

リンカー部スレオニンリン酸化 smad2/3 蛋白発現による腸管幹細胞マーカーの探索

研究分担者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：正常マウスの小腸と大腸にて anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される細胞を同定し、この細胞が上皮由来の組織幹細胞であることを確認する。DSS 腸炎マウスモデルを用いて、びらん部と再生部においてこの抗体にて認識される細胞を同定し、細胞周期の観点から幹細胞マーカーの可能性を検討する。

共同研究者

岸本真房、鈴木 亮、高橋 悠、福井寿朗、坂口雄沢、内田一茂、西尾彰功（関西医科大学第三内科学講座）

A. 研究目的

幹細胞は、通常の状態ではその細胞分裂は強く抑制され、細胞周期上の G0 期にあり免疫組織学的に Ki67 陰性となる。細胞周期は CDK(cyclin-dependent kinase)-cyclin 複合体、CDK に結合してその活性を抑制する CDKI(CDK inhibitor)の組み合わせやバランスによって各位相への移行が正確に制御されている。CDK4・cyclinD 複合体は Rb 蛋白以外に Smad(2,3)蛋白などもリン酸化し、G1(G0)期から S 期への進行に関与していることも分かっている。anti-pSmad2/3L-Thr 抗体は、Smad(2,3)蛋白の linker 部の Thr がリン酸化された Smad(2,3)蛋白のみに特異的に結合する。anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識されるリン酸化 Smad(2,3)蛋白のリン酸化部位(Thr<sup>220</sup>, Thr<sup>179</sup>)は CDK4 にてリン酸化される部位と一致する。この細胞周期の観点から anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される細胞を同定し、幹細胞マーカーの可能性を検討する。

B. 研究方法

1) 正常マウスの小腸切片と大腸切片において、

二重染色を行い、Ki67 陰性かつ Smad 陽性細胞を検出する。2) 正常マウスの小腸切片と大腸切片において、anti-pSmad2/3L-Thr 抗体と腸管粘膜構成細胞マーカー(Cytokeratin8, Chromogranin A), 細胞周期マーカー(CDK4), これまでに提唱されている消化管上皮幹細胞マーカー(MSI-1)で二重染色を施行する。3) 消化管上皮幹細胞のマーカーとされる Lgr5 遺伝子を発現した細胞が GFP にて発色するよう改変されたマウス(Lgr5 GFP Knock in mouse)の小腸切片と大腸切片を免疫染色し、Smad 陽性細胞との相違を確認する。4) 正常マウスに BrdU 腹腔内投与を施行し、Label retaining assay を行い、Smad 陽性細胞における BrdU の残存を確認する。5) DSS 腸炎モデルマウスにおいても同様の細胞を検索し、びらん部と再生部の Smad 陽性細胞を検討する。

(倫理面への配慮)

この研究は、関西医科大学遺伝子組換え実験安全委員会、動物実験委員会において承認されている。承認番号：12-036(01)

C. 研究結果

正常マウスの小腸では+4 position 付近と一部の CBC 細胞に Ki67 陰性の smad 陽性細胞を認め、大腸では crypt base に Ki67 陰性の smad 陽性細胞を認めた。小腸と大腸で smad 陽性細胞は、cytokeratine 8 陽性、Chromogranin A 陰性であり、CDK4 が強く発現していた。小腸で smad 陽性

細胞は、MSI-1 陽性細胞領域に発現していた。Lgr5 GFP Knock in mouse では、小腸で+ 4 position 付近の smad 陽性細胞は Lgr5 陰性、CBC 細胞領域の smad 陽性細胞は Lgr5 陽性であり、大腸で smad 陽性細胞は Lgr5 陽性であった。BrdU 腹腔内投与を行ったマウスの小腸と大腸で、BrdU 投与後 15 日目まで smad 陽性細胞に BrdU の残存を認めた。DSS 腸炎モデルマウスの大腸では、びらん部は Ki67 と smad 陽性細胞は認めず、再生部は Ki67 陽性細胞と smad 陽性細胞の有意な増加を認めた。

#### D. 考察

smad 陽性細胞が上皮由来の組織幹細胞である可能性を確認した。大腸粘膜の恒常性は上皮細胞の脱落(アポトーシス)と再生のバランスにより保たれているが、腸炎により上皮細胞の増殖は亢進し、Ki67 により標識される増殖細胞出現率が有意に高くなる。この増殖亢進状態においては、上皮幹細胞は細胞分裂を起こす頻度が高くなると考えられる。

#### E. 結論

今回、我々が観察したリン酸化 smad 蛋白陽性細胞は、CDK4 によりリン酸化され、Ki67 陰性の休止期から G1 期に入る時期に発現していると考えられた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukata N, Okazaki K, Omiya M, Matsushita M, Watanabe M; The Members of the Ministry of Health and Welfare of Japan's Inflammatory Bowel Diseases Study Group. Hematologic malignancies in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2013 Aug 19. [Epub ahead of print]
2. Kurishima A, Inaba M, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Nomura S, Okazaki K. Immunoregulatory function of PIR-A/B<sub>2</sub> DCs in the inflammatory responses of dextran sodium sulfate-induced colitis.

- J Gastroenterol. 2013 Sep 29. [Epub ahead of print]
3. Toyonaga T, Nakase H, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Honzawa Y, Hukata N, Yoshino T, Chiba T, Okazaki K. Refractoriness of Intestinal Behçet's Disease with Myelodysplastic Syndrome Involving Trisomy 8 to Medical Therapies - Our Case Experience and Review of the Literature. Digestion. 2013 Nov 16;88(4):217-221.
4. Matsushita M, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. Absence of Large Ulcers Indicate That Viral Therapy is Not Necessary in Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis. J Clin Gastroenterol. 2013 Jan;47(1):90-1.
5. Nakajima A, Fukui T, Takahashi Y, Kishimoto M, Yamashina M, Nakayama S, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Yodoi J, Okazaki K. Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury by prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. J Gastroenterol. 2012 Sep;47(9):978-87
6. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. J Gastroenterol. 2011;46(12):1368-81
7. Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K. Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. Inflamm Bowel Dis. 17(3):683-95, 2011
8. Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, Matsushita M, Nishio A, Tabata Y, Okazaki K. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. J Drug Target. 19(6):458-67, 2011.
9. Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- $\alpha$  production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 17(11):E140-2, 2011

10. Matsushita M, Tanaka T, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. No large ulcer: a predictor of latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 17(6):E27-8, 2011
11. Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. *J Gastroenterol.* 46(4):456-468, 2011
12. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol.* 2011;46(12):1368-81
13. Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K. Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 17(3):683-95, 2011
14. Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, Matsushita M, Nishio A, Tabata Y, Okazaki K. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. *J Drug Target.* 19(6):458-67, 2011.
15. Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- $\alpha$  production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 17(11):E140-2, 2011
16. Matsushita M, Tanaka T, Fukata N, Omiya M, Okazaki K. No large ulcer: a predictor of latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 17(6):E27-8, 2011
17. Hoshino S, Inaba M, Iwai H, Ito T, Li M, Eric Gershwin M, Okazaki K, Ikehara S. The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis. *J Autoimmun.* 34(4):380-9, 2010.
18. Omiya M, Matsushita M, Tanaka T, Kawamata S, Okazaki K. The absence of large ulcer predicts latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis with positive mucosal viral assay. *Intern Med.* 49(21):2277-82, 2010.

和文

1. 岡崎 和一, 深田 憲将, 安藤 祐吾, 大宮 美香, 岡崎 敬, 栗島 亜希子, 松下 光伸 炎症性腸疾患におけるリンパ増殖性疾患 胃と腸 2013 ; 48:763-769
2. 岡崎和一、深田憲將、大宮美香、岡崎 敬、栗島亜希子、松下光伸 IBDとリンパ増殖性疾患 IBD Research 2012 : 6212-219
3. 田中 篤, 田妻 進, 岡崎 和一, 坪内 博仁, 乾 和郎, 滝川 一 硬化性胆管炎の全国調査 胆道 2013 ; 27 : 176-187
4. 岡崎 和一, 福井 由里, 住本 貴美, 岡崎 敬, 栗島 亜希子 【難治性 Crohn 病の特徴と治療戦略】 全身性合併症の特徴 腸炎 胃と腸 2012 ; 47:1559-1565
5. 若松 隆宏, 島谷 昌明, 諏訪 兼彦, 堀 雄一, 谷村 雄志, 津久田 諭, 松本 泰司, 吉井 將哲, 宮本 早知, 福井 由理, 三好 秀明, 深田 憲将, 松下 光伸, 岡崎 和一 【小腸潰瘍性病変の的確な診断と概念の確立】 小腸潰瘍性病変における内視鏡と放射線学的検査の比較を通じた診断アルゴリズム 消化器内科 2012 ; 54:534-539
6. 岡崎 和一, 栗島 亜希子, 岡崎 敬, 安藤 祐吾 【クローン病の Therapeutic Strategy-mucosal healing は治療のゴールか】 クローン病治療戦略 どのような患者に用いるか 今後の新規治療 Intestine 2012 ; 16:275-281
7. 岡崎 和一, 深田 憲将, 大宮 美香, 松下 光伸 スペシャルシチュエーションにおける IBD 診療】 IBD 患者における血液増殖性疾患の現状 2012 ; 6:28-33
8. 星野 勝一, 岡崎 和一 【免疫統御からみた新しい IBD 治療】 免疫制御性樹状細胞からみた IBD 治療へのアプローチ IBD Research 2011 ; 5:239-244
9. 岡崎 和一, 栗島 亜希子, 岡崎 敬, 松下 光伸 【炎症性腸疾患-病因解明と診断・治療の最新知見-】 炎症性腸疾患の内科的治療 炎症性腸疾患の内科的治療戦略 潰瘍性大腸炎の内科的治療戦略 日本臨床、70 巻増刊 1 炎症性腸疾患 Page273-279 2012 年

10. 岡崎 和一, 松下 光伸, 池浦 司, 高岡 亮  
炎症性腸疾患と膵炎 日本臨床 別冊膵臓  
症候群 Page214-219、2011年
2. 学会発表
  1. Takashi Okazaki, Akiyoshi Nishio, Yutaku Sakaguchi, Toshiro Fukui, Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki. Endoplasmic Reticulum Stress Inhibitor Salubrinal protects against Murine Experimental Colitis via the PERK-eIF2 $\alpha$  signaling pathway. DDW2013 Orland County Convention Center (Orland/Florida) 2013年5月18-21日
  2. Yu Takahashi, Toshiro Fukui, Ryo Suzuki, Masanobu Kishimoto, Kazushige Uchida, Koichi Matsuzaki, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki Phosphorylation of Smad2/3 in Stem Cells of Small Intestine. 21th United European Gastroenterology Week Internationales Congress Centrum Berlin, Berlin, Germany 2013/10/12-16
  3. Okazaki K. Lymphoproliferative disorders in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. 6th Korea-Japan IBD symposium, Tokyo, 2012/1/28
  4. Takashi Okazaki, Akiyoshi Nishio, Yutaku Sakaguchi, Toshiro Fukui, Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki. Amelioration of endoplasmic reticulum stress through enhanced PERK signaling attenuates murine experimental colitis. UEGW2012 (United European Gastroenterology Week) Amsterdam RAI Exhibition & Convention Centre [Amsterdam, The Netherland) 2012年10月24日
3. 高橋 悠 福井寿朗 岡崎和一 pSmad2/3L-Thrの消化管幹細胞マーカーとしての検討とその応用 第99回日本消化器病学会総会 東京 2013/3/21-23
- 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

#### 国内学会

1. Okazaki T, Nishio A, MTakeo M, Inoue T, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Okazaki K. Endoplasmic Reticulum Stress Inhibitor Salubrinal protects against Murine Experimental Colitis via the PERK-eIF2 $\alpha$  signaling pathway. The 1<sup>st</sup> Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (AOCC) ホテルラフォーレ東京 (品川) 2013年6月13日
2. 岸本真房 鈴木亮 高橋悠 福井寿朗 坂口雄沢 内田一茂 西尾彰功 岡崎 和一  
リンカー部スレオニンリン酸化smad2/3蛋白発現による腸管幹細胞マーカーの探索 第50回日本臨床分子医学会学術集会 東京 2013/4/12-13

## DSS 誘発性腸炎におけるメタボローム解析

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、DSS 誘発性腸炎のモデルマウスを用いて、メタボローム解析を行った。メタボロミクスは様々な腸炎の程度を反映し得ること、またメタボロミクスによって炎症性腸疾患に対する治療物質を発見できる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

メタボロミクスは、様々な条件の下における低分子量代謝産物の特徴・相互作用を包括的・網羅的に探索する研究手法である。そこで、炎症性腸疾患の病態解明を目的としてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性腸炎のマウスから採取した血清と大腸組織を用いて、GC/MS によるメタボローム解析を行った。

### B. 研究方法

6-8 週齢の C57BL/6 マウスに 3%DSS 溶液を 5 日間投与し、その後水に変更し 10 日目まで観察した。体重変化、便の性状などの臨床症状を毎日観察した。7 日目と 10 日目に血清採取、および、大腸を取り出して大腸長を測定後、ホルマリン固定した後に切片作成・HE 染色し組織学的検討を行った。炎症の程度を既法に基づき数値化した。体重変化、臨床症状、組織学的変化より、7 日目は炎症期、10 日目は炎症収束期と考えて矛盾しないことを確認した。この炎症期群と炎症収束期群に対照群を加えた 3 群に分類し、血清と大腸組織を用いてメタボローム解析を行い比較検討した。各検体から水溶性代謝産物を抽出し、誘導体化の処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010plus) を用いて、代謝産物の網羅的な測定・解析を実施した。また、グルタミンを DSS 誘発性腸炎のモデルマウスに添加した実験を試み

た。このグルタミン添加した DSS 誘発性腸炎モデルマウスから、血清と大腸粘膜組織を採取しメタボローム解析を行い、グルタミン値を測定した。さらに、潰瘍性大腸炎患者と健常人から採取した血清と組織を用いたメタボローム解析を行った。

(倫理面への配慮)

神戸大学動物実験委員会の規約に沿い、動物への倫理的配慮を行った。

### C. 研究結果

#### 1) DSS 誘発性腸炎におけるメタボローム解析

血清からは 77 の代謝産物を、大腸組織からは 92 の代謝産物を同定し得た。炎症期と炎症収束期において、非炎症期に比して有意に変動する代謝産物を同定することができた。この組織から同定した 92 の代謝産物のデータを用いて、多変量解析を行ったところ、炎症期と炎症収束期、非炎症期のグループ化が可能であった。

#### 2) グルタミン添加による DSS 誘発性腸炎への影響

この腸炎モデルマウスの大腸組織を用いたメタボローム解析の結果、グルタミン値は 7 日目でグルタミン値は有意に減少し、10 日目で正常値まで回復している傾向が見られた。そこで、グルタミンを DSS 誘発性腸炎のモデルマウスに添加した実験を試みたところ、グルタミン投与を行った群では腸炎の程度が改善している結果が得られた。このグルタミン添加した DSS 誘発性腸炎モデルマウ

スから、血清と大腸粘膜組織を採取しメタボローム解析を行い、グルタミン値を測定した。DSSを投与していない群にグルタミンを添加しても血清中、組織中のグルタミン値に変化は認められなかった。DSS投与を行った群では、グルタミン値は血清でも組織でも有意に減少し、DSS投与後にグルタミン添加を行った群では、血清中のグルタミン値は減少していたが、組織においては4%グルタミンを添加した群において増加する傾向が見られた。

### 3) 潰瘍性大腸炎患者の血清と組織におけるグルタミン値

UC患者と健常人から採取した血清と組織を用いたメタボローム解析を行った。UC患者の血清グルタミン値は健常人に比して有意に減少しており、UC患者の炎症部位の組織中のグルタミン値は、非炎症部中の値に比して減少している結果が得られた。この結果はモデルマウスでのグルタミン値の結果と一致していた。

## 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、ある状況の下での低分子量代謝産物の特徴や相互関係を包括的・網羅的に探究する研究手法である。したがって、メタボローム解析を行うことで、細胞や組織の代謝過程についての様々な情報を得ることができる。今回の研究結果では腸炎の進展に伴って代謝産物が増加することから、腸炎が生じることによってメタボローム解析結果に変化をもたらすことを示唆している。このように、メタボローム解析の手法をとることによって、ある疾患についての遺伝的背景と疾患進展過程とどちらもふまえた代謝過程の全体的な展望をみることができると考える。また、今回の研究では、組織から得られた92の代謝産物のデータに基づいて、多変量解析であるPLS-DA scores plotsを行った。PLS-DA loadings plotsの中で腸炎の進展をよく反映して変動した物質のひとつにグルタミンがあった。グルタミンは腸炎の進展によって典型的に変動した物質のひとつでもあり、炎症期にはグルタミン値は有意に減少し、

炎症収束期には非炎症期のレベルまで回復している。この結果は、グルタミンの吸収と消費のバランスによるものであり、グルタミン値は炎症の程度によって変動することを示唆する。グルタミンは腸管粘膜における主なアミノ酸源であり、腸管粘膜の主な呼吸基質でもある。腸管粘膜にとってグルタミンは主要なエネルギー源であり、統合性を保つのに一役かっている。このグルタミンを添加した実験結果から、グルタミン投与によって治療的効果を得られることが示唆された。この効果は、腸粘膜への栄養供給が増加したことと、免疫細胞の機能が增強したことによると考えられる。グルタミンは腸管損傷に対し効果的に機能し、腸管動脈経路だけでなく、管腔経路によってさらなるグルタミンの吸収、代謝の促進につながり、腸管損傷に対してさらに効果的に作用すると考えられる。さらに、このモデルマウスでのグルタミン値の結果は、潰瘍性大腸炎の患者から採取した検体を用いた実験結果とも一致しており、メタボロミクスの有用性が示された。

## E. 結論

炎症性腸疾患モデルマウスの血清と腸組織を用いてメタボローム解析を行ったところ、メタボロミクスは様々な腸炎の程度を反映しうることと、メタボロミクスによってIBDの治療物質を発見でき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

Shiomi Y, Nishiumi S, Ooi M, Hatano N, Shinohara M, Yoshie T, Kondo Y, Furumatsu K, Shiomi H, Kutsumi H, Azuma T, Yoshida M. A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Inflam Bowel Dis*, 17(11):2261-74 (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) なし

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。

を行った。

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

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

健常人、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人においては、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*, 60(9):831-40, (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)

なし



### 腸内細菌関連炎症性腸疾患バイオマーカーの開発

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：炎症性腸疾患の診断・治療に有用な腸内細菌関連バイオマーカーの開発を行うことを目的とし、多施設共同研究により tRFLP 法による炎症性腸疾患腸内細菌プロファイル解析を行い。そのクラスター解析にて炎症性腸疾患とくにクローン病における特異性を明らかにした。さらに、Data Mining 手法によりクローン病の病態に関与する候補菌群を明らかにした。

#### A. 研究目的

炎症性腸疾患の診断・治療に有用な腸内細菌関連バイオマーカーの開発を行うことを目的とし、多施設共同研究を行った。

#### B. 研究方法

共同研究者

松井敏幸（福岡大筑紫病院消化器内科）

鈴木康夫（東邦大医療センター佐倉病院）

本谷 聡（札幌厚生病院 IBD センター）

故松本馨之・中村志郎（兵庫医大下部消化管科）

小林登志夫（宮城大学）

便中細菌叢を、細菌由来 16S ribosomal 遺伝子を標的とした制限酵素断片長多型解析法（rRFLP 法）にて得られたデータを系統樹展開し、クローン病の病態バイオマーカーとしての便細菌叢プロファイルを検討した。対象は 4 施設のクローン病 67 症例と居住地域・性別・年齢をマッチさせた健常対照 121 名であり、その再現性について地域を異にする 1 施設のクローン病 21 例で検証した。

また、上記 tRFLP 解析で蓄積された断片 OTU s データについて Data Mining 手法により、健常人とクローン病さらにはクローン病の活動性に寄与する制限酵素断片を検討するとともに、16S ribosomal 遺伝子 data base より候補細菌群の同

定を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、参加各施設の倫理委員会の承認の下に実施した。分担研究者施設では平成 19 年 4 月 24 日に承認を得ている。（なお、本研究はイーエヌ大塚製薬株式会社と参加各施設との共同研究契約締結の下で行われたことを付記する。）

#### C. 研究結果

クローン病における便細菌叢プロファイルはその病態にかかわらず対照健常人のそれとは異なる特異的なプロファイルを示すことを系統樹クラスター解析にて明らかにした。この結果の再現性は検証解析にて確認された。また、クローン病の活動性 CDAI と関連の認められる OTUs を抽出しロジスティック解析にて CDAI 予測式を策定したところ、予測確率と観測データの 82.6%の一致率、76.8%の識別率が得られた。

この結果は、tRFLP 法によるクローン病腸内細菌叢プロファイル解析が、クローン病に特異的な診断バイオマーカーになるとともに、その活動性のバイオマーカーになる可能性を示唆している。

一方で、潰瘍性大腸炎における腸内細菌叢プロファイルは活動期と寛解期で異なり、寛解期では健常人クラスターに属する症例の多いこと、また菌種レベルでは便中 *Faecalibacterium prausnitzii* の RT-PCR 産物量がクローン病の活動性を反映することを分担研究者の施設で明らかに

している。

一方、Data Mining 解析では健常人腸内細菌に地域差の存在が明らかにされた。また、本 Data Mining 解析にてクローン病と健常人を識別する OTU は制限酵素 *HhaI*-93 断片であり、上記 data base からは *Desulfovibrio* と *Lawsonia* に合致した。*Desulfovibrio* は真正細菌で硫酸還元酵素有するとともに有機酸代謝系を持つ。クローン病検体では健常人検体に比して減少するが、minor population として健常人より増加する群が存在する。減少する群においては *MspI*-208 (酪酸産生菌 *Coprococcus*, *Clostridium* cluster XIVa に属する *Dorea*, *Roseburia*, ならびに *Balautia*) の減少群にクローン病とくに活動期検体が集簇する。一方で *MspI*-208 増加群には健常人検体が含まれ、これはさらに *MspI*-53 (*Faecalibacterium*) 増加例でその比率は高くなるとともに、活動期クローン病検体がみられなくなる。*MspI*-208 減少群では *HhaI*-32 (*Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Subdoligranulum*) 増加例で寛解維持期クローン病検体が、減少例で活動期クローン病検体の比率が高くなる。そして *HhaI*-1064

(*Peptostreptococcus*) 減少例にクローン病活動期検体の多くが集約される。

以上の結果から、クローン病では硫酸還元菌等の減少例と著増例に大別される可能性、酪酸産生菌等がその活動性に寄与する可能性が示唆された。

#### D. 考察

炎症性腸疾患のクローン病・潰瘍性大腸炎の病態に腸内細菌が関与していることは、最近の細菌由来 16S ribosomal 遺伝子の網羅的やメタゲノム解析からも明らかになってきている。tRFLP 法は腸内細菌叢をプロファイル解析するものであるが、多数例を短時間で解析できるメリットがあり、本法は臨床応用も比較的容易な炎症性腸疾患の腸内細菌関連バイオマーカーとして位置づけられるものと考察される。

一方で、tRFLP 解析で蓄積された膨大な OTUs データの Data Mining 手法による解析は、細菌由来

16S ribosomal 遺伝子 data base を活用することにより、とくにクローン病において tRFLP 法の腸内細菌叢全体像をプロファイルとしてとらえる検討から、クローン病の病態と活動性に関与する細菌群の絞り込みへの可能性をもたらすものと考えられる。今後、pyrosequence などによる菌種・菌株レベルでの解析に繋がることが期待される。

#### E. 結論

tRFLP 法による腸内細菌叢プロファイルのクラスター解析が炎症性腸疾患のバイオマーカーとなることを明らかにした。すなわち、潰瘍性大腸炎では寛解期に健常人クラスターに近似する例があるのに対して、クローン病では活動期、寛解期にかかわらず健常人クラスターとは異なるクラスターを形成する特徴を保持する。また、Data Mining 手法を導入することによりクローン病の病態・活動性に関与する細菌群が同定できる可能性が示唆される結果が得られたと考えられる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Andoh A, Kobayashi T, Kuzuoka H, Suzuki Y, Matsui T, Nakamura S, Matsumoto T, Fujiyama Y, Bamba T. Data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphism shows geographical differences in the human gut microbiota. *Biomedical Reports* 1(4):559-562, 2013

2) Imaeda H, Bamba S, Takahashi K, Fujimoto T, Ban H, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Andoh A. Relationship between serum infliximab trough levels and endoscopic activities in patients with Crohn's disease under scheduled maintenance treatment. *J Gastroenterol.* 2013 E-pub May 11.

3) Takahashi K, Imaeda H, Fujimoto T, Ban H, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Andoh A. Regulation of eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 expression by T helper type 2 cytokines in human colonic myofibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 2013 Aug;173(2):323-31

4) Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kasumi E, Ban H, Bamba S, Sonoda H, Shimizu T, Fujiyama Y, Andoh A.

Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2013 Jun;172(3):410-6

5) Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Apr;28(4):613-9

6) Aomatsu T, Imaeda H, Fujimoto T, Takahashi K, Yoden A, Tamai H, Fujiyama Y, Andoh A. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the gut microbiota profiles of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestion.* 2012;86(2):129-35

7) Andoh A, Kuzuoka H, Tsujikawa T, Nakamura S, Hirai F, Suzuki Y, Matsui T, Fujiyama Y, Matsumoto T. Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2012 Dec;47(12):1298-307

8) Takedatsu H, Mitsuyama K, Mochizuki S, Kobayashi T, Sakurai K, Takeda H, Fujiyama Y, Koyama Y, Nishihira J, Sata M. A new therapeutic approach using a schizophyllan-based drug delivery system for inflammatory bowel disease. *Mol Ther.* 2012 Jun;20(6):1234-41

9) Imaeda H, Andoh A, Fujiyama Y. Development of a new immunoassay for the accurate determination of anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2012 Feb;47(2):136-43

10) 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.* 2011 Apr;46(4):479-86

11) Kobori A, Yagi Y, Imaeda H, Ban H, Bamba S, Tsujikawa T, Saito Y, Fujiyama Y, Andoh A. Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2010 Oct;45(10):999-1007.

## 2. 学会発表

1) Bamba S, Tsujikawa T, Ban H, Imaeda H, Mochizuki Y, Inatomi O, Sasaki M, Saitoh Y, Andoh A, Fujiyama Y. Predicting mucosal healing in Crohn's disease using practical indices with regard to the location of active disease. *United European Gastroenterology Week 2013.* Berlin, 2013年10月15日

2) Fujimoto T, Imaeda H, Iakahashi K, Kanda T, Fujiyama Y, Andoh A. Evaluation of and

quantification of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *16th International Congress of Mucosal Immunology.* Vancouver, 2013年6月18日

3) Takahashi K, Imaeda H, Fujimoto T, Knada T, Fujiyama Y, Andoh A. Counter-regulation of eotaxin-3/CCL26 expression by Th1 and Th2 cytokines in human colonic myofibroblast. *16th International Congress of Mucosal Immunology.* Vancouver, 2013年6月18日

4) Ban H, Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kanda T, Osaki R, Bamba S, Sasaki M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Andoh A. The ATP-cassette binding protein 4 (ABCC4)/ multidrug resistance protein 4 (MRP4) polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis.* Tokyo, 2013年6月13日

5) Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Bamba S, Sasaki M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Andoh A. Accurate determination of serum adalimumab and anti-adalimumab antibodies levels during maintenance therapy for Crohn's disease. *Digestive Disease Week 2013 (The Annual Meeting of American Gastroenterology Association).* Orland, 2013年5月19日

6) Imaeda H, Andoh A, Takahashi K, Fujimoto T, Ban H, Bamba S, Fujiyama Y. Serum infliximab trough levels above 1.0 microgram/ml are required to obtain clinical efficacy in patients with Crohn's disease. *2012 Advances in Inflammatory Bowel Diseases. Crohn's & Colitis Foundation's National Clinical & Research Conference.* Hollywood, 2012年12月14日

7) Fukunaga K, Watanabe K, Ito H, Sawada K, Nishishita M, Fujiyama Y, Okazaki K, Matsumoto T. Quality of life after remission induction by adsorptive granulocyte/monocyte apheresis predicts the long-term prognosis of ulcerative colitis patients: A prospective multicenter study. *Digestive Disease Week 2012 (The Annual Meeting of American Gastroenterology Association).* San Diego, 2012年5月19日

8) Imaeda H, Andoh A, Ban H, Bamba S, Sasaki M, Tsujikawa T, Fujiyama Y. The new immunoassay for the accurate determination of antibodies to infliximab, and relationship between its serum level and inflammatory values in Crohn's disease. *Digestive Disease Week 2012 (The Annual Meeting of American Gastroenterology Association).* San Diego, 2012年5月19日

9) Andoh A, Imaeda H, Fujiyama Y. Molecular analysis of the diversity of the gut microbiota of health and disease (IBD) in Japanese population. *The 3rd International Forum of the 98th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology.* Tokyo, 2012年4月20日

10) Andoh A, Fujiyama Y. Therapeutic approaches

targeting gut microbiota in inflammatory bowel disease. International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods. Sapporo, 2011年11月15日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2010-110437 (平成 22 年 5 月 12 日) 名称

: クロウン病の活動性の分類 発明者: 松本譽之、藤山佳秀、安藤朗、松井敏幸、鈴木康夫、葛岡博之、定方めぐみ 特許出願人: イーエヌ大塚製薬株式会社、学校法人兵庫医科大学、国立大学法人滋賀医科大学、学校法人福岡大学

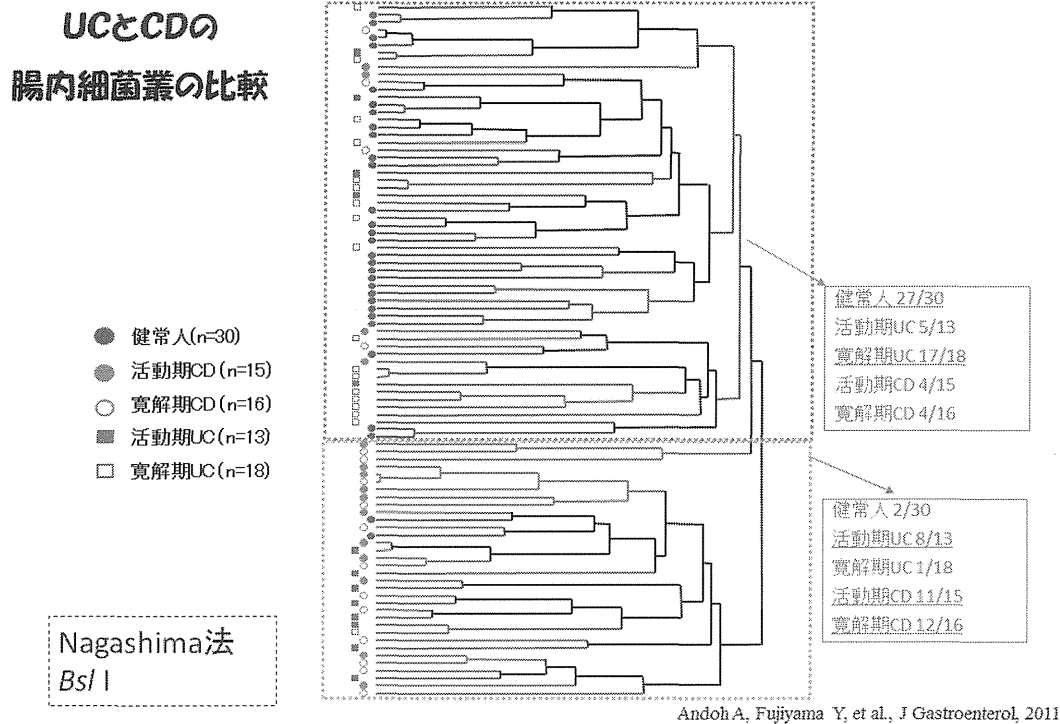
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

付図1 tRFLP Dendrogram of fecal microbiota profile of patients with Crohn's disease or ulcerative colitis



付図2 tRFLP Dendrogram of fecal microbiota profile of patients with Crohn's disease

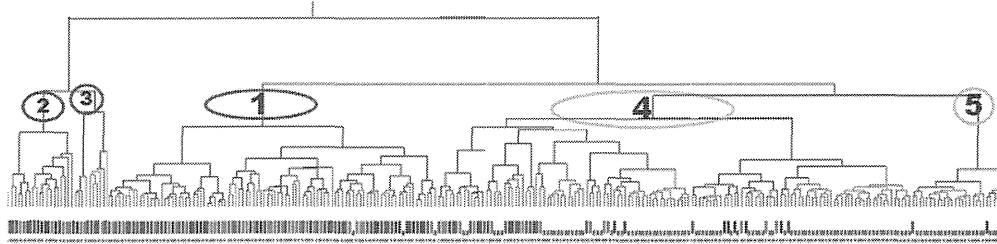
Journal of Gastroenterology

December 2012, Volume 47, Issue 12, pp 1298-1307

### Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease

Akira Andoh · Hiroyuki Kuzuoka · Tomoyuki Tsujikawa · Shiro Nakamura · Fumihito Hirai · Yasuo Suzuki · Toshiyuki Matsui · Yoshihide Fujiyama · Takayuki Matsumoto

赤:治療開始活動期(67), 緑:寛解導入期(51), 青:寛解維持期(43), 紫:健常者(121)



Department of Lower Gastroenterology,  
Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan

Department of Gastroenterology, Fukuoka University Chikushi  
Hospital, Chikushino, Japan

Department of Internal Medicine, Toho University Sakura  
Medical Center, Sakura, Japan

Research and Development Laboratories, EN Otsuka  
Pharmaceutical Co., Ltd., Hanamaki, Japan

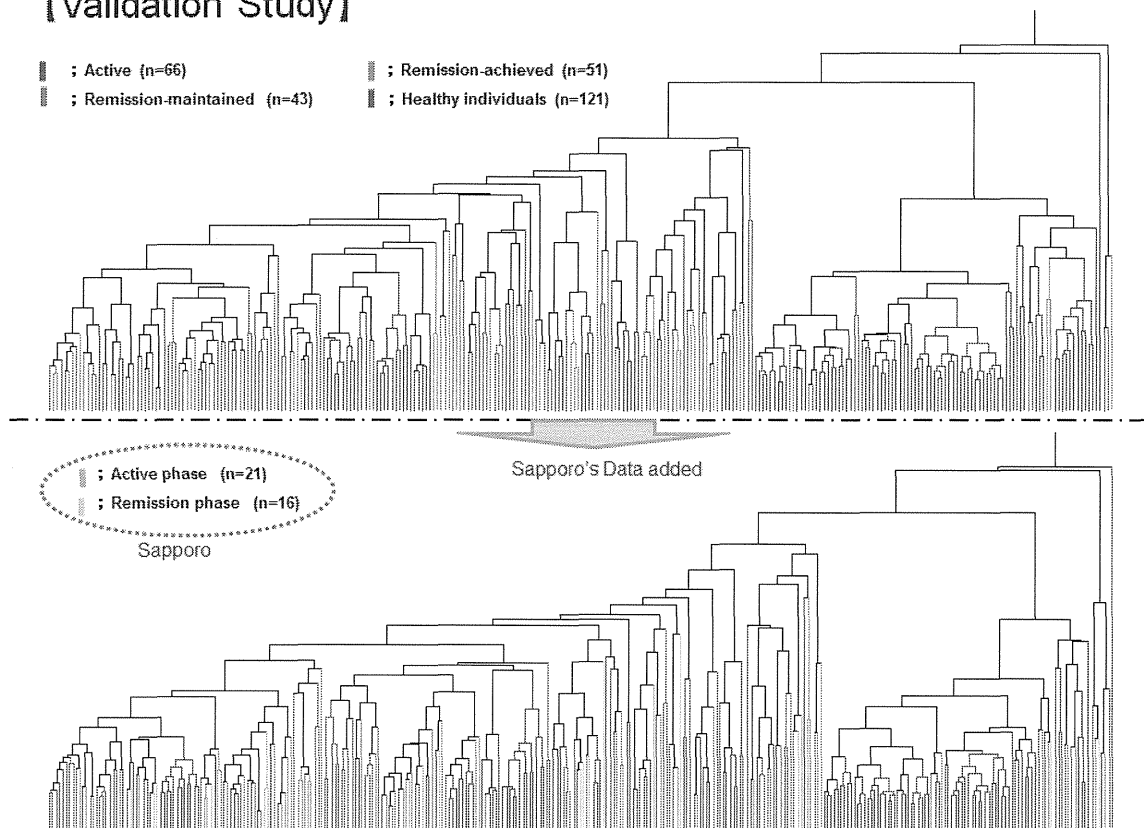
Department of Medicine, Shiga University of Medical Science,  
Otsu, Japan

Division of Mucosal Immunology, Graduate School,  
Shiga University of Medical Science, Seta Tukinowa,  
Otsu 520-2192, Japan

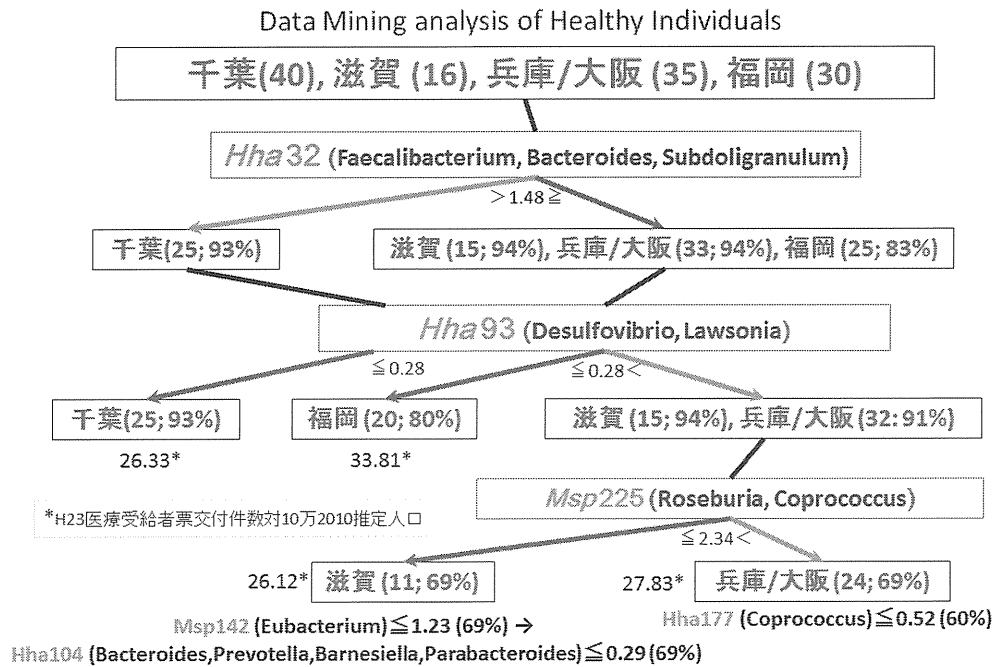
付図3 tRFLP Dendrogram (Validation) of fecal microbiota profile of patients with Crohn's disease

### 【Validation Study】

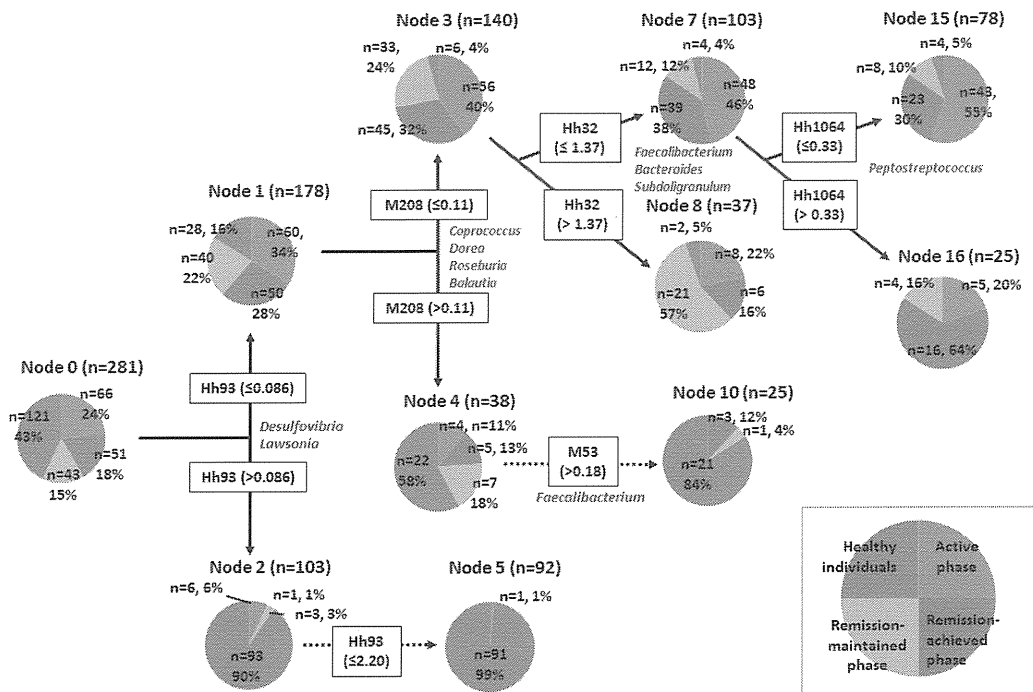
- ; Active (n=66)
- ; Remission-achieved (n=51)
- ; Remission-maintained (n=43)
- ; Healthy individuals (n=121)



付図4 Data Mining analysis of fecal microbiota of healthy individuals



付図5 Data Mining analysis of fecal microbiota of patients with Crohn's disease



### 新規乳酸菌由来の活性物質による新規腸炎治療の開発

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学 教授

研究要旨: 麦芽乳酸菌SBL88由来の生理活性物質を同定し、これを用いた新規腸炎治療法を開発する目的で、(1) 麦芽乳酸菌SBL88の培養上清を解析し、細胞保護作用を持つ生理活性物質を同定する（この物質が菌由来のポリリン酸であることを証明した）。(2) マウス慢性炎症モデルにおける腸管障害や線維化に対するポリリン酸の治療効果、(2) 上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明、(3) 腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌SBL88の安全性と治療効果、に関する研究を行った。その結果、(1) ポリリン酸は慢性腸炎における炎症性サイトカイン過剰発現を抑制し、CTGF、コラーゲンIVなどの線維化促進分子の過剰発現を抑制することで、肉眼的、組織学的な腸管障害および線維化を改善すること、(2) ポリリン酸は上皮細胞膜のintegrin b1と結合し、引き続いてlipid raftを介したendocytosisによって上皮細胞内に取り込まれ作用を発揮すること、(3) 腹部症状のある症例に対して麦芽乳酸菌SBL88死菌を投与した結果、有害事象の発生はなく、腹痛や便通異常の改善が認められることを、明らかにした。以上から、ポリリン酸は、慢性腸炎モデルにおける腸管障害や線維化を改善し、その作用機序には上皮細胞膜のintegrin b1を介したendocytosisが関与していることが明らかとなった。また、ヒト臨床試験によって麦芽乳酸菌SBL88の安全性が確認され腹部症状の改善効果が期待された。さらに本研究成果を基盤として、他の助成金も獲得しており（「文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム（シーズB）」）、今後、新規腸炎治療薬の開発・臨床応用を目指す。

#### A. 研究目的

プロバイオティクスは、感染性腸炎、抗生剤起因性腸炎、小児壊死性腸炎、炎症性腸疾患などへの治療応用が試みられているが、その効果は報告によって異なり一定の見解は得られていない。これは、個々のプロバイオティクスの腸管保護作用や抗炎症作用のメカニズムについて不明な点が多いため、各疾患の病態や個々の宿主の腸内環境に適したプロバイオティクスを選択することが困難であることに起因すると考えられる。

我々は、プロバイオティクスであるバシラス菌の培養上清から腸管保護活性物質である、competence and sporulation factor (CSF)の同定に成功し、炎症性腸疾患に対する新規治療開発への応用を試みてきた。その成果として、急性腸炎モデルにおけるCSFの治療効果について明らかに

してきた(Fujiya, Kohgo, *Cell H&M*, 2007) (Fujiya, Kohgo, *IBD*, 2011) (Okamoto, Fujiya, Kohgo, *Int J Colorectal Dis*, 2012)。さらに、新規乳酸菌SB88にも強い腸管障害改善作用があることを明らかにし(Ueno, Fujiya, Kohgo, *IBD*, 2011)、その作用は本菌が分泌するポリリン酸 (poly P) によって仲介されることを示した(Segawa, Fujiya, Kohgo, *PLoS One*, 2011)。

本研究の目的は、(1) マウス慢性炎症モデルの腸管障害や線維化に対するポリリン酸の治療効果、(2) 上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明、(3) 腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌 SBL88 の安全性と治療効果を明らかにすることである。

#### B. 研究方法

##### 1. 新規乳酸菌 SB88 由来の腸管保護活性物質の同



定

新規乳酸菌 SB88 培養上清を硫安分画および各種カラムを用いて分離し、各分画を用いて Caco2/bbe 細胞における細胞防御蛋白 Heat shock protein (Hsp) 27 の誘導能を調べる。誘導能を持つ分画を反復して絞り込み、質量分析器、糖鎖分析、成分解析により活性物質の構造を決定する。

新規乳酸菌の活性物質による腸管保護作用の検討する目的でマンニトール漏出試験を行った。具体的には、マウス摘出腸管に新規乳酸菌の活性物質を 2 時間反応させた後、腸管内腔に  $^3\text{H}$  標識マンニトールおよびモノアミンを封入して酸化ストレス下に置く。15 分、30 分後に腸管外に漏出したアイソトープの量からマンニトール漏出量を算出した。

2. マウス慢性炎症モデルの腸管線維化に対するポリリン酸 (poly P) の治療効果

6 週齢の C57Bl/6 マウス (Sankyo Labo service Co, Japan) に 3% DSS を day 1 から 5 まで自由飲水させた後、day 6 以降は蒸留水を自由飲水させ、慢性腸炎モデルマウスを作成した。慢性腸炎モデルマウスを、① day 1 より蒸留水のみを飲水させた control 群、② day 25 から 34 までの 10 日間連日 PBS を注腸投与する PBS 注腸群、③ day 25 から 34 までの 10 日間連日 100mg/ml のポリリン酸を注腸投与するポリリン酸注腸群の 3 群 (各群 n=5) に分け、day 35 にマウス大腸を摘出後、腸管粘膜を回収し、一部をホルマリン固定後、残りのサンプルからタンパク・RNA を抽出した。検討項目は腸管長、組織学的所見、炎症および線維化関連メディエーターの発現 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , TGF  $\beta$  1, IL-1  $\beta$ , IL-4, IL-10, CTGF, Smad4) とした。

3. 上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明

腸管上皮由来細胞を用いて、種々の細胞表面分子の発現抑制細胞株を作製し、ポリリン酸の作用の変化を検討した。その結果、上皮細胞 integrin がポリリン酸の作用を仲介していると考えられた。そこで、 $^{32}\text{P}$  にてアイソトープ標識したポリリン酸を integrin  $\beta$  1 および  $\beta$  3 と反応させ、それぞれ

の抗体で免疫沈降し、アイソトープの測定を行い、ポリリン酸との結合能を調べた。Integrin  $\beta$  1 の shRNA を caco2/bbe 細胞に導入した。この Integrin  $\beta$  1 抑制 Caco2/bbe 細胞に標識ポリリン酸を添加し、ポリリン酸の動態の変化を調べた。また、Endocytosis の影響を調べる目的で、clathrin および caveolin の inhibitor を用いて、ポリリン酸の作用の変化を調べた。細胞のバリア機能については、トランスウエルに単層培養した caco2/bbe 細胞に  $^3\text{H}$  標識マンニトール添加し、モノアミンによる酸化ストレスを加え 60 分、120 分、180 分後に透過した  $^3\text{H}$  標識マンニトール量を計測して算出した。

4. 腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌 SBL88 の安全性と治療効果

何らかの腹部症状を持つ患者で本試験を理解され書面にて同意が得られた 20 人を無作為に 2 群に分け、100  $\mu\text{g}$  の麦芽乳酸菌およびプラセボを 30 日間投与して、有害事象の発現および腹部症状の変化を調べた。

C. 研究結果

(1) 新規乳酸菌 SB88 由来の腸管保護活性物質の同定

新規乳酸菌の培養上清を硫安にて分離し、Hsp 誘導能を持つ分画を得た (図1)。この分画を DEAE 陰イオンカラムにて繰り返し分離し、さらにゲル濾過カラムを用いて分離した結果、活性物質を含むと考えられるペレットが得られた (図2)。このペレットは HPLC にて 3 つのピークを示し、それぞれの分画に Hsp 誘導能があった (図3)。そのうち最も誘導能強く鋭いピークを示した分画について質量分析、糖鎖解析の結果、ペプチドおよび糖鎖を主成分とする物質は存在しなかった。成分解析を行った結果、この分画はリンおよび酸素が大半を占め、活性物質はポリリン酸であることが判明した。

図1 硫安分画

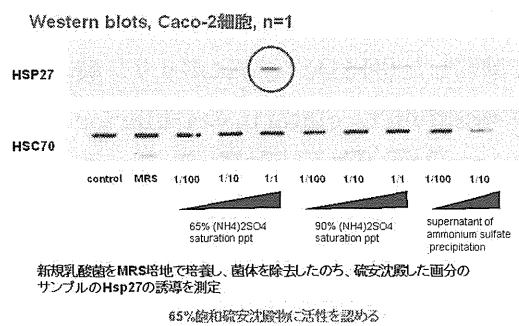


図2 Hsp誘導能を持つ画分の絞り込み

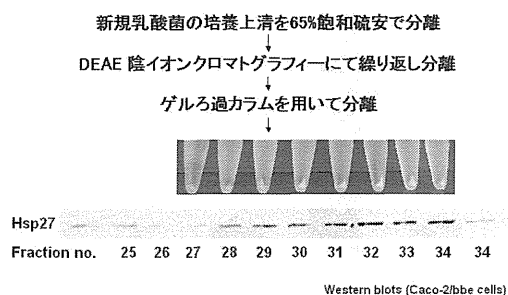
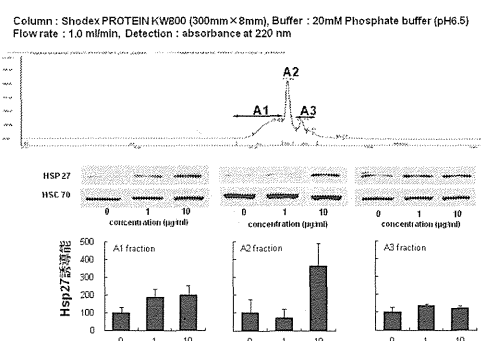


図3 活性成分を含む成分のHPLC解析



乳酸菌にはアデノシン三リン酸からポリリン酸を合成するポリリン酸phosphate kinase (PPK)が発現している。そこで、この酵素を用いて化学的にポリリン酸を合成し、その生理活性を検討した結果、この合成ポリリン酸は腸管上皮にHsp27を誘導し(図4)、腸管上皮のバリア機能を著しく増強した(図5)。

図4 ポリリン酸によるHsp27の誘導(western blotting)

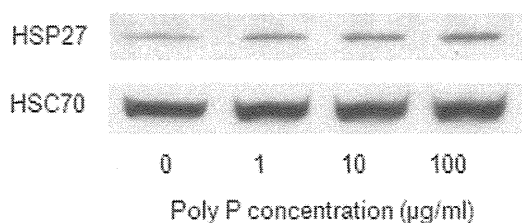
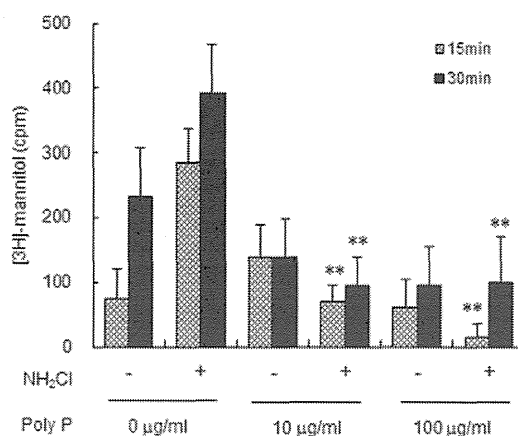


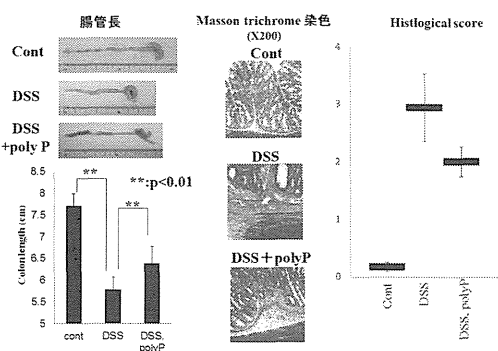
図5 ポリリン酸による細胞バリア機能の増強(Mannitol flux)



2. マウス慢性炎症モデルの腸管障害および線維化に対するポリリン酸の治療効果

慢性腸炎モデルにおいて、腸管長は短縮していた。この腸管長の短縮は、ポリリン酸の投与によって有意に改善した(図6)。組織学的な炎症の程度および線維化の程度はポリリン酸投与群で有意に改善していた。

図6 慢性腸炎モデルにおける腸管短縮、組織学的炎症と線維化はポリリン酸の注腸投与によって改善した。



また、DSS腸炎により過剰に発現していた炎症関連メディエーターのうち、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、pNF $\kappa$ Bはポリリン酸投与によって抑制された(図7)。同様に過剰発現していた線維化関連メディエーターのうち、TGF- $\beta$ 1、Smad4、CTGFの発現が抑制された(図8)。

図7 ポリリン酸投与により炎症関連メディエーターの発現が低下した。

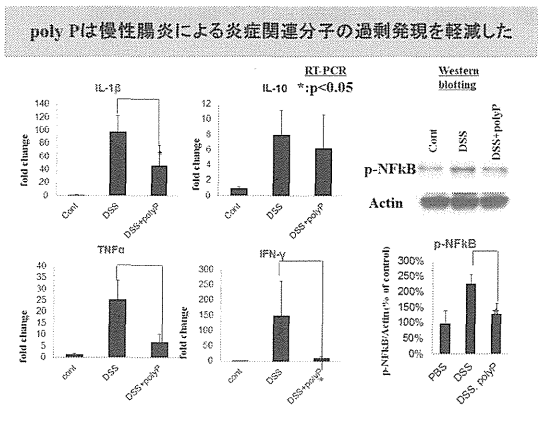
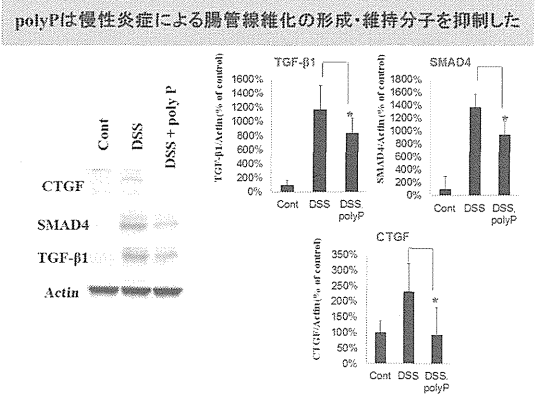


図8 ポリリン酸投与により線維化関連メディエーターの発現が低下した。



さらに、ポリリン酸が腸管上皮細胞、マクロファージ、線維芽細胞に対してそれぞれどのような作用を及ぼすかについて検討した。リポポリサッカライド (LPS) で刺激した腸管上皮由来caco2/bbe細胞では、各種炎症性サイトカインや線維化関連分子TGF- $\beta$ 1の発現が増強されたが、ポリリン酸はIL-1  $\beta$ およびTGF- $\beta$ 1の過剰発現を有意に抑制した。また、マクロファージに分化させたTHP-1細胞を用いて同様の実験を行った結果、ポリリン酸はTNF $\alpha$ およびTGF- $\beta$ 1の過剰発現を有意に抑制した。一方、ポリリン酸は線維芽細胞由来CCD-18に対して特に作用を示さなかった。

2. 上皮細胞によるポリリン酸の認識と作用メカニズムの解明

ポリリン酸は integrin  $\beta$  1 と結合するが  $\beta$  3 とは結合しなかった (図 9)。標識ポリリン酸は添加後 1 時間で caco2/bbe 細胞に取り込まれた、この取り込みは、integrin  $\beta$  1 に対する shRNA で抑制された (図 10)。同様に、ポリリン酸による細胞バ

リア機能の増強作用は integrin  $\beta$  1 に対する shRNA で減弱した (図 11)。さらにポリリン酸の細胞バリア増強作用は、clathrin の inhibitor (pitstop) では変化が無かったが caveolin の inhibitor (Filipin) で著しく抑制された (図 12)。

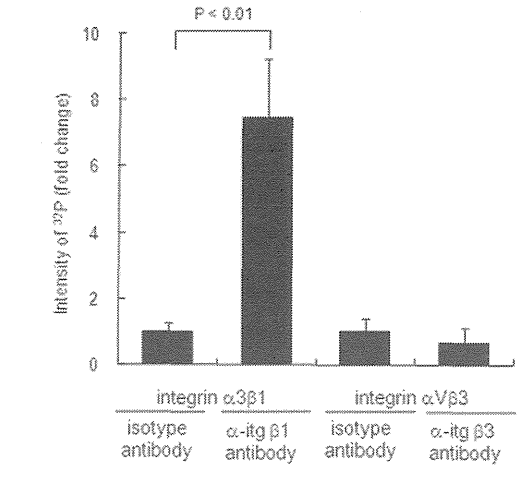


図10 ポリリン酸はintegrin  $\beta$  1 と結合する。

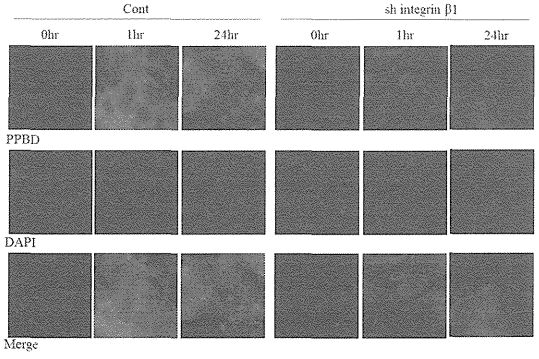


図11 integrin  $\beta$  1のshRNAはポリリン酸の細胞バリア機能増強作用を減弱する。

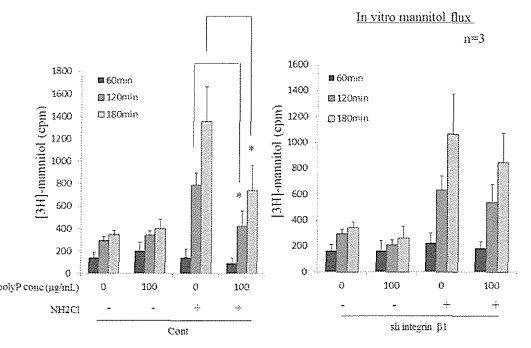
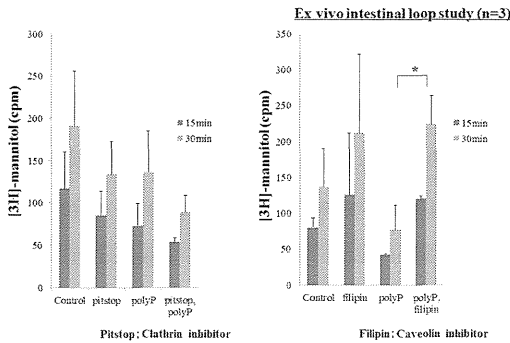


図12 ポリリン酸の細胞バリア増強作用は

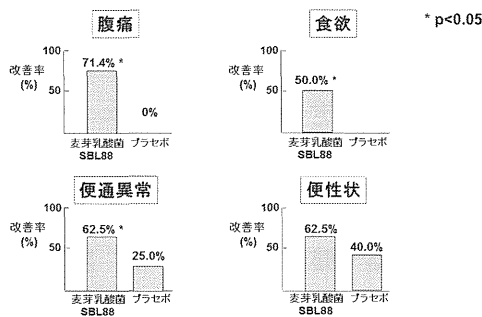
caveolinのinhibitorで抑制された。



### 3. 腹部症状を有する症例に対する麦芽乳酸菌 SBL88 の安全性と治療効果(図 13)

本試験にエントリーした腹部症状を有する20人の患者に有害事象の発生は無かった。麦芽乳酸菌SBL88を投与された群では、プラセボ群に比べ、腹痛が有意に軽減し、便性状も改善した。また、腸内細菌叢をT-RFLP法にて解析した結果、麦芽乳酸菌SBL88を投与された群ではLactobacillusおよびBifidobacteriumが増加する傾向にあった。

図13 麦芽乳酸菌SBL88投与による腹部症状の変化



### D. 考察

新規乳酸菌 SB88 の腸管保護作用を仲介する菌由来活性物質がポリリン酸であることを明らかにした。このポリリン酸は、腸管上皮に細胞防御蛋白である Hsp を誘導し、細胞間バリア機能を著しく増強した。また、ポリリン酸は、組織学的な腸管障害や線維化を改善することが明らかになった。現在、クローン病などで起こる過剰な線維化に伴う腸管狭窄の治療は、内視鏡的バルーン拡張術や手術によるものが主であり、効果が証明された薬物療法はほとんどない。ポリリン酸投与は炎症性腸疾患における腸管線維化に対する新規治療とし

て有用である可能性が示された。

また、本検討によりポリリン酸の作用は、腸管上皮 integrin  $\beta 1$  との結合を起点とし、lipid raft を介した endocytosis (caveolin 依存性 endocytosis) によって上皮内に取り込まれることによって発揮されることが明らかになった。これは、toll-like receptors などのパターン認識受容体を介した経路とは異なる、新しい宿主 - 細菌相互作用メカニズムと考えられる。今後、細胞内に取り込まれたポリリン酸の動態を解析し、作用メカニズムの詳細を明らかにしていく予定である。

腹部症状のある症例を対象に二重盲検試験を行い、麦芽乳酸菌 SBL88 の安全性および効果を検証した。その結果、対象症例に有害事象をきたした例はなく、麦芽乳酸菌 SBL88 投与群で腹痛や便性状の改善を認めた。本研究成果を基盤として、他の助成金も獲得しており(「文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム(シーズB)」)、今後、ポリリン酸を用いた新規腸炎治療薬の開発・臨床応用を目指していく。

### E. 結論

麦芽乳酸菌 SBL88 由来の活性物質ポリリン酸は慢性腸炎モデルの腸管線維化を改善する効果を持つ。ポリリン酸の作用は、腸管上皮 integrin  $\beta 1$  との結合とそれに引き続く endocytosis による細胞内への取り込みを介して発揮される。麦芽乳酸菌 SBL88 は安全にヒトへの投与が可能であり、腹痛や便通異常などの腹部症状の改善に有用であると考えられる。今後、ポリリン酸を用いた新規腸炎治療薬の開発・臨床応用を目指していく。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Fujiya M, Ueno N, Kohgo Y. Probiotic treatments for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel