

令和元年5月31日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07022

研究課題名（和文）腸管上皮恒常性維持におけるSLC02A1遺伝子変異とPGE2分泌能変化の影響

研究課題名（英文）The effect of SLC02A1 loss-of-function mutations in the SLC02A1 gene and the secretion of PGE2 in intestinal homeostasis

研究代表者

西田 裕 (Nishida, Yu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期臨床研究医

研究者番号：60804705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：SLC02A1の全身性ノックアウトマウスと腸管上皮特異的ノックアウトマウスを作成し、腸管における表現型およびDSS誘発性腸炎モデルを解析した。SLC02A1欠損のみでは自然発症腸炎を認めなかったが、DSS誘発腸炎において、全身性ノックアウトマウスでは腸炎悪化を認めた。一方で、SLC02A1の腸管上皮特異的ノックアウトマウスでは腸炎悪化を認めなかった。これらのことから、潰瘍症の発症には二次的因子が関与することが示唆され、SLC02A1は腸管恒常性維持に重要な因子であることが明らかとなった。また、腸管上皮以外の細胞におけるSLC02A1が炎症制御や組織修復に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非特異性多発性小腸潰瘍症の疾患遺伝子として、プロスタグランジン輸送蛋白であるSLC02A1の変異が報告され、その発現・機能の低下が病因であると推定されている。しかし、SLC02A1機能低下による腸炎発症メカニズムは未だ明らかとなっておらず有効な治療法も確立されていない。今回の検討により、SLC02A1における潰瘍発症機序の一端が判明した。今後、非特異性小腸潰瘍症の病態や治療薬の創薬につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We used systemic knockout mice (SLC02A1^{-/-}) and conditional SLC02A1 knockout mice in intestinal epithelium (SLC02A1^{IEC}). SLC02A1^{-/-} mice had no spontaneous enteritis or colitis. In DSS colitis model, SLC02A1^{-/-} mice had more severe colitis compared with wild-type mice, but not SLC02A1^{IEC} mice. These findings suggest that the second hit is necessary for the onset of ulceration and SLC02A1 are important for intestinal homeostasis. SLC02A1 in cells other than intestinal epithelium is important for inflammation control and tissue repair. Our findings might have potential therapeutic implications for intestinal inflammation associated with SLC02A1.

研究分野：消化器内科

キーワード：SLC02A1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

非特異性多発性小腸潰瘍症と遺伝子変異

非特異性多発性小腸潰瘍症は、若年からの潜・顕出血に伴う鉄欠乏性貧血や低蛋白血症を特徴とする難治性小腸潰瘍症であり、これまでも遺伝性疾患である可能性が示唆されていたにもかかわらず、原因が同定されていなかった。2015年に梅野らによって、本疾患患者で4箇所のプロスタグランジン E2 (PGE2) を主な基質とするトランスポーターをコードする遺伝子である *SLCO2A1* 遺伝子における点変異が発見され、これらの点変異はコードされる蛋白質の発現・機能低下をもたらすことが確認された (Umeno J. *PLoS Genetics* 2015)。本疾患患者と健常者・クローン病患者の遺伝子解析の結果から、本疾患の責任遺伝子が *SLCO2A1* であることが同定され、本疾患への新たな光明となった。また、時期を同じくして、2015年1月1日より施行された“難病の患者に対する医療等に関する法律”の対象となる指定難病の一つに本疾患が追加され、今後更に本疾患の疫学や患者背景が明らかになると考えられる。しかし、*SLCO2A1* の機能低下が遺伝的原因と考えられる非特異性多発性小腸潰瘍症では、従来考えられていた PGE2 の再取り込み・代謝抑制から細胞外に過剰な PGE2 が存在することが推測され、その疾患表現型と矛盾する。一方で気管上皮細胞と大腸癌細胞においては *SLCO2A1* の PGE2 の細胞外への分泌能も報告されており (Shirasaka Y. *J Endocrinol.*2013, Kasai T. *Exp Cell Res.* 2016)、腸管上皮細胞における *SLCO2A1* による PGE2 代謝に関して一定の見解が得られていない。さらに、*SLCO2A1* 機能低下による腸炎発症メカニズムは未だ明らかとなっておらず、非特異性多発性小腸潰瘍症に対して、未だ有効な治療法が確立されていない状況にある。その為、非特異性多発性小腸潰瘍症の病態理解や新規治療法探索には、腸管恒常性維持における *SLCO2A1* の役割解明が必要である。*SLCO2A1* の発現・機能低下による腸炎発症の新たな機序が明らかとなれば、腸管恒常性維持における *SLCO2A1* の生理的役割の解明につながることで期待できるだけでなく、非特異性小腸潰瘍症だけでなく、クローン病を含む炎症性腸疾患への新たな治療薬開発につながることも期待できる。

2. 研究の目的

SLCO2A1 の PGE2 代謝に関連した研究は数多いが、*SLCO2A1* 遺伝子変異による発現・機能低下による小腸潰瘍形成の機序はいまだ不明である。そのため、非特異性多発性小腸潰瘍症の病態理解や新規治療法探索には、腸管上皮恒常性維持におけるより詳細な *SLCO2A1* の役割解明が必要である。そこで本研究では、*SLCO2A1* 欠損マウスを用いて、*SLCO2A1* の腸管粘膜傷害における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸管上皮特異的 *Slco2a1* ノックアウトマウスおよび全身ノックアウトマウスの作出

腸管上皮特異的 *SLCO2A1* ノックアウトマウス (*Slco2a1^{ΔIEC}* マウス) は、*Slco2a1^{fllox/flox}* マウスと *Villin-cre^{Tg/wt}* マウスを交配して作成し、*Slco2a1^{fllox/flox}* マウスを control とした。*Slco2a1* の全身ノックアウトマウス (*Slco2a1^{-/-}*) のコントロールには B6 マウス (Wt マウス) を使用した。*Slco2a1^{-/-}* マウスと *Slco2a1^{ΔIEC}* マウスにおいて、自然発症腸炎の有無を検討し、腸管における表現型を解析した。

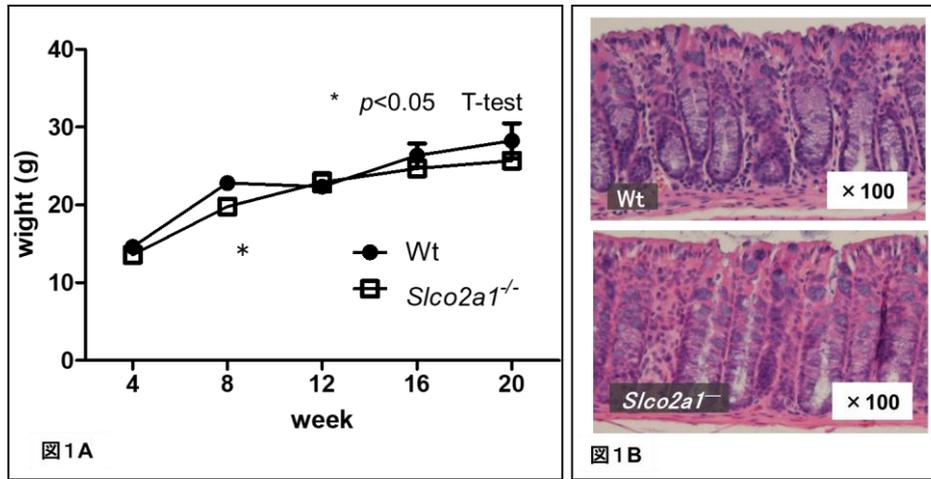
(2) ノックアウトマウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎モデルの作出

上記ノックアウトマウスに 3.5% dextran sulfate sodium (DSS) 水溶液を7日間自由飲水投与した。DSS での腸炎誘発後に、体重比較を行った後、大腸を摘出し、組織学的腸炎スコアの評価、real-time RT-PCR による mRNA 発現の解析および q PCR による炎症性サイトカインなどの遺伝子発現の評価を行った。

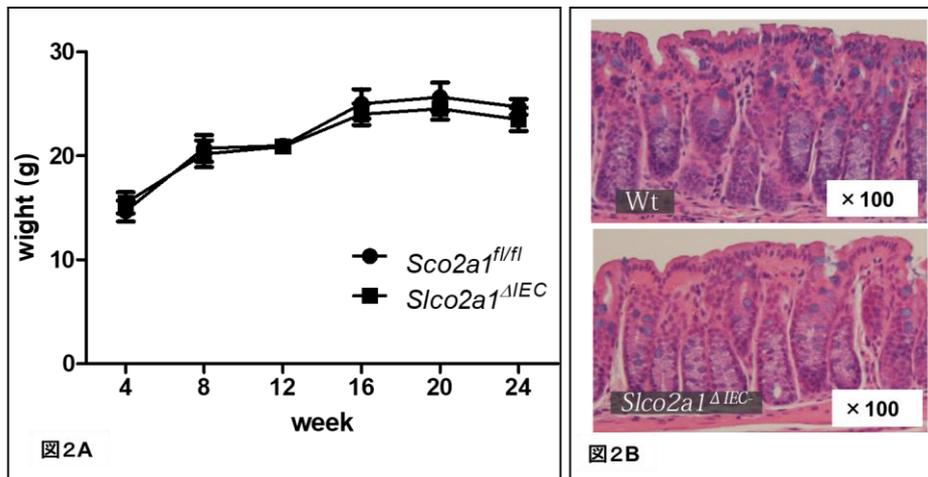
4. 研究成果

(1) 腸管上皮特異的 *Slco2a1* ノックアウトマウスおよび全身ノックアウトマウスにおける自然発症腸炎の検討

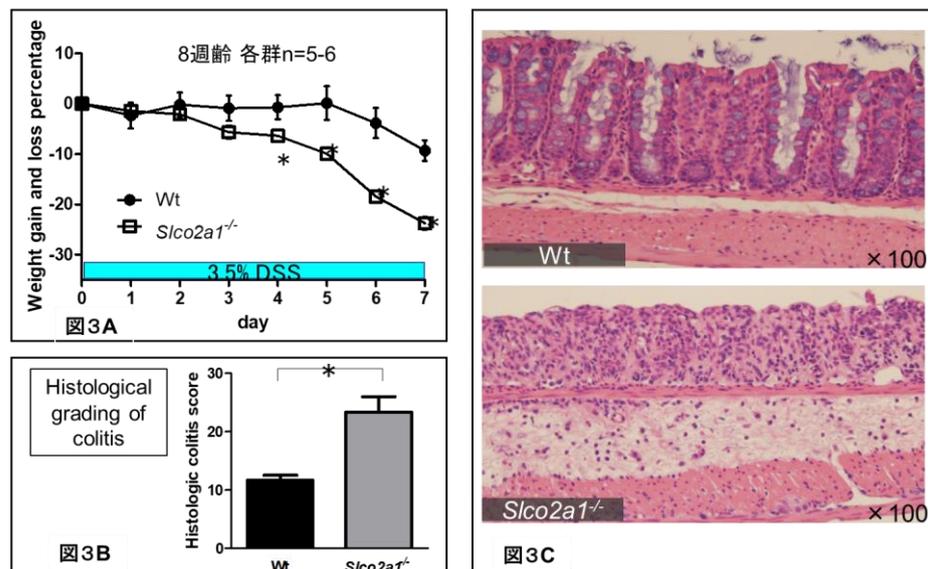
Slco2a1^{-/-} マウスと *Slco2a1^{ΔIEC}* マウスの表現型の解析を行った。*Slco2a1^{-/-}* マウスではコントロールマウスと比較して8週で体重減少を認めたが、その他の週数では、明らかな体重差は認めなかった (図 1 A)。また、摘出した大腸の HE 染色ではコントロールマウスの大腸の病理所見と比較して炎症所見は認めなかった (図 1 B)。また大腸における Interleukin (IL)-1β、Tumor necrosis factor (TNF)-α と IL-6 の mRNA 発現も *Slco2a1^{-/-}* マウスとコントロールマウスで差は認めなかった。また小腸でも同様の評価を行ったが *Slco2a1^{-/-}* マウスとコントロールマウスで HE 染色での炎症所見や、小腸における IL-1β、TNF-α と IL-6 の mRNA 発現も差は認めなかった。



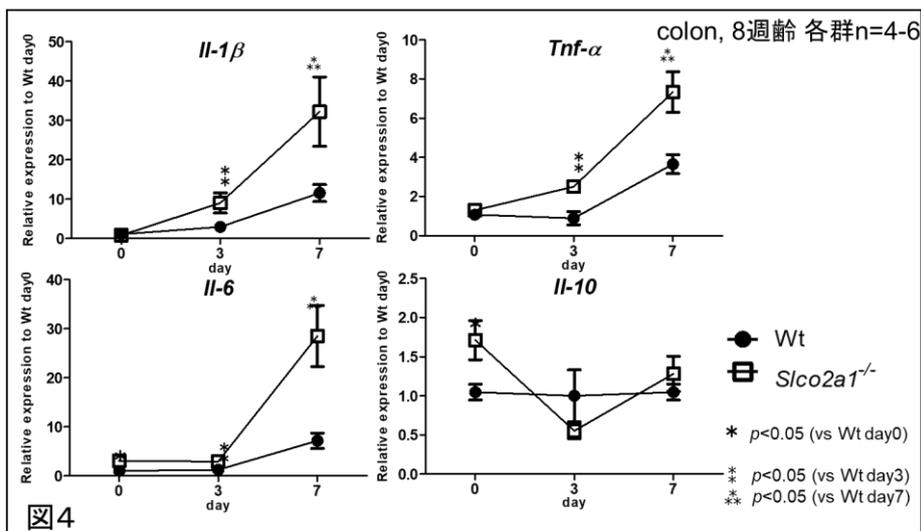
また同様に、*Slco2a1*^{AIEC} マウスでも検討を行ったが、各週齢の体重変化も差はなく (図 2 A)、摘出した大腸の HE 染色ではコントロールマウスの大腸の病理所見と比較して炎症所見は認めなかった (図 2 B)。また大腸における IL-1 β 、TNF- α と IL-6 の mRNA 発現も *Slco2a1*^{-/-} マウスとコントロールマウスで差は認めなかった。また小腸でも同様の評価を行ったが *Slco2a1*^{-/-} マウスとコントロールマウスで差は認めなかった。



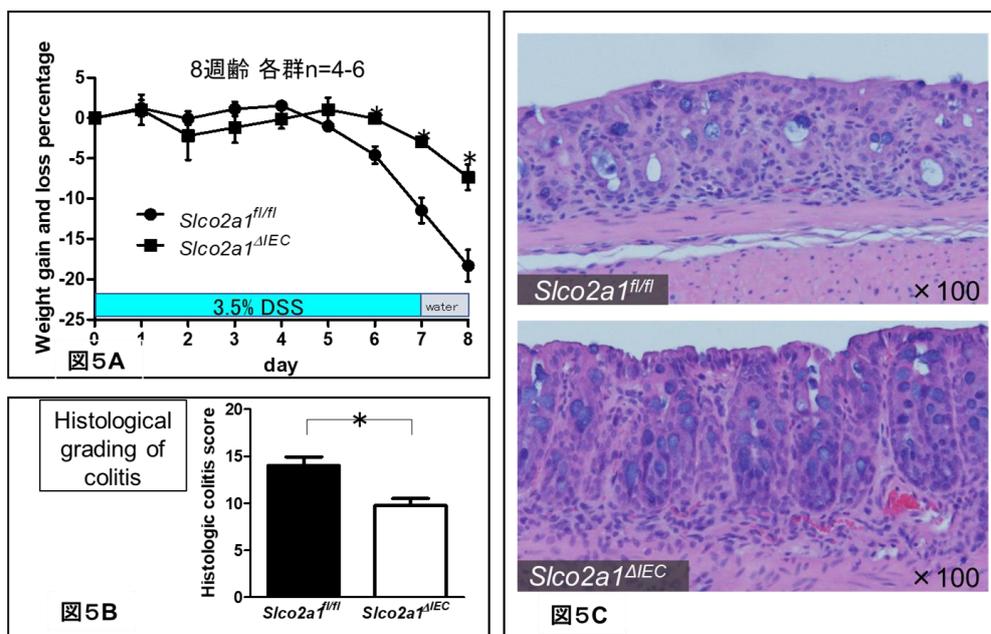
(2) ノックアウトマウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎モデルの検討
 上記のノックアウトマウスを用いて、DSS 誘発性腸炎モデルにおける *Slco2a1* の役割を検討した。*Slco2a1*^{-/-} マウスで DSS 腸炎誘発性腸炎モデルを作成し検討を行った。DSS 自由飲水後の体重減少率は、野生型マウスと比較して大きかった (図 3 A)。また、組織学的腸炎スコアも、野生型マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-} マウスでは高かった (図 3 B、図 3 C)。



また腸管における IL-1 β 、Tnf- α と IL-6 の mRNA 発現は *Slco2a1*^{-/-}マウスで野生型マウスと比較して高値を示した (図4)。



一方、*Slco2a1* ^{Δ IEC}マウスでのDSS腸炎誘発性腸炎モデルにおいては、体重減少率は軽減された (図5A)。また、組織学的腸炎スコアは、野生型マウスと比較して *Slco2a1* ^{Δ IEC}マウスでは低かった (図5B、図5C)。



以上の結果から *Slco2a1* 欠損のみでは自然発症腸炎を認めなかったことから、潰瘍症の発症には二次的因子が関与することが示唆された。DSS 誘発腸炎において、*Slco2a1* は腸管恒常性維持に重要な因子であることが明らかとなったが、*Slco2a1* の腸管上皮特異的ノックアウトマウスでは腸炎悪化を認めなかったことから、腸管上皮以外の細胞における *Slco2a1* が炎症制御や組織修復に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Rieko Nakata, Shuhei Hosomi, Yoshinobu Nakamura, Naoko Sugita, Yu Nishida, Shigehiro Itani, Koji Otani, Fumio Tanaka, Yasuaki Nagami, Noriko Kamata, Koichi Taira, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Takeo Nakanishi, Ikumi Tamai, Yasuhiro Fujiwara, *SLCO2A1* DEFICIENCY EXACERBATES EXPERIMENTAL COLITIS VIA INFLAMMASOME ACTIVATION IN MACROPHAGES. Digestive Disease Week, 2019/5/20、サンディエゴ

②中田理恵子、細見周平、奥田博朗、古瀬味澄、杉田奈央子、西田裕、鑄谷成弘、鎌田紀子、山上博一、谷川徹也、渡辺俊雄、中村吉伸、中西猛夫、藤原靖弘、腸管粘膜傷害におけるプロスタグランジン輸送蛋白(Slco2a1)の役割の検討、日本消化器免疫学会、2018/12/8、アクロス福岡（福岡）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：講師

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：細見 周平

ローマ字氏名：Hosomi Shuhei

研究協力者氏名：中田 理恵子

ローマ字氏名：Nakata Rieko

研究協力者氏名：中西 猛夫

ローマ字氏名：Nakanishi Takeo

研究協力者氏名：中村 吉伸

ローマ字氏名：Nakamura yoshinobu

※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。