

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))  
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究  
委託業務成果報告 (業務項目)

DSS 腸炎に対する尿酸の抗炎症効果の検討

研究協力者 三浦 総一郎 防衛医科大学校 学校長

研究要旨：ABCG2 トランスポーターによる消化管への尿酸排泄のもつ抗炎症効果について検討した。マウスの DSS 腸炎モデルにおいて、尿酸の経肛門的投与、尿酸前駆体であるイノシン酸の腹腔内投与は腸炎の抑制効果を認めた。Caco-2 細胞を用い、尿酸の酸化ストレスに対する効果を検討した。尿酸は酸化ストレスに対する抗炎症効果を示した。Caco-2 細胞を用いたトランスウェルを介した下室から上室に尿酸を排泄するモデルに対し ABCG2 の阻害剤を投与すると酸化ストレスに対する抗炎症効果が減弱した。以上より尿酸は ABCG2 を介して消化管管腔へ排泄され、消化管粘膜で抗炎症効果を示すことが示唆された。

A. 研究目的

尿酸排泄トランスポーターの一つとして知られている ABCG2 トランスポーターは尿細管だけでなく消化管粘膜にも発現している。ABCG2 の SNPs に伴う機能異常による消化管への尿酸排泄量の低下が、痛風の発症のリスクと関連していることが示され、消化管が尿酸排泄に重要な働きをしていることとともに消化管が想像以上に尿酸に曝露されていることも明らかとなった。一方、尿酸の消化管での働きは十分に明らかとはなっていない。尿酸は強力な抗酸化作用があり、ヒトの生体内では主要な抗酸化物質として働いていることが知られており、ABCG2 により排泄された尿酸が消化管においても抗酸化作用を示すことを想定した。DSS 腸管モデルマウスに対し尿酸血症、および腸管粘膜への尿酸の直接曝露の影響を検討した。

B. 研究方法

マウスは尿酸代謝酵素であるウリカーゼを有しており、自然には尿酸血症とはならない性質がある。ウリカーゼ阻害剤であるオキソニン酸カリウムを投与しマウス生体内での尿酸代謝

を阻害した。C57BL6/J を使用し DSS 腸炎モデルを作成し、オキソニン酸カリウムと尿酸前駆体であるイノシン酸の腹腔内投与によりマウスに尿酸血症を引き起こし消化管への尿酸排泄モデルとした。また DSS 腸炎モデルマウスに対し尿酸とオキソニン酸カリウムを経肛門的投与することで粘膜への直接作用を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に当たっては当院動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

マウスにオキソニン酸カリウムとイノシン酸を腹腔内投与することで血中尿酸値の上昇を確認した。血中尿酸値を上昇させた群のマウスでは DSS 腸炎が抑制された。経肛門的に尿酸を投与した群のマウスでは DSS 腸炎が抑制された。

D. 考察

尿酸は DSS 腸炎に防御的に作用した。尿酸の抗酸化作用が腸炎を抑制する可能性が示唆された。

## E. 結論

ABCG2 を介した尿酸の消化管管腔への排泄は腸管の炎症に防衛的に働いている可能性がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ueda T, Hokari R, Higashiyama M, Yasutake Y, Maruta K, Kurihara C, Tomita K, Komoto S, Okada Y, Watanabe C, Usui S, Nagao S, Miura S. Beneficial effect of an omega-6 PUFA-rich diet in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mucosal damage in the murine small intestine. *World J Gastroenterol.* 2015 Jan 7;21(1):177-86.

Hozumi H, Hokari R, Shimizu M, Maruta K, Narimatsu K, Sato H, Sato S, Ueda T, Higashiyama M, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Phlebosclerotic colitis that was difficult to distinguish from collagenous colitis. *Dig Endosc.* 2014 Jul;26(4):594-8.

Sato H, Tamura C, Narimatsu K, Shimizu M, Takajyo T, Yamashita M, Inoue Y, Ozaki H, Furuhashi H, Maruta K, Yasutake Y, Yoshikawa K, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Shinmoto H, Hokari R. Magnetic resonance enterocolonography is highly detectable of erosion and redness in intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Nov 12.

Watanabe C, Hokari R, Miura S. Chronic antibiotic-refractory diversion pouchitis successfully treated with leukocyteapheresis. *Ther Apher Dial.* 2014 Dec;18(6):644-5.

### 2. 学会発表

安武 優一, 丸田 紘史, 成松 和幸, 佐藤 宏和, 岡田 義清, 栗原 千絵, 好川 謙一, 渡

辺 知佳子, 高本 俊介, 穂苺 量太, 三浦 総一郎: 実験的インドメタシン腸炎に対する尿酸の抗炎症効果、第 45 回日本消化吸収学会、2014. 11

岡田 義清, 都築 義和, 安武 優一, 丸田 紘史, 好川 謙一, 富田 謙吾, 栗原 千枝, 高本 俊介, 渡辺 知佳子, 永尾 重昭, 三浦 総一郎, 穂苺 量太: 伝統的発酵食品中に存在するプロバイオティクスの大腸炎治療への応用とその作用機序、第 45 回日本消化吸収学会、2014. 11

丸田 紘史, 渡辺 知佳子, 安武 優一, 佐藤 宏和, 成松 和幸, 岡田 義清, 栗原 千枝, 碓井 真吾, 高本 俊介, 富田 謙吾, 永尾 重昭, 三浦 総一郎, 穂苺 量太: ニコチンによる腸特異的接着分子 MAdCAM-1 の発現を介する、腸粘膜へのリンパ球 migration の制御、第 45 回日本消化吸収学会、2014. 11

丸田 紘史, 渡辺 知佳子, 安武 優一, 佐藤 宏和, 成松 和幸, 岡田 義清, 栗原 千枝, 碓井 真吾, 高本 俊介, 富田 謙吾, 永尾 重昭, 三浦 総一郎, 穂苺 量太: ニコチンによる腸特異的接着分子 MAdCAM-1 の発現を介する、腸粘膜へのリンパ球 migration の制御、第 56 回日本消化器病学会大会、2014. 10

安武 優一, 丸田 紘史, 佐藤 宏和, 成松 和幸, 栗原 千枝, 岡田 義清, 碓井 真吾, 渡辺 知佳子, 高本 俊介, 富田 謙吾, 穂苺 量太, 三浦 総一郎: インドメタシン腸炎に対する尿酸の作用の検討、第 56 回日本消化器病学会大会、2014. 10

渡辺 知佳子, 穂苺 量太, 三浦 総一郎: 希少消化管疾患の臨床像と問題点(消化管アレルギーを含む) Cronkhite-Canada 症候群の臨床経過本邦での全国実態調査より、第 56 回日本消化器病学会大会、2014. 10

穂苅 量太, 安武 優一, 三浦 総一郎: 腸粘膜  
防御機構の維持と再生をめざして 白血球微小  
循環制御を介した NSAIDs 小腸粘膜障害に対す  
る防御戦略、第 56 回日本消化器病学会大会、  
2014. 10

好川謙一, 丸田 紘史, 安武 優一, 佐藤 宏和,  
成松 和幸, 岡田 義清, 栗原 千枝, 渡辺 知  
佳子, 高本 俊介, 富田 謙吾, 永尾 重昭, 三  
浦 総一郎, 穂苅 量太: クロウン病における  
MRenterocolonography と内視鏡検査の有用性  
に関する検討、第 32 回日本大腸検査学会総会  
2014. 09

安武 優一, 穂苅 量太, 丸田 紘史, 佐藤  
宏和, 成松 和幸, 栗原 千絵, 岡田 義清,  
好川 謙一, 渡辺 知佳子, 高本 俊介, 富  
田 謙吾, 三浦 総一郎: インドメタシン腸

炎に対する尿酸の抗炎症効果の検討、第 51 回  
消化器免疫学会総会、2014. 07

丸田 紘史, 渡辺 知佳子, 安武 優一, 佐藤  
宏和, 成松 和幸, 岡田 義清, 栗原 千枝, 碓  
井 真吾, 高本 俊介, 富田 謙吾, 永尾 重昭,  
三浦 総一郎, 穂苅 量太: マウス大腸炎にお  
けるリンパ系細胞マイグレーションに対する  
ニコチンの影響、第 38 回日本リンパ学会総会、  
2014. 06

#### 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

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))  
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究  
委託業務成果報告 (業務項目)

GMA モデルを用いた抗炎症効果の基礎的解析

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: 生体内で不要と認識された細胞を迅速に処理することは生体の恒常性維持に必須のプロセスだが、体外からアポトーシス細胞を移入した場合の免疫制御については不明な点が多い。私共は本年度の研究で、体外で調整したアポトーシス細胞の移入によって腸炎の抑制が可能か否かを実験的に検証した。慢性腸炎モデルは SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽性 T 細胞を SCID マウスに移入して腸炎誘導し、同時に B 細胞を共移入する系も作成した。デキサメサゾンでアポトーシスを誘導した胸腺細胞を静脈内投与すると、B 細胞存在下のみで腸炎が抑制され、この効果は制御性 B 細胞 (Breg) サブセットの除去によって消失した。一方、ウサギを用いて顆粒球除去療法 (GMA) による治療モデルを作成した。GMA による体外循環中には、アダカラム内で発生した活性酸素によって顆粒球にアポトーシスが誘導され、これらのアポトーシス細胞が生体に再移入されることで腸炎が抑性される可能性を実験的に示した。今回の検討で、アポトーシス細胞移入が Breg の機能を介して腸管炎症を抑制すること、この機序が既存の治療法である GMA の有効機序の一つである可能性が示唆された。

共同研究者 多田育賢、岡 明彦、園山浩紀、福庭暢彦、川島 耕作、結城崇史、木下芳一  
所属 島根大学医学部内科学講座第二

A. 研究目的

生理的あるいは炎症時にアポトーシス細胞を処理することは生体の恒常性維持にきわめて重要なプロセスである。しかし、体外からアポトーシス細胞を移入した場合の腸管免疫制御については不明である。私共は今回の研究で、体外で誘導したアポトーシス細胞を慢性腸炎モデルに移入することで炎症の抑制が可能か否かを検証した。また、アポトーシス細胞の処理機構が顆粒球除去療法 (GMA) の有効機序に関連していると想定し、ウサギの GMA モデルを作成してこの点についても実験的に検証した。

B. 研究方法

①慢性腸炎モデルの作成

SAMP1/Yit マウスの腸管膜リンパ節 (MLN) から単核球を調整し、CD4 の抗体磁気ビーズを用いて 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。さらに、本モデルに全 B 細胞を共移入するモデル、制御性 B 細胞 (Breg) の分画 (CD1d<sup>high</sup>CD19<sup>high</sup>) を除去した B 細胞を共移入したモデルも作成した。

②腸炎モデルへのアポトーシス細胞の移入

マウスの胸腺細胞を分離し、デキサメサゾンによってアポトーシスを誘導した。アポトーシスの誘導効率を Annexin-V と propidium iodide (PI) で判定し、90%以上の細胞にアポトーシスが誘導されていることを確認した。1×10<sup>7</sup>個のアポトーシス細胞を先述した腸炎モデルへ経静脈的に移入した。腸炎の程度は体重変化、腸管長、組織学的炎症、組織内サイトカイン産生量で評価した。

③アポトーシス細胞の移入による Breg の活性化・誘導

アポトーシス細胞の移入によって Breg の

活性化あるいは誘導されるかを実験的に検証した。1×10<sup>7</sup>個のアポトーシス細胞を移入後3週で、レシピエントマウスの脾臓からB細胞を分離し、IL-10産生能をFACSとEIAで確認した。さらに、アポトーシス細胞の貪食能が低下したMFG-E8マウスKOマウスをレシピエントとして同様の実験をおこなった。

#### ④ GMAの有効機序に関する検討

これまでの報告で、GMAによる体外循環中のアダカラム内では活性酸素が誘導されること、さらにその活性酸素で顆粒球にアポトーシスが誘導されることが想定されていた。しかし、GMAのモデルを用いてin vivoで本現象を確認された報告はなかった。今回、Japanese white rabbitにOVAで関節炎を誘導するモデルを作成し、本モデルに対してアダカラムとshamカラムを用いることでGMAモデルを開発した。本モデルにおいて、カラム内で発生する活性酸素、カラム通過後の顆粒球のL-selectin発現変化、アポトーシスの誘導効率を検討した

#### C. 結果

アポトーシスを誘導した胸腺細胞を静脈内投与すると、B細胞存在下のみで腸炎が抑制され、この効果はBregサブセットの除去によって消失した。一方、ウサギを用いたGMA治療モデルでは、体外循環中にアダカラム内で活性酸素が発生し、その発生に依存して顆粒球のL-selectin発現低下とアポトーシス誘導が確認された。これらのアポトーシス細胞が生体に再移入されることで腸炎が抑性される可能性が実験的に示された。

#### D. 考察

一般にアポトーシスの処理機構は、生理的な恒常性の維持、あるいは免疫寛容というプロセスで重要な働きをしているが、今回の検討から、体外からアポトーシス細胞を移入することによって腸炎などの炎症が抑制されることが明らかとなった。

SAMP1/Yitマウスの腸管CD4陽性T細胞をSCIDマウスに移入して腸炎モデルに、全B細胞あるいはBreg除去B細胞を共移入するモデルを作成し、移入アポトーシス細胞の効果を確認した。本検討から、アポトーシス細胞の抗炎症効果にはBregの存在が必要であり、アポトーシス細胞の処理過程でBreg機能を介して腸管の免疫制御が誘導されるものと想定された。

また、アポトーシス細胞移入後に脾臓でBregが誘導あるいは活性化されること、さらに、このプロセスに食細胞による貪食が関与することもMFG-E8 KOマウスの実験から明らかとなった。

GMA開発の主なコンセプトは、体外循環した血液をアダカラム内のG1ビーズに接触させることで、活性化した顆粒球を除去し、潰瘍性大腸炎やクローン病の腸管炎症を抑制することであった。しかし、アダカラムの顆粒球除去率は30%程度と低値であり、以前から他のメカニズムによって炎症が抑性される可能性が想定されていた。私共は、アダカラム内のG-1ビーズに接触した細胞の表面マーカーが、L-selectin<sup>low</sup>に変化すること、これらの変化を来たした細胞には活性酸素依存的にアポトーシスが誘導されていることに着目した。今回作成したGMAのモデルを用いてin vivoにおいて、カラム内で発生する活性酸素、カラム通過後の顆粒球のL-selectin発現低下、顆粒球へのアポトーシスの誘導を初めて明らかにした。マウス顆粒球をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理したアポトーシス細胞の移入によって同様に腸炎抑制が可能なることから、GMAの抗炎症効果にアポトーシス細胞によるBregを介した免疫制御が関わる可能性が推測された。

#### E. 結論

アポトーシス細胞移入がBregの活性化・誘導を介して腸管炎症を抑制すること、この機序が既存の治療法であるGMAの有効機序の一つ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

- ① Kusunoki R, Ishihara S, Tada Y, Oka A, Sonoyama H, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Ansary MM, Tajima Y, Maruyama R, Nabika T, Kinoshita Y: Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in colonic inflammation and carcinogenesis. *J Gastroenterol. In press.*
- ② Ansary MM, Ishihara S, Oka A, Kusunoki R, Oshima N, Yuki T, Kawashima K, Maegawa H, Kashiwagi N, Kinoshita Y: Apoptotic Cells Ameliorate Chronic Intestinal Inflammation by Enhancing Regulatory B-cell Function. *Inflamm Bowel Dis* 20:2308-2320, 2014.
- ③ Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Tada Y, Kusunoki R, Fukuba N, Yuki T, Kawashima K, Matsumoto S, Kinoshita Y: Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 315-328, 2014.
- ④ Fukuba N, Ishihara S, Tada Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kushiyama Y, Fujishiro H, Kinoshita Y: Prevalence of irritable bowel syndrome-like symptoms in ulcerative colitis patients with clinical and endoscopic evidence of remission:

prospective multicenter study. *Scand J Gastroenterol* 49:674-680, 2014.

- ⑤ Kawashima K, Ishihara S, Yuki T, Onishi K, Kushiyama Y, Fujishiro H, Miyaoka Y, Yuki M, Komazawa Y, Tanimura T, Sonoyama H, Tada Y, Kusunoki R, Oka A, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Kinoshita Y: Therapeutic Efficacy of pH-Dependent Release Formulation of Mesalazine on Active Ulcerative Colitis Resistant to Time-Dependent Release Formulation: Analysis of Fecal Calprotectin Concentration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:342751. doi: 10.1155/2014/342751. Epub 2014 Nov 1

2. 著書

- ① Mishima Y, Ishihara S, Hansen JJ, Kinoshita Y: TGF- $\beta$  detection and measurement in murine B cells: pros and cons of the different techniques. In: *Methods Mol Biol.* Vitale G, Mion F (ed) pp71-80. Human Press, New York, 2014
- ② Ishihara S, Kusunoki R, Kinoshita Y: Anti-Inflammatory Role of MFG-E8 in the Intestinal Tract. In: *MFG-E8 and Inflammation.* Wang P (ed) pp137-148. Springer Science+Business Media, Dordrecht, 2014

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 a
3. その他

厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))

独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究

委託業務成果報告 (業務項目)

炎症性腸疾患モデルマウスにおける mTOR の役割

研究協力者 渡邊 聡明 東京大学腫瘍外科 教授

研究要旨 : Balb/c マウスに azoxymethan および dextran sodium sulfate を投与してできる colitic cancer モデルでは、mTOR の下流因子である 4E-BP1 やリボソーム S6 蛋白のリン酸化亢進がみられ、mTOR が治療標的となる可能性が示唆される。

- A. 研究目的  
一般に炎症関連発癌では活性酸素が関与、さらにこれに応答して細胞内 Akt がリン酸化されると言われており、炎症性腸疾患を母地とした発癌 (colitic cancer) で、Akt の標的となる mTOR が関与するかどうかを検討することを目的とする。
- B. 研究方法  
Balb/c マウスに azoxymethan (AOM) および dextran sodium sulfate (DSS) を投与して、発生した腫瘍につき、mTOR の関わるシグナル伝達経路の分子の発現を免疫染色、ウェスタンブロッティングなどにより検討した。  
(倫理面への配慮)  
マウスを使用した実験であり、配慮すべき倫理面の問題はない。
- C. 研究結果  
癌は主として遠位大腸-直腸に発生し、mTOR の下流因子であるリン酸化 4E-BP1 およびリン酸化 S6 の発現は、腫瘍組織においては正常粘膜に比べて強く発現していた。
- D. 考察  
上記の結果は、mTOR を介するシグナル伝達経
- 路の活性化が colitic cancer の発生に深く関与していると示唆している。
- E. 結論  
AOM および DSS 誘発による colitic cancer モデルマウスでは、mTOR が重要な役割を担っており、治療標的となる可能性ことが示された。
- F. 健康危険情報  
なし
- G. 研究発表  
1. 論文発表  
Kaneko M, Watanabe T, et al. Temsirolimus and chloroquine cooperatively exhibit a potent antitumor effect against colorectal cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol. 140(5):769-781, 2014.  
2. 学会発表  
Nozawa H, Watanabe T, et al. Temsirolimus suppresses colorectal cancer growth by multiple mechanisms. 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 9/21/2012
- 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

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))  
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究  
委託業務成果報告 (業務項目)

病態特異的腸内細菌探索プロジェクト

研究分担者 金井 隆典 慶應義塾大学医学部内科学 教授

研究要旨: 近年注目されている *Clostridium* 属細菌による免疫担当細胞への影響を明らかとし、炎症性腸疾患の病態発症抑制に有効であることを示した。また、腸内細菌の菌体成分や菌代謝物を探索し宿主への免疫応答を検討した。

A. 研究目的

近年 *Clostridium* 属細菌の腸管免疫に対する抑制的な作用が示唆されてきているが、その詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、腸管炎症状態における腸内細菌の炎症抑制機能を検討するため、プロバイオティクスである *Clostridium butyricum* に着目しその炎症抑制効果および免疫学的メカニズムを検討した。

B. 研究方法

*Clostridium butyricum* の DSS 誘因大腸炎モデルマウスに対する炎症抑制効果は無菌マウスあるいは様々な遺伝子組み換えマウスを用いて検討した。さらに、炎症制御にかかわる菌体分子成分の探索を行った。

(倫理面への配慮)

本試験は慶應義塾動物実験委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

*Clostridium butyricum* は TLR2/MyD88 経路を介して強力に IL-10-産生 CD11b 陽性マクロファージを誘導し腸炎抑制効果を示した。

D. 考察

*Clostridium butyricum* はプロバイオティクス

と

して炎症性腸疾患への応用が示唆された。

E. 結論

本研究により、*Clostridium* 属細菌による炎症抑制能および制御機構が示された。今後は菌体分子成分を分離し、炎症性腸疾患に対する安全性の高い治療法や予防法の開発を目標とする。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. 2014(in press)
2. Matsuoka K, Mizuno S, Hayashi A, Hisamatsu T, Naganuma M, Kanai T. Fecal Microbiota Transplantation for Gastrointestinal Diseases. *Review Keio Journal of Medicine*. 63(4):69-74, 2014 Dec 15.
3. Matsuoka K, Kanai T. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathol.* 37(1):47-55, 2014 Nov 25.
4. Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR $\gamma$ t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 20(10):1820-7, 2014 Oct.
5. Miyoshi J, Hisamatsu T, Matsuoka K,



- Naganuma M, Maruyama Y, Yoneno K, Mori K, Kiyohara H, Nanki K, Okamoto S, Yajima T, Iwao Y, Ogata H, Hibi T, Kanai T. Early intervention with adalimumab may contribute to favorable clinical efficacy in patients with Crohn's disease. *Digestion*. 90(2):130-6, 2014 Oct 1.
6. Naganuma M, Hisamatsu T, Kanai T, Ogata H. Magnetic resonance enterography of Crohn's disease. *Review Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 9(1):37-45, 2014 Sep 3.
7. Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between ROR $\gamma$  t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 20(8):1426-34, 2014 Aug.
8. Kanai T, Matsuoka K, Naganuma M, Hayashi A, Hisamatsu T. Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: lessons from Japanese foods. *Korean J Intern Med*. 29(4): 409-15, 2014 Jul.
9. Kobayashi K, Hirai F, Naganuma M, Watanabe K, Ando T, Nakase H, Matsuoka K, Watanabe M. A randomized clinical trial of mesalazine suppository: The usefulness and problems of central review of evaluations of colonic mucosal findings. *J Crohns Colitis*. 8(11): 1444-53, 2014 Jun 10.
10. Yoneno K, Hisamatsu T, Matsuoka K, Okamoto S, Takayama T, Ichikawa R, Sujino T, Miyoshi J, Takabayashi K, Mikami Y, Mizuno S, Wada Y, Yajima T, Naganuma M, Inoue N, Iwao Y, Ogata H, Hasegawa H, Kitagawa Y, Hibi T, Kanai T. Risk and management of intra-abdominal abscess in Crohn's disease treated with infliximab. *Digestion*. 89(3):201-8, 2014 May 1.
11. Kurtz CC, Drygiannakis I, Naganuma M, Feldman SH, Bekiaris V, Linden J, Ware CF, Ernst PB. Extracellular adenosine regulates colitis through effects on lymphoid and nonlymphoid cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 307(3): G338-46, 2014 May 29.
12. Hisamatsu T\*, Naganuma M, Matsuoka K, Kanai T. Diagnosis and Management of Intestinal Behçet's disease. *Clin J Gastroenterol*. 7:205-212, 2014 Apr 20.
2. 学会発表
1. 緒方晴彦, 細江直樹, 長沼 誠, 久松理一, 金井隆典, 松岡克善, 小林 拓, 日比紀文, 鈴木康夫: 潰瘍性大腸炎に対する大腸カプセル内視鏡の有用性とアトラス作成の試み. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 22・23 日.
2. 金井隆典, 長沼 誠, 久松理一, 渡辺憲治, 松岡克善, 竹内 健, 鈴木康夫: 潰瘍性大腸炎患者における血清バイオマーカー、便中カルプロテクチン、便潜血反応と中長期予後との関連の検討. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 22・23 日.
3. 金井隆典, 松岡克善, 水野慎大, 南木康作, 武下達也, 竹下 梢, 中里圭宏, 森 清人, 三枝慶一郎, 矢島知治 1、長沼 誠, 久松理一, 緒方晴彦, 岩男 泰: 難治性腸疾患に対する健常人糞便移植の安全性および有効性の検討. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 22・23 日.
4. 金井隆典, 林 篤史, 佐藤俊朗, 長沼 誠, 久松理一, 三枝慶一郎, 竹下 梢, 森 清人, 清原裕貴, 新井万里, 大山 学, 天谷雅行: 腸内細菌による代謝産物を介した皮膚疾患発症機構の解析. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 23 日.
5. 杉浦悠毅, 島村克好, 久松理一, 金井隆典, 末松 誠: プロスタグランジン組織内代謝解析による遺伝性小腸潰瘍症病態解明. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 23 日.
6. 久松理一, 島村克好, 金井隆典, 細江直樹, 緒方晴彦, 杉浦悠毅, 末松 誠: SLC02A1 の機能解析の現状 (進捗報告). 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 23 日.
7. 久松理一, 島村克好, 細江直樹, 緒方晴彦, 金井隆典: 非特異性多発性小腸潰瘍症における小腸粘膜 SLC02A1 免疫染色の診断上の有用性. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 23 日.
8. 緒方晴彦, 細江直樹, 長沼 誠, 久松理一, 金井隆典, 梁井俊一, 松本主之: 非特異性多発性小腸潰瘍症の内視鏡像とアトラス作成の試み. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 23 日.
9. 南木康作, 三好 潤, 大野恵子, 新井万里, 清原裕貴, 杉本真也, 森 清人, 三枝慶一郎, 武下達也, 竹下 梢, 中里圭宏, 長沼 誠, 矢島知治, 久松理一, 金井隆典: 早期クローン病に対するアダリムマブ治療効果 - アダリムマブ有効性の高い患者背景 -. 平成 26 年度第 2 回総会, 東京, 2015 年 1 月 23 日.
10. Mori M, Hisamatsu T, Suzuki H, Tokutake M, Shimamura K, Mizuno S, Nakamoto N, Ebinuma H, Matsuoka K, Kanai T. Inflammatory macrophages response to stimulation by Curdlan (beta-1,3-glucan) and may contributes to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 東京, 2014 年 12 月 10-12 日.
11. 長沼 誠, 奥田茂男, 久松理一, 金井隆典, 緒方晴彦: シンポジウム 1 小腸疾患のを見つけ方と診断・治療のストラテジ

- ー クロウン病生物学的製剤2次無効例に対する画像評価の有用性. 第52回小腸研究会, 東京, 2014年11月15日.
12. 久松理一, 島村克好, 細江直樹, 緒方晴彦, 小崎健次郎, 梅野淳嗣, 松本主之, 金井隆典: シンポジウム3 難治性小腸疾患に対する治療の工夫  
非特異性多発性小腸潰瘍症の病態からみた小腸粘膜 prostaglandin 代謝の重要性. 第52回小腸研究会, 東京, 2014年11月15日.
  13. Atsushi Hayashi; Toshiro Sato; Katsuyoshi Matsuoka; Tadakazu Hisamatsu; Akihiko Yoshimura; Nobuhiko Kamada; Hideo Yagita; Toshiaki Ohteki; Takanori Kanai. Clostridium butyricum regulates IL-10 producing macrophage to control colitis. JSGE-APAGE Joint Conference The 5<sup>th</sup> Asian Pacific Topic Conference, 神戸, 2014年10月22日.
  14. 久松理一, 細江直樹, 金井隆典: ワークショップ9 希少消化管疾患の臨床像と問題点  
SLC02A1 遺伝子変異による家系内発症非特異性多発性小腸潰瘍症. JDDW 2014, 神戸, 2014年10月23-26日.
  15. 南木康作 久松理一, 金井隆典: シンポジウム3 難治性クローン病: 病態から考えた治療アプローチ  
当院におけるクローン病に対するアダリムマブの治療成績  
ー抗 TNF $\alpha$  抗体製剤の使用歴からみた有効性に関する検討ー. JDDW 2014, 神戸, 2014年10月23-26日.
  16. 緒方晴彦, 細江直樹, 長沼 誠, 松岡克善, 久松理一, 金井隆典, 小林 拓, 日比紀文, 鈴木康夫: 潰瘍性大腸炎に対する大腸カプセル内視鏡の有用性とアトラス作成の試み. 平成26年度第1回総会, 東京, 2014年7月24-25日.
  17. 緒方晴彦, 細江直樹, 長沼 誠, 松岡克善, 久松理一, 金井隆典, 鈴木康夫: 潰瘍性大腸炎臨床的寛解例における大腸内視鏡検査の意義~多施設共同研究にむけて~. 平成26年度第1回総会, 東京, 2014年7月24-25日.
  18. 金井隆典, 松岡克善, 水野慎大, 南木康作, 武下達也, 竹下 梢, 中里圭宏, 森清人, 三枝慶一郎, 矢島知治, 長沼 誠, 久松理一, 緒方晴彦, 岩男 泰: 難治性腸疾患に対する健常人糞便移植の安全性および有効性の検討. 平成26年度第1回総会, 東京, 2014年7月24-25日.
  19. 金井隆典, 林 篤, 松岡克善, 竹下 梢, 三枝慶一郎, 新井万里, 清原裕貴, 水野慎大, 久松理一: Clostridium butyricum の免疫制御機序の解明. 平成26年度第1回総会, 東京, 2014年7月25日.
  20. 久松理一, 島村克好, 細江直樹, 緒方晴彦, 小崎健次郎, 日比紀文, 金井隆典: SLC02A1 の同定に至った過程 ー姉妹発症例からのアプローチー. 平成26年度第1回総会, 東京, 2014年7月25日.
  21. 久松理一, 島村克好, 金井隆典, 細江直樹, 緒方晴彦, 小崎健次郎, 日比紀文, 梅野淳嗣, 松本主之: SLC02A1 の機能解析の現状. 平成26年度第1回総会, 東京, 2014年7月25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

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))  
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究  
委託業務成果報告 (業務項目)

病態特異的腸内細菌探索プロジェクト：疾患特異的腸内細菌の探索  
クローン病の病態形成に関与するクロストリジウム属細菌叢の検討

研究協力者 安藤 朗 滋賀医科大学内科学講座消化器内科 教授

研究要旨： *Clostridium cluster IV* や *subcluster XIVa* に属する腸内細菌の多くは、主に酢酸やプロピオン酸、*n*-酪酸といった短鎖脂肪酸を多く産生する。これらの短鎖脂肪酸は、多くは食物繊維由来のβ-グルコースから発酵により産生され、腸管上皮に作用することによって抗炎症作用を有することが明らかとなっている。これまで我々はクローン病の腸内細菌叢を T-RFLP 法で解析を行い、健常者と比較して門レベルでこれらクロストリジウムに属するものの多くが減少していることを報告してきた。今回我々は、16s rRNA をターゲットとした次世代シーケンサー解析を行い、*Blautia faecis*、*Roseburia inulinivorans*、*Ruminococcus torques* を検討対象とした。続いて各属レベルでの定量的 PCR 解析を行ったところ、いずれも健常人に比べ有意に低値を示した。CRP、赤沈、血清アルブミンそれぞれの正常値でクローン病患者を 2 群に分け比較検討、異常値群で菌量が少ない傾向にあり、その病勢との関連が示唆された。

#### A. 研究目的

これまで我々はクローン病の腸内細菌叢を T-RFLP 法で解析を行い、健常者と比較して門レベルでこれらクロストリジウムに属するものの多くが減少していることを報告してきた。

今回我々は、16s rRNA をターゲットとした次世代シーケンサー解析を行い、*Blautia faecis*、*Roseburia inulinivorans*、*Ruminococcus torques* を検討対象とした。

続いて各属レベルでの定量的 PCR 解析疾患活動性との相関を明らかにするとともに、プロバイオティクスの可能性について検討を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

滋賀医科大学附属病院に通院または入院にて加療されたクローン病患者 68 名と、居住地・性別・年齢をマッチさせた健常者 46 名を対象とした。

採便管にて採取した便より DNA を抽出、濃度を測定したのち、Premix EX Taq を使用した定量的 PCR を施行した。

得られた *Blautia faecis*、*Roseburia inulinivorans*、*Ruminococcus torques* それぞれの菌量を CRP・赤沈・アルブミン値と比較検討を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、滋賀医科大学倫理委員会の承認の下、患者には十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得たのち施行とした。本研究に関して特記すべき COI はない。

#### C. 研究結果

16s rRNA をターゲットとした次世代シーケンサー解析を行い、*Blautia faecis*、*Roseburia inulinivorans*、*Ruminococcus torques* を検討対

象とした。続いてその結果より各属レベルでの定量的PCR解析を行ったところ、いずれも健常人に比べ有意に低値を示した。

CRP、赤沈、血清アルブミンそれぞれの正常値でクローン病患者を比較検討したところ、異常値群で菌量が少ない傾向にあった。

#### D. 考察

##### <*Blautia faecis*>

*B. faecis*は健常者に比較してクローン病で有意な上昇を認めた。

##### <*Roseburia inulinivorans*>

*R. inulinivorans*は健常者に比較して有意にその菌量の減少を認めた。この菌は酪酸産生菌であり、クローン病の病態と深いかわりがあると予想される。

##### <*Ruminococcus torques*>

*R. torques*は粘液分解能を持ち、*Ruminococcus gnavus*と共にIBD患者の粘膜で増加することが欧米より報告されている。しかしながら日本人を対象とした今回の結果では*R. torques*は健常人より有意に減少しており、*R. gnavus*は健常人と有意差を認めなかった。

#### E. 結論

*B. faecis*、*R. inulinivorans*、*R. torques*はクローン病腸内細菌叢で有意な減少を認め、*R. inulinivorans*は病勢の悪化との関連が考えられる。また欧米と日本ではクローン病腸内細菌叢の変化が菌種レベルで同様では無いことが明らかとなり、腸内細菌を標的とした治療を考える際に考慮すべき点であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Andoh A, Kobayashi T, Kuzuoka H, Tsujikawa T, Suzuki Y, Hirai F, Matsui T, Nakamura S, Matsumoto T, Fujiyama Y.

Characterization of gut microbiota profiles by disease activity in patients with Crohn's disease using data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms. *Biomedical Reports*. 2(3):370-373, 2014.

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*. 49(4):674-82, 2014.

##### 2. 学会発表

1. 安藤朗. Gut Microbiota and Microenvironment of Intestinal Crypt. How does gut microbiota influence the mucosal immunity? AOCC 2014. Grand Hilton Seoul. 2014年6月20日.
2. 安藤朗. Pyrosequence Analysis for Gut Microbiota of IBD and Metabolic Syndrome in Japan. Asian Pacific Topic Conference. Kobe International Conference Center. 2014年10月22日
3. 藤本剛英. Asian Pacific Topic Conference. Relationship between *Feacalibacterium prausnitzii* and Crohn's disease clinical activity. Kobe International Conference Center. 2014年10月22日.
4. 今枝広丞. JDDW 2014. Identification of commensal microbes contributing to dysbiosis of Japanese patients with Crohn's disease. 神戸ポートピアホテル. 2014年10月24日.
5. 安藤朗. 教育講演 腸内細菌と健康の関わり. 第104回日本消化器病学会九州支部例会 第98回日本消化器内視鏡学会九州支部例会. 大分オアシスタワーホテル. 2014年12月5日.
6. 高橋憲一郎. クローン病患者における便中腸内細菌種の比較検討. 第12回日本機能性食

品医用学会. 国立京都国際会館. 2014年12月14日.

7. 藤井誠. クロウン病での *Blautia faecis*, *Roseburia inuliniorans* の減少. 第6回日本炎症性腸疾患研究会. TKP ガーデンシティ品川. 2014年12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

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))  
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究  
委託業務成果報告 (業務項目)

病勢相関性腸内細菌の探索

研究分担者 本田 賢也 独立行政法人理化学研究所 統合生命科学研究センター チームリーダー

研究要旨: 消化管や口腔などの粘膜には多様な常在細菌が存在し、宿主の生理や健康維持に対して非常に大きな役割を果たしている。フローラの構成異常が、様々な疾患の原因となっていることが徐々に明らかになってきている。粘膜常在菌フローラの解明が進めば、様々な疾患にたいする新たな疾病対策・治療開発に結びつく可能性が高い。本研究では、炎症性腸疾患 (IBD) 患者由来便・唾液検体の細菌パターンニングを行い、疾患・病勢に影響を与える細菌種の同定・単離を目的として研究を推進した。

A. 研究目的

IBD 患者便・唾液検体を、次世代シーケンサーを用いたメタ解析により細菌叢パターンニングを行い、疾患・病勢に影響を与える細菌種の同定・培養単離を行う。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎・クローン病患者に由来する便・唾液サンプルを収集し、次世代シーケンサーによる 16S・メタゲノム解析を行った。さらに、それらサンプルを無菌マウスに投与し、宿主免疫系に影響を与える細菌種の単離を試みた。

(倫理面への配慮)

潰瘍性大腸炎・クローン病患者に由来する便・唾液サンプルは麻布大学において採取されたサンプルを用いた。研究はすべて理化学研究所横浜事業所研究倫理委員会において承認された計画に従って行った。

C. 研究結果

潰瘍性大腸炎患者に由来する便を無菌マウスに投与したところ、消化管 Th17 細胞が増加した。

このマウスから Th17 細胞を誘導する細菌 20 菌株を単離した。

一方、クローン病患者に由来する唾液サンプルを無菌マウスに投与したところ、大腸 Th1 細胞の誘導が観察された。投与したマウスから Th1 細胞に影響を与える 1 菌株を単離培養した。

D. 考察

IBD 患者サンプルから免疫系に影響を与える菌株を単離したが、これらはマウスにおいて Th17 細胞或いは Th1 細胞を誘導したに過ぎず、今後、ヒトにおいて病態に影響するか調べる必要がある。

E. 結論

IBD 患者サンプルから Th17 誘導性 20 菌株、及び Th1 誘導性 1 菌株を採取した。これらは IBD 病勢に影響を与える可能性があり、今後新たなバイオマーカーとなる可能性がある。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (2 報)  
1) Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K,

Okada T, Hattori M, Fagarasan S. Foxp3+ T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity*. 41:152-165, 2014

2)Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M,

Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Masumoto H, Ohara

O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of

colonic regulatory T cells. *Nat Immunol*. 15:571-579, 2014

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

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))  
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究  
委託業務成果報告 (業務項目)

腸内細菌由来物質による IBD の病勢制御に関する研究

研究協力者 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：これまで、麦芽乳酸菌SBL88由来の活性物質長鎖ポリリン酸が、慢性腸炎モデルにおいて抗炎症作用、抗線維化作用を発揮することを明らかにし、これを用いた新規腸炎治療法開発における基盤的研究を行ってきた。本年度は、長鎖ポリリン酸の標的となる腸管構成細胞を明らかにする目的で、腸管上皮、マクロファージ、線維芽細胞由来の細胞株に対して、それぞれ長鎖ポリリン酸の作用を検討し以下の結果を得た。(1) 腸管上皮由来Cac02/bbe細胞において、lipopolysaccharide (LPS) 刺激により誘導される炎症性サイトカインIL-1bおよび線維化関連因子TGFbの発現を有意に抑制した。(2) マクロファージに分化誘導したTHP-1細胞において、LPS刺激により誘導される炎症性サイトカインTNFaの発現を有意に抑制した。(3) 線維芽細胞由来CCD-18において、TGFb1刺激により誘導される線維化関連分子CTGF、コラーゲンI、IVに変化を与えなかった。(4) ヒト血液から採取したマクロファージにおいて、LPS刺激により誘導される炎症性サイトカインTNFa およびIL-12の発現を有意に抑制した。以上から、長鎖ポリリン酸は、炎症を惹起された腸管上皮およびマクロファージからの炎症性サイトカインを抑制することで、抗炎症作用を発揮することが示唆された。今後は、炎症性腸疾患患者を対象とした菌由来活性物質長鎖ポリリン酸を用いた治療効果の検討を行い、新規炎症性腸疾患治療の開発を目指す。

共同研究者

藤谷幹浩 1、上野伸展 1、野村好紀 1、  
嘉島 伸 1、盛一健太郎 1、前本篤男 2、  
蘆田知史 3、田邊裕貴 4 (旭川医科大学内  
科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分  
野 1、札幌東徳州会病院 2、札幌徳州会病  
院 3、国際医療福祉大学病院消化器内科 4)

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長鎖ポリリン酸  
(poly P) によって仲介されること  
(Segawa, Fujiya, Kohgo, *PLoS One*, 2011)、  
マウス慢性腸炎モデルにおいて、抗炎症作  
用、線維化改善作用を発揮することを明ら  
かにした。

本年度の研究目的は、長鎖ポリリン酸の



標的となる腸管構成細胞を明らかにすることである。

## B. 研究方法

### 1. 長鎖ポリリン酸の作成

長鎖ポリリン酸を作成するため、1ml の混合反応液 (50mM のトリス塩酸バッファー (pH7.4), 40mM のアンモニア硫酸塩, 4mM の塩化マグネシウム, 40mM のクレアチンリン酸, 20ng/ml のクレアチンキナーゼ, 1mM の ATP (pH7.2), 1U の Propionibacterium shermanii 由来のポリリン酸キナーゼ (polyphosphate kinase ; PPK) を 37°C で 3 時間反応させた。低分子量の成分を除外し、以下の検討に用いた。

### 2. 細胞株

ヒト腸管上皮細胞として Caco2bbe 細胞, ヒトのマクロファージ様細胞として THP-1 細胞, ヒト腸管筋線維芽細胞として CCD18-co 細胞を用いた。培養液は, DMEM (Caco2bbe 細胞), RPMI (THP-1 細胞), MEM (CCD18-co 細胞) を用い, 10% (vol/vol) FBS, 2mM L-グルタミン, 50 U/ml ペニシリン, 50 μg/ml ストレプトマイシンと 10 μg/ml トランスフェリンを添加した。培養環境は 5% CO<sub>2</sub> 下, 37°C の湿潤状態とし, 105 cells/cm<sup>2</sup> の濃度で細胞を 6 穴プレートに撒いた。THP-1 細胞は, 200nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) を 3 日間投与したのち, PMA を含む培地を除去し, 上記の培養液で 5 日間培養し, マクロファージへと分化させて、以下の実験に用いた。

### 3. 細胞株への Lipopolysaccharide (LPS) および TGF-β1 の投与

ヒト腸管上皮細胞の Caco2bbe 細胞とヒトマクロファージ様細胞の THP-1 細胞に, Escherichia coli 由来 LPS, 長鎖ポリリン酸を投与し, 24 時間後に RNA を抽出して, RT-PCR にて炎症関連サイトカインや線維関連分子の発現を評価した。また長鎖ポリリン酸が線維芽細胞に対する作用が有しているのか否かを検討するため, ヒト筋線維芽細胞である CCD-18 細胞を 100ng/ml

の TGF-β1 で刺激してコラーゲンの発現を誘導した。この細胞にポリリン酸を投与して 24 時間後に RNA を抽出し, RT-PCR を用いてコラーゲン mRNA の発現を評価した。

### 4. ヒトマクロファージを用いた検討

健康者血中からヒトマクロファージを採取し, M-CSF, IFN-γ にて刺激した。このマクロファージに LPS を加えることで疑似炎症状態に置き, 鎖長の異なるポリリン酸を添加して TNFα, IL-12 の mRNA 発現を RT-PCR にて検討した。

## C. 研究結果

腸管上皮由来 Caco2bbe 細胞を LPS で刺激したところ, コントロール群と比較し, TGF-β1, IL-1β, TNFα の発現が有意に亢進した。LPS+ポリリン酸群では, LPS 単独群に比べ, TGF-β1, インターロイキン 1β の発現が有意に低下していた (図 1、2)。

図 1

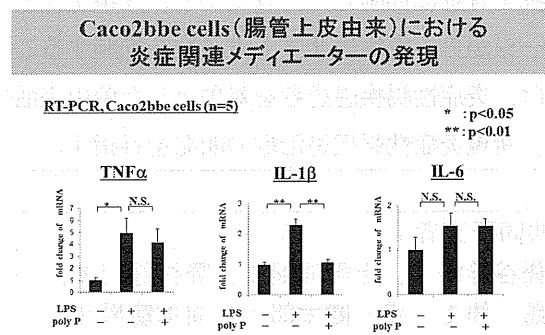
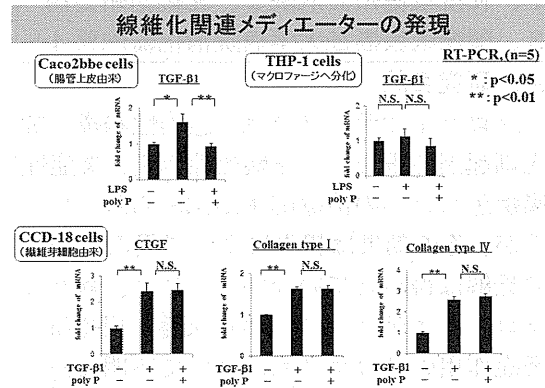
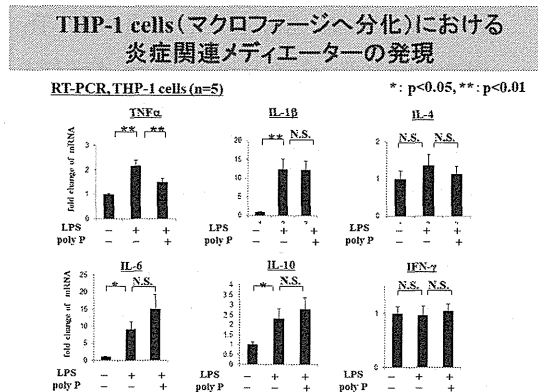


図 2



マクロファージへ分化させた THP-1 細胞を LPS で刺激した結果、コントロール群と比較して、IL-1b, IL-6, IL-10, TNFa の発現は有意に亢進したが、TGF-b1 の発現に変化は無かった。LPS+長鎖ポリリン酸群では、LPS 単独群と比較し、TNFa 発現のみが有意に低下した(図 2、3)。

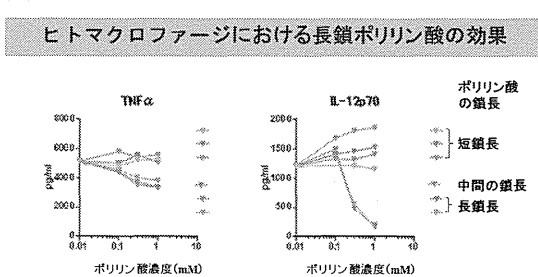
図 3



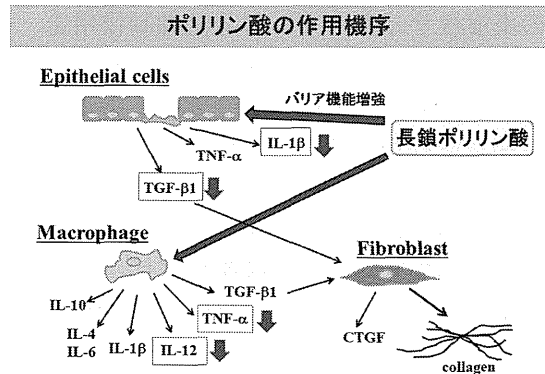
腸管線維芽細胞由来の CCD-18 細胞を用い、TGF-b1 の刺激により増加する CTGF、コラーゲン産生への長鎖ポリリン酸の作用を検討した。TGF-b1 刺激により、コントロール群と比較して有意に CTGF、コラーゲンの発現は亢進しており、長鎖ポリリン酸の添加でも変化はみられなかった(図 2)。すなわち、長鎖ポリリン酸の線維芽細胞への直接作用は無いことが明らかになった。

健康人から採取したマクロファージを M-CSF、IFN-γ で刺激し LPS を加えた結果、高い TNFa、IL-12 発現が認められた。この発現は長鎖ポリリン酸を加えることで有意に低下した。しかし、短鎖のポリリン酸を添加しても変化は無かった(図 4)。

図 4



以上から、長鎖ポリリン酸は、炎症状態にある腸管上皮細胞における IL-1b の発現を、マクロファージにおける TNFa、IL-12 の発現を抑制することで抗炎症作用を発揮すること、また、腸管上皮細胞からの TGF-b1 産生を抑制することで、抗線維化作用を発揮することが示唆された(図 5)。



#### D. 考察

我々はこれまで、長鎖ポリリン酸が腸管バリア機能を増強すること、慢性腸炎モデルにおける腸管障害や線維化を改善することを明らかにしてきた(Ueno, Fujiya, Kohgo, *IBD*, 2011) (Segawa, Fujiya, Kohgo, *PLoS One*, 2011)。今回の検討ではポリリン酸が腸管組織のどの細胞を標的として抗炎症作用、線維化改善作用を発揮するかについて明らかにする目的で、腸管組織を構成する細胞として、腸管上皮由来 Caco2bbe 細胞、単球系由来 THP-1 細胞、線維芽細胞由来 CCD-18 細胞を用いて、炎症関連分子の発現を解析した。その結果、長鎖ポリリン酸は腸管上皮細胞からの IL-1b 過剰発現を抑えると同時にマクロファージからの TNFa の過剰産生を抑えることによって抗炎症作用を発揮することが明らかになった。また、健康人マクロファージに M-CSF、IFN-γ を添加し、さらに LPS にて炎症状態を惹起することで IBD 類似の環境においたマクロファージに対し、長鎖ポリリン酸を加えることで TNFa、IL-12 の過剰産生が強く抑えられることも示した。すなわち、長鎖ポリリン酸は腸管上皮とマクロファージの両者に作用することで抗炎

症効果を発揮することが明らかになった。また、長鎖ポリリン酸は腸管上皮細胞からの TGF- $\beta$ 1 産生を抑制することで抗線維化作用を発揮することも明らかになった。

炎症性腸疾患では、主として免疫抑制効果を持つ治療薬が用いられている。一方、長鎖ポリリン酸は腸管バリア機能増強作用に加え、上皮細胞やマクロファージからの炎症性サイトカインの分泌抑制作用を有することが明らかになり、これまでの治療薬とは異なる機序の腸管障害改善効果が期待される。また、本研究から上皮細胞の TGF- $\beta$ 1 産生の抑制を介した抗線維化作用も明らかにした。現在、クローン病で高頻度に出現す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。長鎖ポリリン酸投与はこのような腸管狭窄に対する新規治療として有用である可能性が示された。今後は、炎症性腸疾患患者を対象とした臨床試験により長鎖ポリリン酸の有効性を明らかにし、新規炎症性腸疾患治療の開発を目指したい。

#### E. 結論

麦芽乳酸菌 SBL88 由来の活性物質長鎖ポリリン酸は腸管上皮やマクロファージから産生される炎症および線維化関連分子の過剰発現を抑制することで、慢性腸炎に対する抗炎症、抗線維化作用を発揮することを明らかにした。今後は新規炎症性腸疾患に対する新規治療薬として実用化研究を進めていきたい。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ando K, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Ikuta K, Tanabe H, Ohtake T, Kohgo Y. Heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein A1 improves the intestinal injury by regulating apoptosis via trefoil factor 2 in mice with anti-CD3-induced enteritis. *Inflammatory Bowel Diseases* (in press)

2. Takahashi N, Yoshizaki T, Hiranaka N, Kumano O, Suzuki T, Akanuma M, Yui T, Kanazawa K, Yoshida M, Naito S, Fujiya M, Kohgo Y, Ieko M. The production of coagulation factor VII by adipocytes is enhanced by tumor necrosis factor- $\alpha$  or isoproterenol. *International Journal of Obesity* (in press)
3. Addo L, Tanaka H, Yamamoto M, Toki Y, Ito S, Ikuta K, Sasaki K, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y. Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells. *BBA - Molecular Basis of Disease* (in press)
4. Konishi H, Fujiya M, Kohgo Y. Host-Microbe Interactions via Membrane Transport Systems. *Environ Microbiol* (in press)
5. Fujiya M, Tanaka K, Dokoshi T, Tominaga M, Ueno N, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Kohgo Y. Efficacy and adverse events of endoscopic mucosal resection (EMR) and submucosal dissection (ESD) for the treatment of colon neoplasms: A meta-analysis of studies comparing EMR and ESD. *Gastrointestinal Endoscopy* (in press)
6. Ito S, Ikuta K, Kato D, Shibusa K, Niizeki N, Tanaka H, Addo L, Toki Y, Hatayama M, Inamura J, Shindo M, Sasaki K, Iizuka N, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Non-transferrin-bound iron assay

- system utilizing a conventional automated analyzer. *Clin Chim Acta* 437:129-35, 2014.
7. Fujiya M, Kashima S, Ikuta K, Dokoshi T, Sakatani A, Tanaka K, Ando K, Ueno N, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Saitoh Y, Kohgo Y. Decreased vessel networks and irregular vessel on narrow band imaging are useful findings to distinguish intestinal lymphoma from lymphoid hyperplasia. *Gastrointest Endosc* 80(6):1064-71, 2014.
  8. Fujiya M, Konishi H, Kamel M.K.M, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene* 33(40):4847-56, 2014.
  9. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology Research* 44: 920-934, 2014.
  10. Ueno N, Hasebe T, Kaneko A, Yamamoto M, Wang Y, Fujiya M, Kohgo Y, Kono T, Musch MW, Chang EB. TU-100 (Daikenchuto) and Ginger Ameliorate Anti-CD3 Antibody Induced T Cell-Mediated Murine Enteritis: Microbe-Independent Effects Involving Akt and NF- $\kappa$ B Suppression. *PloS One* 23;9(5):e97456, 2014.
  2. 学会発表
  1. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Konishi H, Sakatani A, Tanaka K, Dokoshi T, Ando K, Kashima S, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Shigyo T, Kohgo Y. Long-term oral dietary administration of a new probiotic, *Lactobacillus brevis* SBC8803, alters gut the microbiota and ameliorates DSS-induced colitis in mice. DDW 2014 (AGA), Chicago, 2014.05.06.
  2. Konishi H, Fujiya M, Ando K, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Inaba Y, Fujibayashi S, Goto T, Kashima S, Ueno N, Sasajima J, Ito T, Tanaka H, Ikuta K, Kohgo Y. MicroRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells through the autophagosomal degradation of hnRNP A1. DDW 2014 (AGA), Chicago, 2014.05.06.
  3. Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Kohgo Y. A probiotic-derived polyphosphate improves the fibrosis in a murine model of chronic colitis via the regulation of inflammation- and fibrosis-associated mediators. GI Research Academy 2014, Tokyo, 2014.06.06.
  4. Fujiya M, Ueno N, Kohgo Y. International session (Workshop 1) 「Host-microbial interaction in BD」 A novel host-microbial interaction via the uptake of probiotic-derived molecules by intestinal epithelia. JDDW 2014 (第56回日本消化器病学会、第88回日本消化器内視鏡学会、第12回日本消化器外科学会), Kobe, 2014.10.24.
  5. 藤谷幹浩、盛一健太郎、高後 裕. microRNA-18a は癌関連蛋白 hnRNP A1 を分解し大腸癌細胞に細胞死を誘導する. 第100回日本消化器病学会総会、東京、2014.04.23.
  6. 上野伸展、坂谷 慧、田中一之、堂腰