有無は CAP 治療効果予測因子として有用と考えられた。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)難治例に対する血球成分除去療法(CAP)の有用性が評価されているが、治療効果予測因子については十分な検討はされていない。昨年に続き、UCにおけるCAP治療効果予測因子として温感の有用性について検討した。

B. 研究方法

2002年6月～2011年12月に秋田大学または秋田赤十字病院で36例のUC難治例に対して62回(1回:1～2クール)CAP治療を施行した。これらの症例を対象に、CAP施行時の温感(手、足、腹部など)の有無による寛解率を比較した。また、11例に対して赤外線体温計で皮膚温を測定し、さらに2例はサーモグラフィーで皮膚温の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

皮膚温の測定はインフォームドコンセントの下に行った。

C. 研究結果

①CAP施行中、手、腹部、足などに温感が認められた症例の寛解率は86.7%で、温感が認められなかった症例の寛解率(47.1%)に比べて有意に高値であった($p<0.01$)。

②CAP有効例ではCAP開始30分後の手掌皮膚温はCAP開始前に比べて有意に上昇し($p<0.05$)、サーモグラフィーでも皮膚温の上昇(特にCAP終了時)が確認された。

D. 考察

CAP施行時温感が認められた症例のCAP治療効

果は、温感が認められなかった症例に比べて有意に優れており、実際に皮膚温の上昇も確認された。温感が生じる機序は不明であるが、CAPによる血流の改善や自律神経系の関与が示唆された。

E. 結論

UC症例において、CAP施行時の温感の有無はCAP治療効果予測因子として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

飯塚政弘、相良志穂、衛藤 武、熊谷 誠、堀江泰夫. ワークショップ2 潰瘍性大腸炎難治例に対する血球成分吸着除去療法の新たな治療効果と療効果予測因子の有用性についての検討. 第7回日本消化管学会総会. 京都国際会館. 平成23年2月18日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

潰瘍性大腸炎バイオマーカーhuman neutrophil peptideの腸管への作用

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨：活動期の潰瘍性大腸炎患者では、主に好中球のアズール顆粒から分泌される human neutrophil peptide (HNP) が上昇していることが明らかとなった。本研究では HNP の腸管に対する作用について検討した。マウス実験腸炎モデルにおいて、低濃度 HNP が腸炎を抑制するのに対し、高濃度 HNP は腸管炎症を増悪させた。低濃度 HNP は腸管上皮細胞の増殖を促進し、腸管マクロファージからの IL-1 β 産生を抑制した。これに対し、高濃度 HNP は腸管上皮細胞の増殖を抑制し、上皮細胞のケモカイン、接着因子の発現を誘導した。また、高濃度 HNP は腸管マクロファージからの IL-10 産生を抑制した。HNP は低濃度（生理的濃度）では腸管の恒常性維持に貢献するが、高濃度（病的濃度）になると腸管炎症の増悪・持続に関与すると考えられた。

A. 研究目的

炎症性腸疾患の患者血液を用いたプロテオーム解析により、ヒト好中球ペプチド (human neutrophil peptide : HNP) が活動期の潰瘍性大腸炎患者で上昇していることが明らかとなった。HNP は潰瘍性大腸炎の疾患活動性マーカーや治療効果予測マーカーの候補であり、また HNP が潰瘍性大腸炎の病態形成に関与している可能性が考えられている。本研究では、HNP の上昇が腸管炎症に与える影響とともに、健常人に存在する生理的濃度の HNP の作用についても検討を行った。

けるサイトカインの発現量を real-time RT-PCR で測定した。

3) HNP の腸管上皮細胞、腸管マクロファージへの作用

ヒト大腸癌細胞株 (HT-29)、および野生型マウスより単離した腸管マクロファージの培地に HNP を添加し、細胞増殖およびサイトカイン・接着因子の発現を解析した。腸管マクロファージの刺激には *E. coli* 死菌を用いた。

B. 研究方法

1) HNP トランスジェニックマウスの作成

HNP-1 のトランスジェニックマウス (HNP-Tg) を作成し、血中・組織中の HNP-1 を測定した。また、各臓器の病理組織解析を行った。

2) HNP のマウス DSS 腸炎に与える影響

HNP-Tg マウスで Dextran sodium sulfate (DSS) 腸炎を作成し、野生型マウスの DSS 腸炎との比較を行った。また、野生型マウスへの DSS 自由飲水期間中に HNP-1 を腹腔内投与した DSS 腸炎を作成し、PBS を腹腔内投与したコントロール群と比較した。DSS 腸炎は DAI スコアと大腸の組織学的スコアで評価し、腸組織にお

C. 研究結果

1) HNP-Tg マウスの解析

HNP-Tg マウスの血中 HNP 濃度は低く、健常人の血中濃度と同程度であった。各臓器の病理組織解析では野生型マウスとの差は認めず、炎症の自然発症は見られなかった。

2) HNP のマウス DSS 腸炎に与える影響

HNP-Tg マウスで DSS 腸炎を作成すると、HNP の存在しない野生型マウスで作成した DSS 腸炎と比べ、有意に DAI スコア、病理スコアが低値であった。また、腸組織中のサイトカイン発現も HNP-Tg マウスでは IL-1 β 、MCP-1、IL-6、TNF- α が有意に低値となった。

野生型マウスでDSS腸炎を作成し、HNPを2種類の濃度で連日腹腔内投与を行った。血中濃度が健常人の血中HNP濃度と同程度になる用量を投与した低濃度HNP群では、HNP-Tgマウスと同様、DAIスコア、病理スコアがコントロール群に比べ低下していた。また、腸組織のIL-1 β 、TNF- α 発現も有意に抑制されていた。これに対し、活動期潰瘍性大腸炎患者の血中HNP濃度と同程度になる高用量のHNPを投与した高濃度HNP群ではDSS腸炎の増悪が認められ、腸管からのTNF- α 、IFN- γ 分泌が有意に高値となった。

3) HNPの腸管上皮細胞、腸管マクロファージへの作用

腸管上皮細胞の培地にHNPを添加すると、低濃度HNPは細胞増殖を促進させたが、高濃度HNPでは細胞増殖が抑制された。腸管上皮細胞からのIL-8分泌は、低濃度HNPでは変化しないが、高濃度HNPで有意に増加した。また、ICAM-1の発現も同様に、低濃度HNPでは変化がないものの、高濃度HNPで著明に亢進した。

腸管マクロファージを*E. coli*死菌で刺激すると、IL-1 β 、IL-10の有意な上昇が認められた。HNPの培地への添加はIL-1 β 発現を濃度依存的に抑制した。IL-10の発現は低濃度HNPで変化しなかったが、高濃度HNPの添加により有意に減少した。

D. 考察

健常人血中に認められる生理的濃度のHNPは、腸管上皮細胞の増殖を促進し、腸管マクロファージのIL-1 β 産生を抑制した。このことから、生理的濃度のHNPは腸管の恒常性維持に貢献しているものと考えられた。これに対して、活動期潰瘍性大腸炎患者で認められる高濃度のHNPは、腸管上皮細胞の増殖を抑制し、好中球の遊走を促すIL-8、ICAM-1の発現を誘導した。また、腸管マクロファージからの抗炎症性サイトカインIL-10産生を抑制した。以上より、高濃度のHNPは腸管炎症の増悪および持続に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HNPは生理的濃度と病的濃度で腸管に対する作用が

異なっていることが示された。HNP濃度による作用の違いを分子レベルで解明することが、潰瘍性大腸炎の新規治療法開発に結び付く可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto S, Uto H, Kanmura S, Sakiyama T, Oku M, Iwashita Y, Ibusuki R, Sasaki F, Ibusuki K, Takami Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Human neutrophil peptide-1 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011 [Epub ahead of print]
- 2) Setoyama H, Ido A, Numata M, Moriuchi A, Yamaji N, Tamai T, Funakawa K, Fujita H, Sakiyama T, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H. Repeated enemas with hepatocyte growth factor selectively stimulate epithelial cell proliferation of injured mucosa in rats with experimental colitis. *Life Sci* 89, 269-275. 2011
- 3) Yamaji N, Ido A, Moriuchi A, Numata M, Setoyama H, Tamai T, Funakawa K, Fujita H, Sakiyama T, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor ameliorates mucosal injuries leading to inhibition of colon cancer development in mice. *Oncol Rep* 26, 335-341, 2011
- 4) Iwashita Y, Sakiyama T, Musch MW, Ropeleski MJ, Tsubouchi H, Chang EB. Polyamines mediate glutamine-dependent induction of the intestinal epithelial heat shock response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G181-187, 2011
- 5) 崑山敏男、藤田浩、上村修司、岩下祐司、指宿和成、沼田正嗣、大井秀久、坪内博仁 p62/SQSTM1染色によるクローン病腸管オートファジーの検討 *消化器と免疫*、47、104-106、2011
- 6) 指宿和成、崑山敏男、上村修司、前田拓郎、有馬

志穂、岩下祐司、隈元亮、佐々木文郷、橋元慎一、山路尚久、瀬戸山仁、船川慶太、井戸章雄、坪内博仁 Human neutrophil peptide は腸管上皮細胞 IL-8、ICAM-1 の発現を亢進させる 消化器と免疫、47、101-103、2011

- 7) 岩下祐司、寄山敏男、前田拓郎、有馬志穂、指宿和成、隈元亮、熊谷公太郎、佐々木文郷、橋元慎一、上村修司、高見陽一郎、山路尚久、瀬戸山仁、船川慶太、井戸章雄、坪内博仁 グルタミンによる腸管上皮細胞 Heat shock protein 発現誘導はポリアミンにより制御されている 消化器と免疫、47、98-100、2011
- 8) 佐々木文郷、井戸章雄、高見陽一郎、熊谷公太郎、岩下祐司、指宿和成、隈元亮、上村修司、寄山敏男、宇都浩文、桶谷真、坪内博仁 マクロファージに発現するオステオアクチビンは腸炎を軽減する 消化器と免疫、47、2-4、2011

2. 学会発表

- 1) Sakiyama T, Iwashita Y, Maeda T, Komaki Y, Taguchi H, Numata M, Fujita H, Musch MW, Chang EB, Tsubouchi H, Glutamine induces intestinal epithelial heat shock response via HSF-1 activation by polyamines, The 6th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium (Tokyo, Japan) 2012/1/28
- 2) Ibusuki K, Sakiyama T, Iwashita Y, Hashimoto S, Kanmura S, Tsubouchi H, Human neutrophil peptides induce IL-8 and ICAM-1 in intestinal epithelial cells, Digestive Disease Week 2011 (Chicago, USA) 2011/5/10
- 3) Yamaji N, Ido A, Setoyama H, Numata M, Moriuchi A, Fujita H, Sakiyama T, Tsubouchi H, Hepatocyte growth factor inhibits colon cancer development in a mouse model of ulcerative colitis, Digestive Disease Week 2011 (Chicago, USA) 2011/5/10
- 4) Iwashita Y, Sakiyama T, Musch MW, Ropeleski MJ, Tsubouchi H, Chang EB, Glutamine enhances heat shock protein expression in intestinal

epithelial cells via HSF-1 activation by polyamines, Digestive Disease Week 2011 (Chicago, USA) 2011/5/9

- 5) Hashimoto S, Uto H, Kanmura S, Sakiyama T, Sasaki F, Ibusuki K, Iwashita Y, Moriuchi A, Fujita H, Setoyama H, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H, Human neutrophil peptides exacerbate experimental colitis through a T cell-independent mechanism, Digestive Disease Week 2011 (Chicago, USA) 2011/5/8
- 6) 橋元慎一、宇都浩文、坪内博仁 Human Neutrophil Peptide-1 は T リンパ球非依存的に DSS 腸炎を悪化させる 第19回日本消化器関連学会週間JDDW2011 福岡 2011/10/21
- 7) 橋元慎一、宇都浩文、寄山敏男、上村修司、岩下祐司、指宿和成、佐々木文郷、屋万栄、田ノ上史郎、那須雄一郎、藤田浩、桶谷真、井戸章雄、坪内博仁 Human Neutrophil Peptide-1 は SCID マウスにおける DSS 大腸炎を増悪する 第48回日本消化器免疫学会総会 金沢 2011/7/21

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

allele 解析からみた薬物代謝酵素遺伝子多型による免疫調節剤の有効性、安全性バイオマーカーの検索

研究協力者 内藤 裕二 京都府立医科大学消化器内科 准教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis; UC) やクローン病 (Crohn's Disease; CD) などの炎症性腸疾患 (IBD) に対する薬物治療として近年、Azathioprine や Tacrolimus などの免疫調節剤が抗炎症作用のみならず、損傷した粘膜の再上皮化作用を有している事が多くの臨床、基礎研究で明らかになっており、IBD の病勢コントロールにおける中心的な役割を果たすようになってきている。それらの免疫調節剤は白血球減少など時に重篤な副作用を認めることがあるため、薬剤の血中濃度を定期的に測定することが必須であるが、高用量の 5-ASA 製剤との併用によって免疫調節剤の血中濃度が予想以上に上昇したり、あるいは患者によって血中濃度が不安定であったりなど、薬剤によるコントロールが困難な例も少なからず認められる。それら薬物の血中濃度を左右するのは thiopurine methyltransferase (TPMT) や CYP3A4 と呼ばれる薬物代謝酵素の存在であり、これまでそれらの代謝酵素の遺伝子多型が薬物の血中濃度に影響を与えることが知られている。しかし、IBD の治療において Azathioprine や Tacrolimus を併用した際の他の薬物の血中濃度とそれらの薬剤の代謝酵素やその応答性遺伝子の多型および病勢コントロールの相関に関する詳細な報告はない。本臨床研究は IBD 患者における免疫調節剤の代謝酵素を含む応答性の遺伝子多型を解析し、それらの遺伝子多型を薬剤血中濃度を決定するジェネティックバイオマーカーとして薬物の血中濃度との相関を検討し、最終的には遺伝子多型から患者個人の免疫調整薬の至適投与量を決定することが主な目的である。

A. 研究目的

近年、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis; UC) やクローン病 (Crohn's Disease; CD) などの炎症性腸疾患 (IBD) に対する薬物治療として Azathioprine や Tacrolimus などの免疫調節剤が IBD の病勢コントロールにおける中心的な役割を果たすようになってきている。それらの免疫調節剤は白血球減少など時に重篤な副作用を認めることがあるため、薬剤の血中濃度を定期的に測定することが必須である。しかし、高用量の 5-ASA 製剤との併用によって血中濃度が予想以上に上昇したり、あるいは患者によって血中濃度が不安定であったりなど、薬剤のコントロールが困難な例も少なからず認められる。それら薬物の血中濃度を左右するのは薬物代謝酵素の存在であり、これまでそれらの代謝酵素の遺伝子多型が薬物の血中濃

度に影響を与えることが知られている。しかし、IBD の治療において Azathioprine や Tacrolimus を併用した際の他の薬物の血中濃度とそれらの薬剤の代謝酵素やその応答性遺伝子の多型および病勢コントロールの相関に関する詳細な報告はない。昨年度からの研究で、IBD 患者における免疫調節剤の代謝酵素を含む応答性の遺伝子多型を解析することで薬物の血中濃度との相関を検討し、最終的には遺伝子多型ならびに併用薬剤から患者個人の免疫調整薬の至適投与量を決定することが主な目的である。

B. 研究方法

本検討では HapMap 由来ヒトリンパ球細胞 30 株を用いて 5-ASA および Azathioprine 刺激にて発現誘導される遺伝子の EAI (Expressing Allele

Inbalance) を EG (Express Genotyping) 法を用いて測定し、複数の細胞株で SNP (遺伝子多型 (一塩基多型)) によって EAI を生じる遺伝子発現を同定する。さらに当院にて Azathioprine 投与中の炎症性腸疾患患者の血液より、同定された遺伝子多型の genotype をそれぞれの患者で測定し、Azathioprine の代謝産物である血中 6-TGN 濃度との相関を検討する。SNP の測定には、末梢静脈血から抽出されたゲノム DNA を用い、シークエンス法もしくはマスアレイ法により実施する。この方法により、特定の遺伝子の genotyping が Azathioprine 投与時の血中濃度決定のバイオマーカーとなり、炎症性腸疾患患者への投与量や投与薬剤の選択についての検討が可能となる。

(倫理面への配慮)

本検討における個人情報情報は情報管理者 (実験責任者: 内藤裕二) によって厳重な管理のもと、守秘義務を遵守する。さらに個人情報管理補助者を設定し、匿名化の作業のみを担当する。また、本検討は、末梢静脈血から抽出したゲノム DNA における遺伝子多型解析を行う為、三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(以後、三省合同倫理指針という。) を遵守しなければならない。解析・検討結果を公表する際には、個人名の漏洩の防止を徹底し、プライバシーの保護に努める。さらに個人に帰属する検討結果を個々に求められた場合、その個人本人のもののみを伝達する旨である。なお、試料の保管には患者を特定できる情報を削除し、代わりに新しく符号を付ける。この符号と個人情報を関連させる対応表は京都府立医科大学医学倫理審査委員会で承認された個人情報管理者のもとで厳重に保管する。

C. 研究結果

HapMap 由来ヒトリンパ球細胞に 5-ASA および Azathioprine にて刺激した際に 2 倍以上の EAI を検出できたプローブ数は全部で 7803 個であった。このうち、3 細胞株以上で共通して有意な EAI を検出できたのは 78 であった。そのうち上位 4 つの

プローブについて患者血液から同定した genotype とそれぞれの患者の血中 6-TGN 値との相関を検討した結果、細胞表面のトランスポーターの一つである *SLC38A9* の遺伝子多型の genotype が、Azathioprine 投与時の血中 6-TGN 濃度と非常に強い相関を示すことが分かった。

D. 考察

ヒトリンパ球細胞に 5-ASA と Azathioprine の刺激によって誘導される SNP を有する遺伝子の EAI の測定が可能であった。本検討では候補遺伝子として *SLC38A9* が同定され、その genotyping は患者の血中 6-TGN 値と強い相関を示した。今後、さらなる症例の蓄積とともに、*SLC38A9* の機能解析をおこなうことで、*SLC38A9* の Azathioprine 投与時の血中濃度予測ジェネティックバイオマーカーとしての有用性、および炎症性腸疾患患者における病態への関与が明らかになると考えられる。

E. 結論

SLC38A9 の genotyping が Azathioprine の至適投与量決定に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
 - 1) Kazuhiko Uchiyama, Yuji Naito et al. The new genetic biomarkers which predict azathioprine blood concentration with 5-aminosalicylic acid as combination therapy for inflammatory bowel disease. United European Gastroenterology Week 2011, Stockholm, 2011 年 10 月 23 日
 - 2) Kazuhiko Uchiyama, Yuji Naito et al. Identification of new genetic biomarkers predicting the blood concentration of

azathioprine administrated with
5-aminosalicylic acid as combination
therapy for inflammatory bowel disease.
Digestive Disease Week 2011, Chicago, 2011
年5月8日

- 3) 内藤裕二 炎症性腸疾患診療の最前線 第38
回日本消化器病学会近畿支部教育講演会、大
阪、2012年1月28日
- 4) 内山和彦、高木智久、内藤裕二 allele 解析
による薬物代謝酵素の遺伝子多型解析を基に
した潰瘍性大腸炎に対する azathioprine のコ
ンパニオン療法、第97回日本消化器病学会総
会、東京、2011年5月14日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

AZT 血中濃度のジェネティックバイオマーカー、特
願2011-103133、平成23年6月16日、発明者：
内藤裕二、内山和彦、根本靖久

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

クローン病腸内細菌叢の多様性解析：多施設共同研究

研究分担者 藤山 佳秀 滋賀医科大学内科学講座消化器内科 教授

研究要旨：我々は、これまで炎症性腸疾患の腸内細菌叢プロファイルの解析を、tRFLP 法を用いて多施設共同研究で行い、クローン病 (CD) 便中細菌叢は活動期・寛解期にかかわらず、健康人 (HI) 腸内細菌叢とは異なるプロファイルを示すことを明らかにしている。今回の検討では tRFLP の OTUs を *ABI3130x1* を用いて再解析を行うとともに、CD 腸内細菌叢の多様性の HI との比較、現時点で得られている 16SrDNA database から CD で特徴的な細菌群の同定を行った。結果、*ABI3103x1* を用いた解析においても CD 腸内細菌叢プロファイルは HI プロファイルとは異なることが検証された。Shannon-Wiener の多様性指数に基づく多様性解析では、CD では制限酵素 *Hha*、*Msp* 処理の何れにおいて有意に HI と比較して多様性の低下を認めた。一方、両酵素処理で得られる OTUs の database との computer simulation を行い、database に確実に一致する細菌群のうち、CD で HI に比して増加するものとして *Bacteroidaceae*、*Lactobacillaceae*、*Ruminococcaceae*、*Alcaligenaceae*、*Neisseriaceae*、*Entetobacteriaceae*、*Pastuerellaceae*、*Xanthomonadaceae*、一方で CD で減少しているものとして、*Actinomycetaceae*、*Coriobacteriaceae*、*Bacteroidaceae*、*Porphyromonadaceae*、*Prevotellaceae*、*Rikenellaceae*、*Clostridiaceae*、*Eubacteriaceae*、*IncertaeSedisXIV*、*Lachnospiraceae*、*Ruminococcaceae*、*Erysipelotrichaceae*、*Rhizobiaceae*、*Burkholderiaceae* が抽出された。

共同研究者

松本譽之 (兵庫医大内科学下部消化管科)
鈴木康夫 (東邦大医療センター佐倉病院)
松井敏幸 (福岡大筑紫病院消化器内科)
本谷聡 (札幌厚生病院 IBD センター)
安藤朗 (滋賀医大大学院消化器免疫分野)

にこれらの症例の寛解導入時期に採取された 51 検体、および寛解維持期に採取された 43 検体の計 161 検体を材料とし、地域、性、年齢をマッチさせた 121 例の健康人便検体を対照とした。tRFLP 解析は既報の通りであるが、フラグメント解析には *ABI PRISM 3130x1 DNA Sequencer* を使用し、クラスター解析は解析ソフト Gene Maths を用い、クラスタリングは pearson correlation、UPGMA によった。

多様性解析は Shannon-Wiener の多様性指数 H' を算定し、Mann-Whitney's U test にて有意差検定を行った。

CD 腸内細菌叢で増加あるいは減少を認めた OTUs (operational taxonomic unit) について、Human Fecal Microbiota T-RFLP Profiling 16S rDNA (rRNA 遺伝子) データベースと *Hha*、*Msp* 両制限酵素 OTUs で統合的に確実に合致する菌群の同定を computer simulation により行った。

A. 研究目的

クローン病 (CD) 腸内細菌叢の特異性を明らかにする目的で、これまでに収集された便材料を対象に *ABI3130x1* を用いた tRFLP 解析の再検証を行うとともに、CD 腸内細菌叢の多様性の健康人 (HI) 腸内細菌叢との比較検討、現時点で得られている 16SrDNA database から CD で特徴的な細菌群の同定を行うことを目的とした。

B. 研究方法

67 例の活動期 CD 症例から得られた便検体、ならび

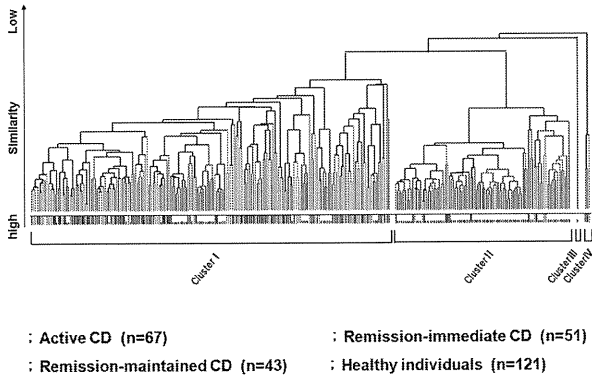
(倫理面への配慮)

CD 症例に関する本解析については、個々参加施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

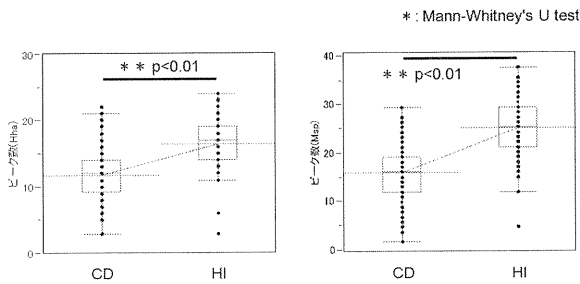
ABI3130x1 を使用したクラスター解析においても、CD 症例便中細菌叢プロファイルは活動期、寛解導入期、寛解維持期にかかわらずそのほとんどが Cluster I に集簇し、健常人の cluster II には小数例を認めるのみであった。ちなみに、Cluster IV の症例は残存小腸 100cm の小腸大腸型小腸切除術既往例である。

【全CD症例vs.健常人のクラスター解析】



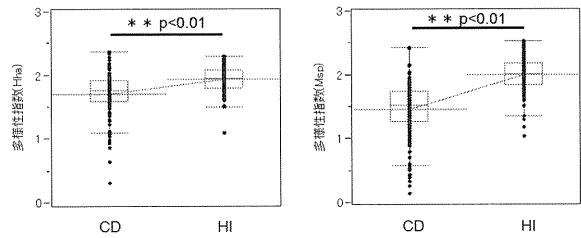
一方、CD の便中細菌叢の多様性は、既報されている報告と同じく *Hha*, *Msp* 両制限酵素断片数は健常人のそれに比して有意に少なく、Shannon-Wiener の多様性解析においても CD で多様性の有意な縮小が確認された。

ピーク数の比較 (CD vs HI)



多様性指数の比較 (CD vs HI)

*: Mann-Whitney's U test



⇒ Shannon-Wiener の多様性指数 H'

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i = -\sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad 0 \leq H'$$

S: 種数; n_i : i 番目の種の個体数; N: 全個体数

S: ピーク数
 n_i : i 番目のピークの OTU
N: 全 OTU の総和

また、*Hha*, *Msp* 両制限酵素断片を統合的に 16SrDNA データベースと computer simulation を行うことにより、以下の CD で HI に比して増減している菌群が同定された。

CD で HI に比して増加している菌属としては、*Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Oscillibacter*, *Parasutterella*, *Neisseria*, *Escherichia*, *Hemophilus*, *Sternotrophomonas* が抽出された。また、CD で HI に比して減少している菌属としては、*Actinomyces*, *Asacchaobacteria*, *Eggerthella*, *Slackia*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Roseburia*, *Anaerotruncus*, *Facalibacterium*, *Lactonifactor*, *Oscillibacter*, *Sporobacter*, *Subdoligranulum*, *Coprobacillus*, *Rhizobium*, *Linnobacter* が抽出された。

<p>CD > HI</p> <p>Bacteroidetes > Bacteroidia > Bacteroidales > Bacteroidaceae > Bacteroides</p> <p>Firmicutes > Bacilli > Lactobacillales > Lactobacillaceae > Lactobacillus</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Ruminococcaceae > Oscillibacter</p> <p>Proteobacteria > Betaproteobacteria > Burkholderiales > Alcaligenaceae > Parasutterella</p> <p>Proteobacteria > Betaproteobacteria > Neisseriales > Neisseriaceae > Neisseria</p> <p>Proteobacteria > Gammaproteobacteria > Enterobacteriales > Enterobacteriaceae > Escherichia</p> <p>Proteobacteria > Gammaproteobacteria > Pasteureliales > Pasteurellaceae > Hemophilus</p> <p>Proteobacteria > Gammaproteobacteria > Xanthomonadales > Xanthomonadaceae > Sternotrophomonas</p>	<p>HI > CD</p> <p>Actinobacteria > Actinobacteria > Actinobacteriales > Actinomycetales > Actinomycetaceae > Actinomyces</p> <p>Actinobacteria > Actinobacteria > Coriobacteriales > Coriobacteriaceae > Coriobacteriaceae > Asacchaobacter</p> <p>Actinobacteria > Actinobacteria > Coriobacteriales > Coriobacteriaceae > Coriobacteriaceae > Eggerthella</p> <p>Actinobacteria > Actinobacteria > Coriobacteriales > Coriobacteriaceae > Coriobacteriaceae > Slackia</p> <p>Bacteroidetes > Bacteroidia > Bacteroidales > Bacteroidaceae > Bacteroides</p> <p>Bacteroidetes > Bacteroidia > Bacteroidales > Porphyromonadaceae > Parabacteroides</p> <p>Bacteroidetes > Bacteroidia > Bacteroidales > Prevotellaceae > Prevotella</p> <p>Bacteroidetes > Bacteroidia > Bacteroidales > Rikenellaceae > Alistipes</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Clostridiaceae > Clostridium</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Eubacteriaceae > Eubacterium</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Incertae Sedes OTU > Blautia</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Lachnospiraceae > Coprococcus</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Lachnospiraceae > Dorea</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Lachnospiraceae > Roseburia</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Ruminococcaceae > Anaerotruncus</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Ruminococcaceae > Facalibacterium</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Ruminococcaceae > Lactonifactor</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Ruminococcaceae > Oscillibacter</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Ruminococcaceae > Sporobacter</p> <p>Firmicutes > Clostridia > Clostridiales > Ruminococcaceae > Subdoligranulum</p> <p>Firmicutes > Erysipelotrichi > Erysipelotrichales > Erysipelotrichaceae > Coprobacillus</p> <p>Proteobacteria > Alphaproteobacteria > Rhizobiales > Rhizobiaceae > Rhizobium</p> <p>Proteobacteria > Betaproteobacteria > Burkholderiales > Burkholderiaceae > Linnobacter</p>
--	---

D. 考察

今回、これまでに収集されたクローン病症例の便中細菌叢由来 16SrDNA (rRNA 遺伝子) について、その tRFLP クラスタ解析をより分解能をあげて解析することを目的として *ABI3130xl* を使用した検証を行った。CD 腸内細菌叢の特異性についてはこれまでの旧世代 DDNA sequencer PRISM AB310 と同様に、クローン病における便中細菌叢の特異性が病期にかかわらず認められることが検証された。さらに、既報されているように便中細菌叢においてもクローン病では細菌叢多様性の縮小が見られることが明らかとなった。

近年の、細菌由来 16SrDNA (rRNA 遺伝子) データベースの膨大な蓄積により、tRFLP 法においても複数の制限酵素を組み合わせることによって菌同定が可能となっている。菌種レベル、菌株レベルでの病態への関与を論じるには、方法論の限界もあり障壁は大きいが、例えば、抗粘膜炎症性特性が明らかにされている *Faecalibacterium* 属 *F. prausnitzii* の単一菌種から構成されていることが知られており、クローン病の病因・病態論的解釈に繋がると思われる。さらに、*Escherichia* については、病態への関与が推察されている AIEC が含まれているかも検証する必要がある。今回、クローン病の病因病態への関与が示唆される菌属レベルでの候補細菌を抽出することができたと思われるが、病原性あるいは生体との相互作用が明らかにされていない細菌も多く、今後、特異的 PCR による解析あるいは当該菌の生体への生理作用の解析に関するさらなる検討が必要となっている。

結論

多施設共同研究により、クローン病における腸内(便)細菌叢の特異性を再検証するとともに、クローン病細菌叢の多様性の縮小を明らかにした。また、tRFLP 法から computer simulation によりクローン病の病因・病態に関与する可能性のある細菌群を抽出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Saito Y, Tsujikawa T, Fujiyama Y: Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gastroenterol.*, 46(4): 479-486, 2011

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
 難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
 分担研究報告書

T-RFLP 法を用いた小児炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢の解析

研究分担者 藤山 佳秀 滋賀医科大学消化器内科 教授

研究要旨： 小児炎症性腸疾患（IBD）患者（寛解期潰瘍性大腸炎；UC、寛解期クローン病；CD）の腸内細菌叢を T-RFLP 法を用いて解析し、健常児と比較した。寛解期 UC 患児の腸内細菌叢プロファイルは健常児のプロファイルとのクラスター解析上の偏りを認めなかったのに対し、寛解期 CD 患児ではプロファイルは異なっていた。両疾患で *Clostridium cluster IV* の減少を認め、クローン病でより顕著であった。小児炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢の変化は成人と同様の傾向であると考えられた。

共同研究者

安藤朗（滋賀医科大学大学院医学系研究科消化器免疫分野）

青松友槻（滋賀医科大学消化器内科）

余田 篤（大阪医科大学小児科）

OTU (operational taxonomic

unit) の全 OTU 面積に対する比率の検討では、両疾患で *Clostridium cluster IV* (OTU 168) の有意な減少を認め、変化は CD でより顕著であった。また、*Bacteroides* (OTU 469) が UC と CD でともに有意に減少していたのに対して、*Lactobacillus* (OTU 657) の有意な増加を認めた。

A. 研究目的

本研究の目的は、これまでほとんど検討されていない小児 IBD 患者における腸内細菌叢の変化を明らかにすることである。

B. 研究方法

臨床的寛解期の小児 IBD 患者（UC：14 人、11.6 ± 2.4 歳、CD：10 人、12.9 ± 5.0 歳）および健常児 27 人（5.4 ± 3.4 歳）の便を採取し、T-RFLP 法（Nagashima 法）で腸内細菌叢を解析した。

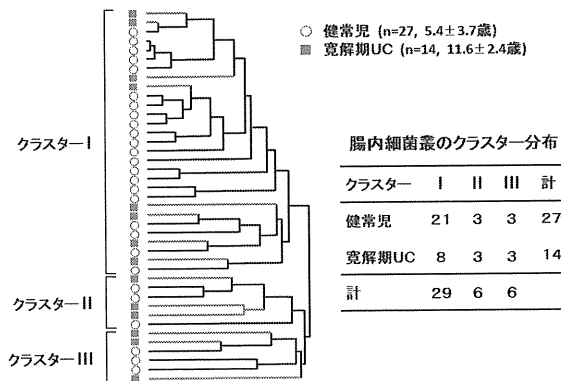
（倫理面への配慮）

本研究は滋賀医科大学倫理委員会にて審査を受け、承認を得ている。

C. 研究結果

クラスター解析を行い、寛解期 UC 患児と健常児の腸内細菌叢に有意なクラスター分布の偏りは認めなかったのに対し、寛解期 CD 患児では健常児とは異なる分布を示す傾向が明らかとなった。各

小児UCの腸内細菌叢（T-RFLP - Nagashima法）



小児CDの腸内細菌叢（T-RFLP - Nagashima法）

