

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0067

研究課題名(和文)マクロ調節機構に基づく新規炎症性疾患概念の確立

研究課題名(英文)New inflammatory disease concept based on the macro-regulatory system

研究代表者

平田 喜裕(Hirata, Yoshihiro)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10529192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎と原発性硬化性胆管炎を肝臓と大腸の病態を制御するマクロ調節機構の破綻ととらえて病態発生メカニズムを検討した。潰瘍性大腸炎モデルでは副交感神経刺激により、大腸炎と上皮細胞の分化障害は改善したが、胆管炎の改善は認めなかった。一方硬化性胆管炎モデルでは抗生剤投与により胆管周囲の炎症細胞浸潤、繊維化が改善し、胆管上皮細胞の増殖刺激が減弱した。サイトカインIL-33の腹腔内投与は胆管の炎症細胞浸潤、上皮の過形成を誘導したが、大腸の炎症や分化異常、腸内細菌数の変化は見られなかった。これらの結果より大腸炎と胆管炎には細菌、サイトカイン、神経などの因子が交絡して影響している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管と肝臓など多臓器にまたがる調節機構は十分に解明されていない。本研究ではしばしば合併がみられるものの原因不明である潰瘍性大腸炎と原発性硬化性胆管炎が様々な相互因子、マクロ調節機構で制御されている可能性について検討した。今回の検討で、腸内細菌叢が潰瘍性大腸炎、胆管炎のどちらにも増悪因子として関与しており、肝臓と腸管のマクロ調節機構の一部となっていることが明らかになった。今後腸内細菌叢に影響を与える因子やその制御法を開発することで、これらの病気の原因解明や新規治療法に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To understand the etiology of ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis, we have investigated the macro-regulatory system of the gut-liver axis. To stimulate parasympathetic nerve system, acetylcholine analogue was administered to colitis model mouse. Colitis was ameliorated without apparent changes on microbial number or composition, but cholangitis, which was also observed in our colitis model mouse, was not affected by the treatment. In another primary sclerosing cholangitis model mouse, antibiotic treatment effectively reduced the disease activities, such as inflammatory cell infiltration, fibrosis, and epithelial cell abnormality with the reduction of stool bacterial number, suggesting the important role of microbiota on gut-liver axis. IL-33 administration induced the intrahepatic bile duct epithelial hyperplasia with leukocytes infiltration, but showed little effect on the colonic phenotype or microbiota, suggesting limited role of IL33 on gut-liver axis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆管炎 大腸炎 腸肝相関 神経 腸内細菌叢 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

しばしば合併がみられ原因が未解明の疾患群として、潰瘍性大腸炎と原発性硬化性胆管炎がある。潰瘍性大腸炎は大腸に原因不明の慢性的持続的な炎症を引き起こす病態であり、現在日本で罹患者が10万人程度いると考えられている。一方、原発性硬化性胆管炎は胆管に慢性の炎症に伴う狭窄をきたす疾患であり、患者数は1000人に満たない程度であるが約1/3に潰瘍性大腸炎を合併することが報告されている。いずれの疾患にも根治的な治療法は開発されておらず、発症のリスクも高い。これらの疾患の合併の機序としては、免疫異常の関与が想定され、遺伝的背景、腸内細菌叢、環境因子などの影響も検討されているが、全くわかっていないのが現状である。一方腸管と肝臓は、神経やホルモン、さらに胆汁や微生物などの腸管内容物を介してお互いの機能を制御していることも知られており、腸肝相関とよばれている。この体内における臓器間のマクロな調節機構は生体の恒常性の維持に重要であるが、病態発症への関連についてはほとんどわかっていない。我々は潰瘍性大腸炎の研究過程で興味深い発見をした。樹状細胞のTGF β シグナルの破綻によって潰瘍性大腸炎を発症することを明らかにしたが、同時に腸内細菌叢の異常と胆管炎が観察された。一方、潰瘍性大腸炎で発現が低下しているE-cadherin分子をマウスの大腸上皮細胞で一過性のノックアウトしたところ、大腸には全く異常が起こらなかったが、肝臓で胆管に沿った炎症細胞浸潤と胆汁鬱滞を呈し、原発性硬化性胆管炎類似の病態を発症した。臨床検体においても原発性硬化性胆管炎では、胆管細胞におけるE-cadherinの発現低下が見られた。これらの結果からE-cadherinや腸内細菌叢の異常は大腸と肝臓の疾患、すなわち潰瘍性大腸炎と原発性硬化性胆管炎を結び付ける異常の可能性がある。

2. 研究の目的

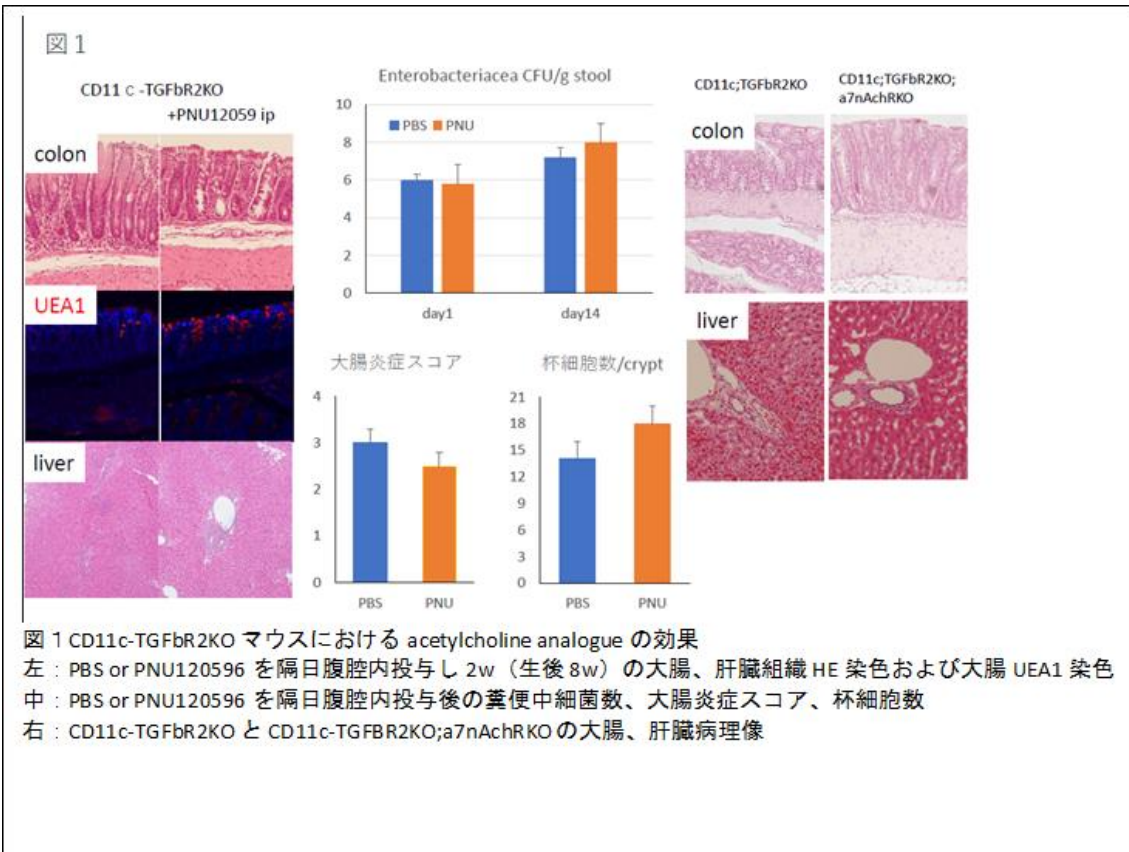
大腸と肝臓の間に存在するさまざまな因子による複雑系をマクロ調節機構として包括的に検討することによって、潰瘍性大腸炎と硬化性胆管炎を一義的に説明する炎症性疾患モデルを作成し、その発症制御機序を明らかにする。

3. 研究の方法

マウスモデル：樹状細胞における遺伝子改変にCD11c-creマウスを用いた。潰瘍性大腸炎モデルとして樹状細胞特異的TGF β R2ノックアウトマウス(CD11c-cre; TGF β R2 f/f)を用いた。アセチルコリン刺激の効果を検討するために α 7nAChRノックアウトマウス(α 7nAChR f/f)を用いた。硬化性胆管炎モデルとしてK19-creERT; KrasG12D; CDH1 f/fマウスを用いた。薬剤投与：アセチルコリン刺激としてニコチン(20ug/ml; 自由飲水)、PNU12059(10ug/g ip; 隔日)を投与した。抗生剤としてNeomycin+Metronidazole (1g/L, 1g/L; 自由飲水)を投与した。リコンビナントIL-33は1ug/mouse ip; 連日1wで投与した。タモキシフェンによる遺伝子改変は4mg/mouse oral gavage; 2日連続で行った。解析：大腸、肝臓はホルマリン固定後のHE染色で検討した。また各種抗体で免疫染色を行った。腸内細菌は糞便の培養、16SrRNAのPCRで検討した。炎症細胞浸潤は臓器をコラゲナーゼで処理して細胞を単離し、フローサイトメーターで解析した。

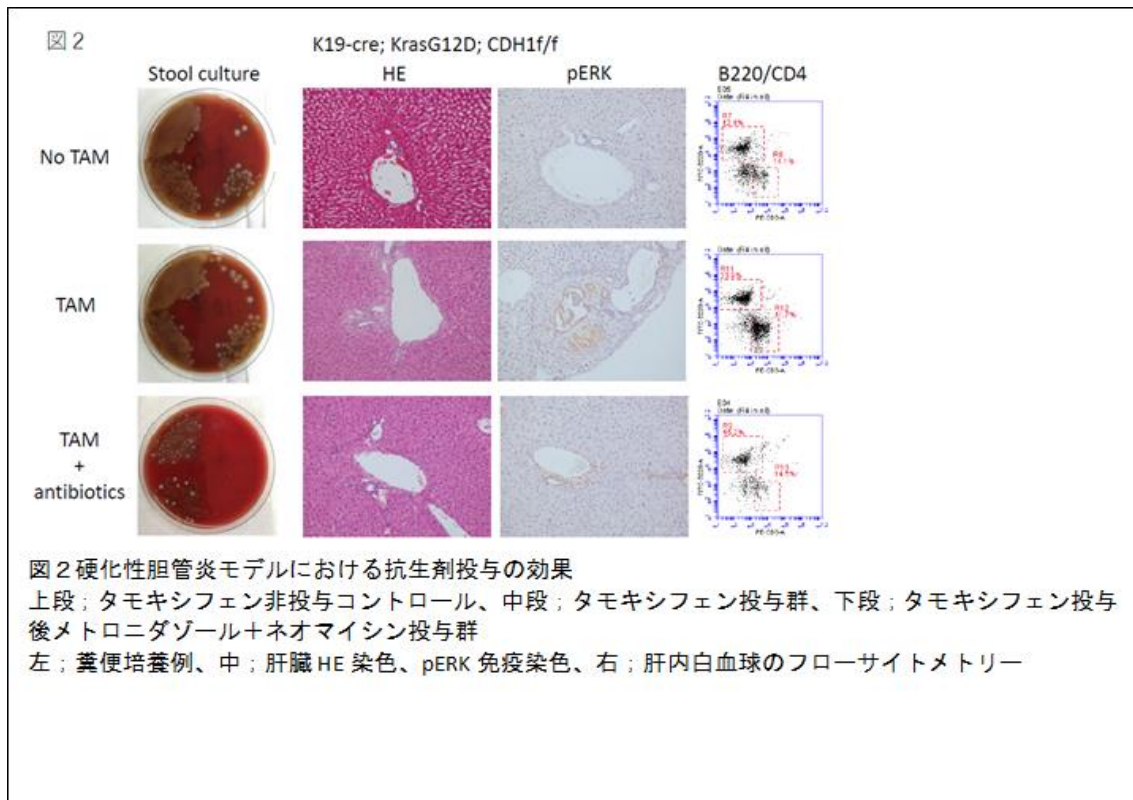
4. 研究成果

1. 樹状細胞特異的 TGFβR2 ノックアウトマウスを用いた大腸炎と胆管炎の制御機構の解析
 報で報告したように樹状細胞特異的 TGFβR2 ノックアウトマウス (CD11c-cre; TGFβR2 f/f) では腸内細菌科細菌の増加を伴う大腸炎を認めた。また肝内胆管に硬化性胆管炎様の炎症も確認された。このモデルにおける副交感神経の役割を明らかにするためにアセチルコリン受容体刺激薬 (PNU120596, nicotine) を投与した。大腸組織では杯細胞の減少が改善され、炎症細胞の減弱がみられた。糞便中の腸内細菌科細菌の菌量は減少せず、また肝内胆管の炎症は減弱されなかった。さらにアセチルコリン受容体の構成分子である α7nAChR をノックアウトしたマウスを用い樹状細胞特異的にノックアウトしたマウスを作成した (CD11c-cre; TGFβR2 f/f; α7nAChR f/f)。大腸炎の悪化はみられたが、肝内胆管の炎症は悪化がみられなかった。この結果から、副交感神経刺激はより胆管よりは大腸の炎症抑制に有用であること、腸肝相関に対する自律神経系の関与は限定的であることが明らかになった (図1)。



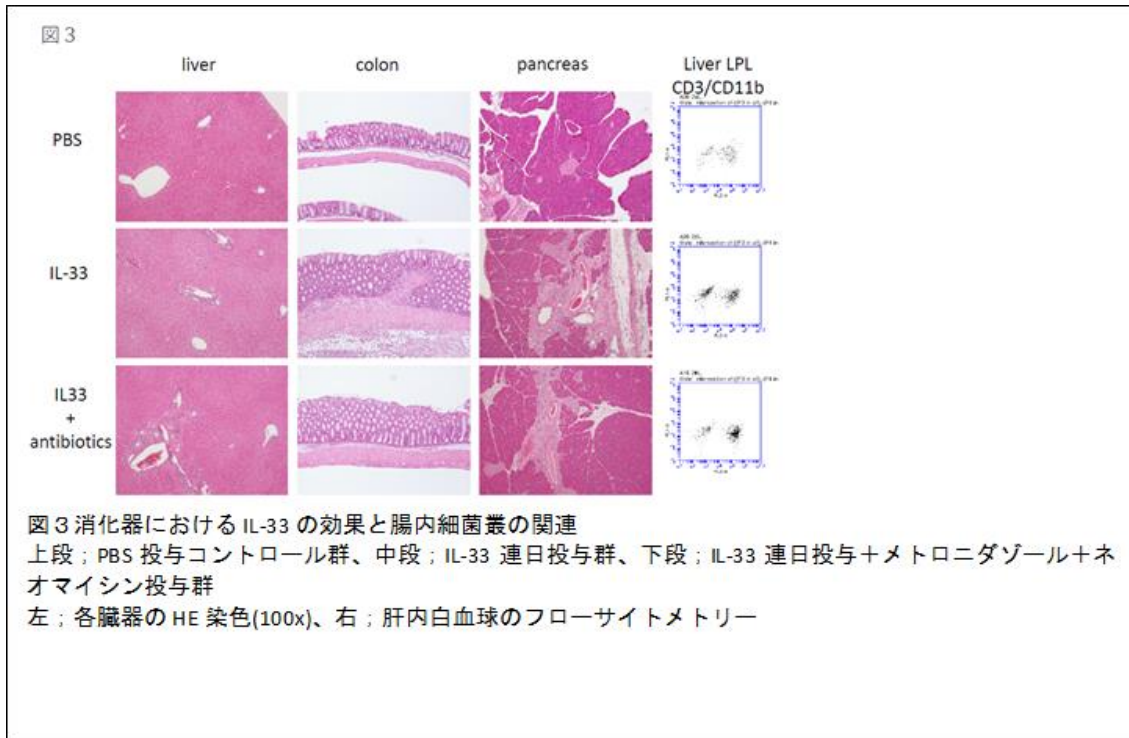
2. 原発性硬化性胆管炎の病態における腸内細菌叢の影響

我々が樹立した KRT19 陽性胆管細胞の変異型 Ras 発現 E-cadherin ノックアウトマウス (K19-cre; RasG12D; CDH1 f/f) は硬化性胆管炎様の胆管上皮周囲の膠原繊維の増生と炎症細胞浸潤がみられる。この胆管病理像における腸内細菌叢の影響を検討するためにメトロニダゾールとネオマイシンを投与した。糞便中の細菌数は好気性、嫌気性ともに著減した。この変化に対応し、肝内胆管周囲の炎症細胞浸潤、繊維化ともに減弱していた。さらにコントロール群で認められた胆管上皮細胞の MAPK シグナルの活性化および幹細胞マーカー CD44 蛋白の発現も抗生剤投与によって著明に減弱した。またフローサイトメトリー法を用いて肝内の炎症細胞の定量を行ったところ、タモキシフェンによる胆管炎の発症とともに CD4 陽性リンパ球が著増し、抗生剤投与によって減少していることが明らかになった。このモデルの検討からは原発性硬化性胆管炎においては腸内細菌叢そして T リンパ球を介した腸肝相関、マクロ調節機構が働いている可能性が示唆された (図 2)。



3. 腸肝相関における IL-33 の影響

既報より IL-33 が胆管の増生と腫瘍化に関連していることがわかった。そこでこのサイトカインが腸肝相関に与える影響を検討した。IL-33 の腹腔内投与により肝内胆管の増生と著明な炎症細胞浸潤がみられたが、大腸では上皮細胞の増殖、炎症細胞の増加もみられなかった。この IL-33 による胆管上皮および肝内の炎症細胞浸潤は抗生剤の投与によっても改善を認めなかった。ちなみに IL-33 投与は胃、膵臓にも著明な CD11b 陽性骨髄球の浸潤をきたした (図 3)。これらからサイトカイン IL-33 は大腸よりは胆管、胃、膵臓などの炎症の悪化に関連し、一方大腸炎における影響は限定的であることが明らかになった。またこの作用は腸内細菌叢非依存的である可能性が示唆された。さらにマウス胃炎モデルにおけるサイトカイン発現と上皮細胞の変化についても検討した。今後臓器特異的な IL-33 強制発現系を用いてこのサイトカインの役割について検討する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下綾 平田喜裕 小池和彦
2. 発表標題 腸炎におけるアセチルコリンシグナルの役割
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aya Yamashita, Yuka Kurihara, Hisayoshi Natomi, Sozaburo Ihara, Yoku Hayakawa, Hayato Nakagawa, Kazuhiko Koike, Yoshihiro Hirata
2. 発表標題 Analysis of cholinergic anti-inflammatory effects in murine cholangitis
3. 学会等名 IMSUT Commemorative Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Hirata
2. 発表標題 Targeting dendritic cells in inflammatory bowel disease
3. 学会等名 the 25thEast Asia Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田 喜裕
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における上皮の分化と分子標的治療
3. 学会等名 第12回南大阪IBDセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田喜裕、木下裕人
2. 発表標題 原発性硬化性胆管炎における腸内細菌叢の役割解明と新規治療法の開発
3. 学会等名 東京大学医科学研究所国際共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------