

令和元年6月20日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09326

研究課題名(和文) インドール含有青黛生薬の炎症制御機序解明および大腸癌抑制効果の検証

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms for inhibitory effects on colonic inflammation and cancer of indigo naturalis including indole compounds

研究代表者

長沼 誠 (Naganuma, Makoto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：00265810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、腸炎モデルおよび潰瘍性大腸炎において、青黛が容量依存性に腸炎抑制を有すること、また腸管上皮再生に關与するIL-22陽性細胞の割合およびmRNAレベルの発現亢進、およびFoxp3陽性細胞の増加が認められ、青黛の腸炎抑制効果に調節性T細胞が關与している可能性が示唆された。微生物相に対する青黛の有効性については、大腸炎モデルおよびUC患者における青黛治療によりBifidobacteriumが有意に変化した。

また腸炎誘導大腸癌モデルを用いて青黛による大腸癌抑制効果が確認され、青黛が炎症抑制と非依存的に大腸癌腫瘍抑制効果を有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青黛による抗炎症効果の作用機序が粘膜修復に關与するIL-22の亢進以外にも、青黛が調節性T細胞や腸内細菌叢に直接影響を及ぼし、炎症を抑制していることが明らかになった。また青黛が大腸癌の発症抑制に關与していることも示された。炎症性腸疾患患者において、既存治療抵抗・依存例は多く存在し、さらに慢性炎症の持続により大腸癌を発生することが社会的問題となっているが、今回の検討により機序不明であった青黛がマウスモデルおよび潰瘍性大腸炎患者において抗炎症効果を有し、その機序が明らかになったことは、今後新たな炎症性腸疾患の新規治療法の創薬探索に直結するものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this research subject, indigo naturalis has the control of enteritis in a dose-dependent manner in both mouse colitis model and patients with ulcerative colitis. The mechanisms of anti-inflammatory effect were associated with inducing IL-22 which repaired mucosal damage and the up-regulation regulatory T cells. For the efficacy of indigo naturalis on microbiota, the abundance of Bifidobacterium was significantly changed after treatment of indigo naturalis in colitis model and UC patients.

In addition, using the mouse model for colitis associated cancer, the inhibitory effect of indigo naturalis on colon cancer was confirmed, and it was revealed that indigo naturalis has an inhibitory effect on colitis associated cancers independently of inflammation suppression.

研究分野：消化器内科学

キーワード：AhR リガンド 生薬青黛 潰瘍性大腸炎 大腸癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難治性炎症性腸疾患 (IBD) では多くの治療法が開発・実用化されてきたが根治には至っていない。さらに、IBD において慢性炎症持続は大腸癌発生母地となり、従来の治療では制御できないのが実情である。我々は漢方生薬青黛にはインドール化合物が高濃度に含有することに着眼し、これまでに潰瘍性大腸炎での臨床的有効性を示してきた。しかしその作用機序については不明である。また潰瘍性大腸炎の炎症に伴い生じる大腸癌について、青黛が炎症を抑制することにより、腫瘍抑制効果を有するかについてもその機序を含めて不明である。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、研究期間内に青黛インドールと腸内微生物由来インドールとの相同・差異を明らかとし、その腸炎・発癌抑制機序を免疫学的、微生物学的観点から解明することを目的とした。本研究は、青黛インドールの治療メカニズム、治療効果予測や現在の治療指針における青黛の位置づけを明確にするものであり、新たな IBD 新規治療法の創薬探索に直結するものであると考へた。

### 3. 研究の方法

青黛の腸炎抑制効果の免疫学的機序・腸内細菌叢の関与および大腸癌抑制効果について検討するためにマウス腸炎モデルを対象とした研究を計画した。

- (1) 青黛の腸炎抑制効果における AhR・IL-22 を介した免疫学的機序との関連を解明するためにマウス腸炎モデルにおける青黛投与時の腸炎抑制効果、AhR およびサイトカイン mRNA 発現の検証を行った。
- (2) 青黛投与前後のヒト・マウス腸内細菌叢推移を 16s r RNA 系統解析にて行い、また青黛投与例の腸内細菌叢変化が腸炎抑制に対する影響を直接検討するために青黛有効患者/無効患者の糞便を無菌マウスに経口摂取させ、DSS 腸炎を惹起した際の腸炎活動度を検討した。
- (3) 炎症強度と炎症期間の異なる大腸癌発症マウスモデルに対する青黛の大腸癌抑制効果について検討した。

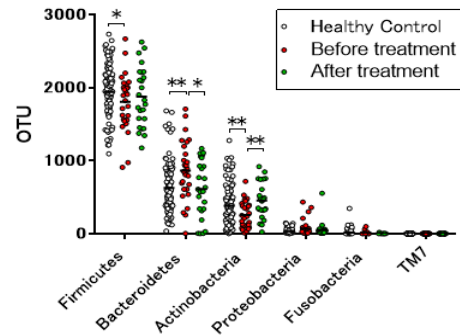
### 4. 研究成果

我々は本研究により、腸炎モデルおよび潰瘍性大腸炎において、青黛が容量依存性に腸炎抑制を有すること、および青黛が炎症抑制と非依存的に大腸癌腫瘍抑制効果を有することを明らかにした。

- (1) 青黛投与による腸炎抑制効果 DSS 大腸炎モデルにおいて、4%青黛投与により体重減少および大腸炎の抑制が認められた。免疫学的評価では、DSS 大腸炎モデルの腸管 LPMC の TNF、IL-6 の mRNA レベルの抑制が確認された。また腸管上皮再生に関与する IL-22 陽性細胞の割合および mRNA レベルの発現亢進、および Foxp3 陽性細胞の増加が認められ、青黛の腸炎抑制効果に調節性 T 細胞が関与している可能性が示唆された。腸内細菌解析においては、4%青黛投与群で dysbiosis の改善が見られた。
- (2) また青黛の成分の中で有効成分の抽出は、創薬開発につながると考えられたため、青黛の主要成分における腸炎抑制効果を検討した。特に含有率の高い indol、I3C に着目し、各々を経口投与し、DSS 大腸炎モデルにて比較検討を行った。Indigo、I3C 投与においては既報と異なり、DSS 腸炎は抑制されなかった。青黛内の主成分の一つである Betulin 投与にお

いても DSS 腸炎は抑制されなかった。一方で indol 投与においては軽度の改善効果を確認した。

- (3) マウスモデルにおいて青黛による腸内細菌の誘導および腸内細菌叢の変化により腸炎抑制に關すると考えたが、マウスと実際の潰瘍性大腸炎患者では腸内細菌叢が異なると考え、潰瘍性大腸炎患者に対して青黛を投与された患者の腸内細菌叢の変化について検討を行った。活動性潰瘍性大腸炎に対する青黛投与において、青黛治療前、治療後、健常人の糞便の腸内細菌叢解析を行った。門レベルでの解析では、Bacteroides はコントロールに比して治療前潰瘍性大腸炎で多く、治療により改善が認められた。また Actinobacteria については治療前潰瘍性大腸炎で優位に少なく、同様に治療より、回復が認められた(図)。属レベルにおいては Bacteroides と Bifidobacterium がコントロール群と治療前で異なり、治療によりコントロールに近づいていることが示された(Naganuma M, et al. Gastroenterology 2018)。治療による腸内細菌叢変化は青黛によるものか、治療効果によるものかは不明であるが、青黛治療の効果が認められなかった症例も含めて、腸内細菌叢の変化が認められたことより、腸内細菌叢変化の一部は青黛治療が關与している可能性が示唆された。また腸内細菌叢の変化は用量とは関係なく生じることが確認された。
- (4) 青黛投与された正常マウスの糞便腸内細菌解析において、Bifidobacterium の増加を認め、同糞便を無菌マウスに移植したところ、DSS 腸炎の抑制が確認された。
- (5) 青黛による腸炎関連大腸癌抑制効果：タモキシシリンを用いた腸炎誘導大腸癌モデルを用いて青黛による大腸癌抑制効果が確認された。また青黛が炎症抑制と非依存的に大腸癌腫瘍抑制効果を有することも明らかにした。



図：青黛治療前後の腸内細菌叢の推移（門レベル）

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

- 1) Fukuda T, Naganuma M, Kanai T. Current new challenges in the management of ulcerative colitis. Intest Res. 2019;17:36-44 doi:10.5217/ir.2018.00126. 査読あり
- 2) Naganuma M. Treatment with indigo naturalis for inflammatory bowel disease and other immune diseases. Immunol Med. 2019 Apr 29:1-6. doi: 10.1080/25785826.2019.1599158 査読あり
- 3) Naganuma M(1番目), Sugimoto S, Kanai T(26番目、corresponding author) et al. Efficacy of Indigo naturalis in a multicenter randomized controlled trial of patients with ulcerative colitis. Gastroenterology 2018;154:935-947. doi: 10.1053/j.gastro.2017.11.024. 査読あり

〔学会発表〕（計7件）

- 1) 吉松祐介、三上洋平、種本俊、野村絵奈、大野恵子、寺谷俊昭、杉本真也、南木康作、水野慎大、筋野智久、長沼誠、金井隆典 潰瘍性大腸炎に対する青黛による新規治療メカニズムの解明 日本消化器免疫学会 2018

- 2) Maganuma M, Kanai T. Recent evidences and future perspect of indigo naturalis for ulcerative colitis. JDDW international symposium 2018
- 3) 長沼誠、水野慎大、金井隆典 当院における消化管疾患に対する dysbiosis 改善の試み  
JDDW 2018 統合シンポジウム 2018
- 4) 長沼誠、金井隆典 炎症性腸疾患に対する青黛の有用性と今後の課題 日本炎症性腸疾患学会シンポジウム 2018
- 5) Naganuma M, et al. Indigo naturalis is effective in treatment-refractory patients with ulcerative colitis: Post-hoc analysis from INDIGO study. 2018.6 Annual meeting of American Gastroenterological Association. 2018
- 6) Naganuma M, et al. Indigo naturalis induces mucosal healing in patients with ulcerative colitis: A multicenter randomized controlled trial. Annual meeting of European Crohn and Colitis Organization. 2018
- 7) Naganuma M, et al Indigo naturalis is effective for inducing clinical remission and mucosal healing in patients with ulcerative colitis. (INDIGO study). United European Gastroenterology Week 2017

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

特になし

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

特に該当するものはなし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：金井 隆典

ローマ字氏名：Takanori, Kanai

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40245478

(2)研究協力者

研究協力者氏名：寺谷 俊昭

ローマ字氏名：Toshiaki, Teratani

研究協力者氏名：水野 慎大

ローマ字氏名：Shinta, Mizuno

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。