

平成30年 5月30日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08975

研究課題名(和文) 非ステロイド性抗炎症薬による小腸粘膜傷害でのガレクチン-3および腸内細菌の役割

研究課題名(英文) Role of galectin-3 and intestinal bacteria flora on NSAID-induced small intestinal ulcer

研究代表者

朴 雅美 (PARK, Ah-Mee)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70469245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は痛み止めによって起こる副作用の消化管潰瘍でも特に小腸潰瘍におけるガレクチン-3の役割を明らかにすることを目的とした。ガレクチン-3欠損マウスを使った研究から、痛み止め服用によって起こる小腸潰瘍をガレクチン-3が悪化させることが分かった。そのメカニズムは主に2つの可能性が考えられる。1つは活性化されたマクロファージが危険シグナルとしてガレクチン-3を産生し、これが過剰な炎症反応を引き起こしていることである。もう1つは、小腸に多く分泌されるガレクチン-3による腸内細菌の相違である。これらの変化が相まって、小腸潰瘍形成にガレクチン-3が影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the role of Galectin-3 (Gal3) on NSAIDs-induced intestinal ulcer. By using Gal3 knockout mice, we found that Gal-3 is a worsen factor of NSAIDs-induced intestinal ulcer. There are two possible mechanism for this negative effect of Gal3. The first one is a role of Gal3 as danger signal of activated macrophages. This molecule might cause sever inflammation. The another one is changes of intestinal bacterial flora with or without Gal-3. We found obvious differences of small intestinal flora population between wildtype mice and Gal3 mice. Those differences might affect to the ulceration by NSAIDs.

研究分野：炎症性疾患

キーワード：ガレクチン-3 腸内フローラ NSAIDs 小腸潰瘍

1. 研究開始当初の背景

アスピリンなど非ステロイド性抗炎症薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) は、鎮痛や抗血液凝固の目的で広く使用されている。また、各種疫学調査や臨床試験から、アスピリンの長期服用は各種の癌 (大腸、喉頭、乳腺、肺など) の発生に抑制的に働くことなどが報告されている。動物実験でも NSAIDs は、大腸癌、乳腺癌の発生を抑制することが報告されている。このような NSAIDs の有用な効果のため、高齢化が進む日本社会においてさらなる使用の増加が見込まれる。しかしその有用性の一方で、消化性潰瘍の副作用が 20% 程度認められるため、その使用が困難な場合がある。特に、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の頻度が高いが、プロトンポンプ阻害剤や粘膜保護剤などの併用によってその副作用を軽減することが可能である。一方で、小腸潰瘍の発生頻度は、胃・十二指腸潰瘍よりは低いが、NSAIDs 服用によって 50% 以上の患者に小腸粘膜傷害が発生しているとの報告もある。しかしながら現時点で小腸傷害を予防あるいは改善するのに有効な手段は知られていない。胃粘膜保護剤として知られるゲラニルゲラニルアセトン (セルベックス) もアスピリンによる小腸傷害には改善作用を示さない。そのため、NSAIDs の服用を継続する上で小腸の粘膜傷害を軽減させる方法の開発は今後の重要な課題である。

NSAIDs による小腸潰瘍のメカニズムは、シクロオキシゲナーゼ活性阻害によるプロスタグランジン産生の低下によって腸管のバリア機能が低下するためである。そこに消化管内容物である胆汁酸や食物による物理的刺激と腸管内に存在する細菌の侵入が相まって潰瘍が引き起こされると考えられる。そのため、小腸潰瘍は、細菌があまり存在しない空腸では起こらず、回腸で発生する特徴がある。すなわち、NSAIDs による小腸潰瘍には腸管バリア機能の破綻と小腸内の細菌種が

深く関わっている。

ガレクチン-3 (Gal-3) はガラクトースに結合特異性を持つタンパク質ガレクチンファミリーの 1 つで、多くの臓器で発現している。細胞内に局在するのみでなく、細胞外へも分泌され、その糖鎖結合能ゆえに糖タンパク質など多くの分子と結合し、多様な生理作用を発揮する。発現が極めて強いマクロファージではその作用が詳しく調べられており、仮足形成や好中球の活性化に重要であることが知られている。申請者は Gal-3 が胃と小腸の粘膜表面に強く発現していることに着目し、その生理的な意義や感染防御における役割について研究を進めている。

2. 研究の目的

本研究では、NSAIDs による小腸粘膜傷害に対して Gal-3 および小腸フローラがどのように関与しているのかを明らかにすることで、NSAIDs による小腸粘膜傷害を予防あるいは軽減する新たな方法をみいだすことを目的とする。

3. 研究の方法

a. NSAID による小腸粘膜傷害時のマクロファージ活性化と腸管免疫の解析

野生型、Gal-3 欠損マウスに NSAID の 1 つであるインドメタシン (5mg/kg 体重) を経口的に投与し、経時的に便を採取し、血便レベルを化学発光法にて検出した。投与 24 時間後に犠死後小腸を回収し潰瘍レベルを調べた。また組織の一部を用いライセートを作成しイムノプロットングなどの解析に用いた。また小腸のホルマリン固定組織標本を作成し、組織学的解析に用いた。

b. 次世代シーケンサーを使った小腸フローラ解析

腸管内フローラが消化管潰瘍の発現に影響する可能性が考えたことから野生型、Gal-3 欠損マウスそれぞれから小腸内容物を回収し、細菌 DNA を回収、増幅させ次

世代シーケンサーによって同定を実施した。

c. NSAID による小腸粘膜傷害に対する改善方法の探索

小腸内の細菌を減弱させる目的で、野生型、Gal-3 欠損マウスそれぞれに難吸収性抗生剤であるネオマイシン、ポリミキシン B を 3~5 日間飲水投与し、インドメタシンの影響を調べた。また、腸内環境への影響が報告されているプロバイオティクスであるロイテリ菌を離乳前から継続的に投与し、10 週令まで飼育し、インドメタシン投与実験に用いた。

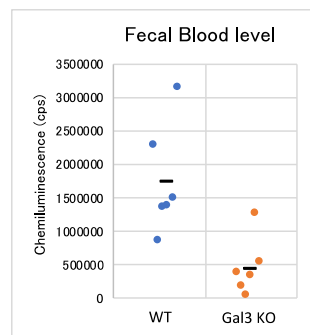
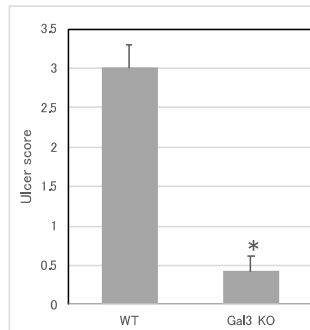
4. 研究成果

a. NSAID による小腸粘膜傷害時のマクロファージ活性化と腸管免疫の解析

インドメタシン投与による小腸潰瘍レベルは野生型(WT)に比べガレクチン-3 欠損マウス (Gal3 KO)

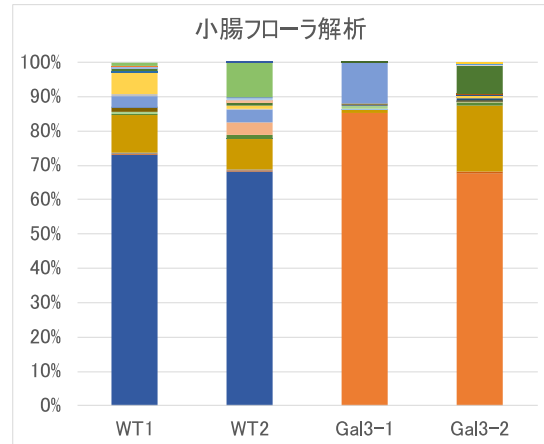
で有意に低かった。これは予備実験と逆の結果であった。予備実験では投与前に絶食していた点やインドメタシン濃度が高いなど、実験条件に修正が必要であったことから、本実験の結果がより生理的な条件下でのものであり、信頼性が

高いと考えている。また、血便のレベルもガレクチン-3 欠損マウスで低かった。このことから、ガレクチン-3 は小腸潰瘍形成に促進的に働いていることが考えられた。



b. 次世代シーケンサーを使った小腸フローラ解析

小腸内容物のフローラ解析では野生型、ガレクチン-3 欠損マウスいずれも 70%以上はラクトバチルスであった。それ以外の菌の分布を下図に示した。



野生型マウスでは多くがバクテロイデス (グラフの青) であったのに対し、ガレクチン-3 欠損マウスではクロストリジウム (グラフのオレンジ) であった。この違いが潰瘍形成の差に影響しているか否かは現時点では明らかではないが、腸管でのガレクチン-3 発現が腸内フローラに影響を持つことが本研究で初めて明らかにされたことは非常に興味深い。

c. NSAID による小腸粘膜傷害に対する改善方法の探索

ここでは 2 種の抗生剤と 1 種のプロバイオティクス (ロイテリ菌) を用いた。ネオマイシンとロイテリ菌に関しては投与による改善は無かった。ポリミキシン B 投与で潰瘍レベルが軽減されていた。この影響は野生型、ガレクチン-3 欠損マウス共に起きていた。ポリミキシン B はグラム陰性菌に有効な抗生剤である。ポリミキシン B 投与、非投与それぞれのマウスから得た糞便をスライドガラスに塗抹しグラム染色をした結果に明らかな違いは認められなかった。また、ポリミキシン B 投与による糞便中の菌数変化はプロピジウ

ムヨウガイドによる DNA 簡易染色によっては違いが見られなかった。ポリミキシン B が潰瘍形成の軽減に有効であることは明らかとなったが、このこととガレクチン-3 の有無には直接的な関係はない可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1 Kanai K, Park AM, Yoshida H, Tsunoda I, Yoshie O. IL-35 Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Airway Eosinophilia in EBI3-Deficient Mice. *J Immunol*. 2017 Jan 1;198(1):119-127. doi: 10.4049/jimmunol.1600506

2: Hagiwara S, Nishida N, Park AM, Komeda Y, Sakurai T, Watanabe T, Kudo M. Contribution of C1485T mutation in the HBx gene to human and murine hepatocarcinogenesis. *Sci Rep*. 2017 Sep 5;7(1):10440. doi:10.1038/s41598-017-10570-0.

3: Park AM, Omura S, Fujita M, Sato F, Tsunoda I. Helicobacter pylori and gut microbiota in multiple sclerosis versus Alzheimer's disease: 10 pitfalls of microbiome studies. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2017 Aug;8(3):215-232. doi: 10.1111/cen3.12401.

4: Park AM, Kanai K, Itoh T, Sato T, Tsukui T, Inagaki Y, Selman M, Matsushima K, Yoshie O. Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis.

PLoS One. 2016 Feb 9;11(2):e0148998. doi: 10.1371/journal.pone.0148998.

5: Park AM, Hagiwara S, Hsu DK, Liu FT, Yoshie O. Galectin-3 Plays an Important Role in Innate Immunity to Gastric Infection by Helicobacter pylori. *Infect Immun*. 2016 Mar 24;84(4):1184-1193. doi: 10.1128/IAI.01299-15.

[学会発表] (計 8 件)

1. 朴雅美 肺線維化における細胞周期制御因子の役割. 第 38 回日本炎症・再生医学会 2017 年

2. 朴雅美, 角田郁生. 細胞周期制御因子の肺線維化における新たな役割. 第 40 回分子生物学会 2017 年

3. 朴雅美 ヘリコバクター・ピロリ菌感染におけるガレクチン-3 の生体防衛的役割. 第 81 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2016 年

4. Ah-Mee Park. Galectin-3 is involved in *H. pylori* killing by macrophages. 23th International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophage. 2015 年

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/microbio/nihongo.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

朴 雅美 (PARK, Ah-Mee)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号 : 70469245

(2) 研究分担者

萩原 智 (HAGIWARA, Satoru)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号： 40460852

(3)連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者

角田 郁生 (TSUNODA, Ikuo)

近畿大学・医学部・教授