

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08380

研究課題名(和文) 包括的微生物叢解析による5-ASA抗炎症作用機序の解明と新規IBD治療戦略の探索

研究課題名(英文) Investigating the anti-inflammatory mechanism of 5-ASA and exploring the new therapeutic strategy for IBD by the comprehensive analysis for the gut microbiome

研究代表者

久松 理一 (Hisamatsu, Tadakazu)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60255437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノサリチル酸製剤(5-ASA)は、炎症性腸疾患(IBD)治療薬として広く用いられている。しかし5-ASA製剤の作用機序は明らかではない部分も多い。本研究では、SPF環境飼育下マウスおよび無菌マウスを用いた16S rRNA amplicon sequencingによる細菌構成解析や宿主の腸管粘膜における免疫学的解析を行い、5-ASA投与により腸管微生物叢が変化し宿主の腸管免疫・防御機構に影響を与えることを明らかにし、5-ASAの抗炎症作用機序の1つであ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

5-アミノサリチル酸製剤(5-ASA)は、比較的安価であり、その忍容性と有効性が長期的に実証されている炎症性腸疾患(IBD)治療薬である。IBD患者数は増加傾向にあり、5-ASA製剤の抗炎症機序を明らかにすることは、医学的のみならず医療経済に貢献する新たな治療選択肢の開発につながる可能性がある。本研究成果は、5-ASAの腸管微生物叢を介する作用機序の解明、IBD治療に用いるプロバイオティクスの探索につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：5-aminosalicylic acid (5-ASA) is widely used as a therapeutic agent for inflammatory bowel disease (IBD). However, the anti-inflammatory mechanism of 5-ASA remains unclear. The present study analyzed the gut bacterial compositions using 16S rRNA amplicon sequencing and assessed the host intestinal mucosal immune system. This study showed that 5-ASA alters the gut microbiome affecting intestinal immunity. These results suggested that the impact of 5-ASA on the gut microbiome is one of the anti-inflammatory mechanisms of 5-ASA.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 5-アミノサリチル酸 腸管微生物叢 抗炎症作用

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) 患者数は増加傾向にあり (Kaplan et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015)、安全、有効かつ経済的な治療法の開発はきわめて重要な医学的、社会的課題である。IBD の病態生理として遺伝的背景や環境因子をもとに生じる免疫異常が想定されている。IBD に関与する環境因子として、食事内容や衛生環境などさまざまな要因が指摘されているが、近年では特に腸管微生物叢 (microbiota) が大きな役割を果たしていると考えられている。5-アミノサリチル酸製剤 (5-ASA) は、比較的安価であり、その忍容性と有効性が長期的に実証されている IBD 治療薬である。しかし 5-ASA 製剤の作用機序は明らかではない部分も多い。そのため 5-ASA 製剤の機序を明らかにすることは、医学的のみならず医療経済に貢献する新たな治療選択肢の開発につながる可能性がある。潰瘍性大腸炎 (UC) 患者において 5-ASA により腸管 microbiota に変化が生じるという報告がなされている (Xu et al. Front Microbiol. 2018, Jun et al. Inflamm Bowel Dis. 2020) が、これらは腸管炎症が存在する環境での検討であり、炎症改善による影響や 5-ASA の抗炎症作用との因果関係は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 5-ASA 経口摂取により腸管 microbiota が変化する、(2) 5-ASA により変化した腸管 microbiota は宿主腸管の防御機構・免疫機構に影響を与える、(3) 5-ASA により変化した腸管 microbiota は腸炎に対して防御的に作用する、という仮説を立て、検証を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

目的 1 : 5-ASA 経口摂取による腸管 microbiota への影響の評価

SPF 環境で飼育する野生型 C57BL/6 マウスに 5-ASA を経口摂取させて腸管細菌叢の変化を 16S rRNA amplicon sequencing により評価した。腸管 microbiota には性差があることが知られており、実験動物は雌雄を用いた。5-ASA 投与量は IBD 臨床現場におけるヒトへの投与量を考慮し、ヒト体重 60kg における 5-ASA 4000mg 相当量を投与した。

目的 2 : 5-ASA により変化した腸管 microbiota の宿主腸管の防御機構・免疫機構への影響の解析

上記目的 1 についての実験で得られた 5-ASA 投与群、非投与群の SPF マウスの腸管粘膜防御機構・免疫機構を評価するとともに、腸管内に残存する 5-ASA 自体の影響を除外するために、これら 2 群の腸管 microbiota をアイソレーター内で飼育する無菌マウスに移入して腸管粘膜防御機構・免疫機構に与える影響を評価することとした。異なるアイソレータ内の無菌雌マウスに上記の SPF マウス (5-ASA 投与群、非投与群) の糞便をそれぞれ移入し、各アイソレータ内で無菌雄マウスと交配して仔マウスを得て、これらの仔マウスの一部を解析に用いた。本解析では、大腸粘膜から RNA を抽出し mRNA 発現量を qPCR により評価した。

目的 3 : 5-ASA により変化した腸管 microbiota が腸炎に対して防御的に作用するかについての検討

上記目的 2 で得られた仔マウスの一部をデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎モデルに用い、異なる腸管 microbiota (5-ASA 投与群、非投与群) が移入されたアイソレーター間で腸炎発症・重症度に差異が生じるかを検討した。

## 4. 研究成果

目的 1 について、雌雄ともに 5-ASA 経口摂取により、経時的に腸管細菌叢の  $\alpha$ -diversity が低下傾向となり、また細菌構成が変化することが明らかとなった (図 1)。特に雌マウスでは *Allobaculum* 属の有意な増加を認めた。雄マウスでも同様の傾向を認めた。

目的 2 について、SPF マウスでは、5-ASA 投与群で雌雄ともに IL10、IL22 の mRNA の発現増加を認めた。これらの結果は 5-ASA 傾向摂取により腸管粘膜の免疫機構が抗炎症性に傾くことを示唆していると考えられた。次に、無菌マウスへの腸管 microbiota 移入を行った検討では、仔マウスにおいて腸間膜リンパ節では雌

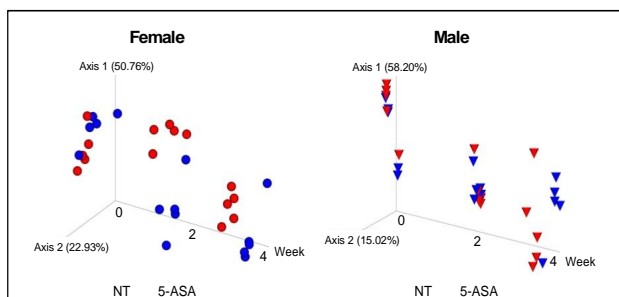


図 1 : 腸管細菌叢の経時的変化

5-ASA 非投与群 (NT 群) と投与群 (5-ASA 群) の 4 週間の経過を Weighted UniFrac distances の PCoA プロットで示す。Week 0 が投与開始時である。

マウスで T-bet 陽性 CD4+T 細胞の有意な増加を認め、雄マウスで ROR $\gamma$ t 陽性 CD4+T 細胞の有意な増加を認めた。大腸粘膜では、5-ASA 投与群由来の腸管 microbiota を有する仔マウスにおいて TGF- $\beta$ 、Claudin 2、Claudin 3 の mRNA 発現増加を認めた (図 2)。

目的 3 について、5-ASA 投与群由来の腸管 microbiota を有する雄仔マウスにおいて、DSS 誘導性腸炎の臨床的活動性 (disease activity index) および腸管長あたりの重量 (g/cm) の有意な低下、腸管組織学的炎症重症度の低下傾向を認めた。

以上より、5-ASA 投与により腸管微生物叢が変化し宿主の腸管免疫・防御機構に影響を与えることが、5-ASA の抗炎症作用機序の 1 つである可能性が示唆された。また、今後の研究課題として、5-ASA により変化した腸管細菌叢に特定のプロバイオティクス候補が存在するかの検討、5-ASA により変化した腸管 microbiota の機能的変化の評価、5-ASA により変化した腸管 microbiota が宿主の大腸粘膜免疫機構に影響を与える機序の検討が有意義であると考えられた。

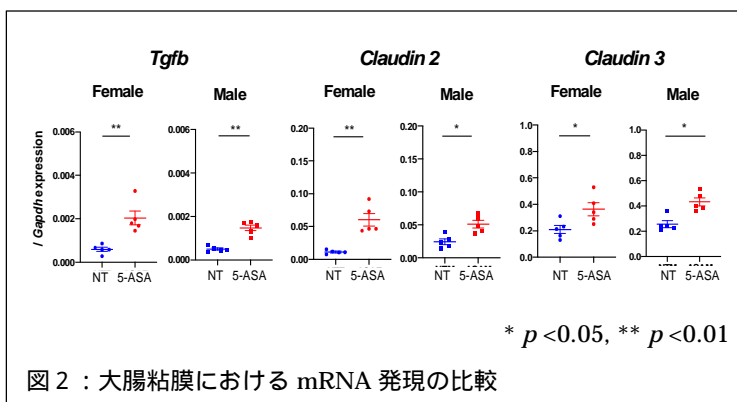


図 2 : 大腸粘膜における mRNA 発現の比較

#### 引用文献

- Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(12):720-7.
- Jun X, Ning C, Yang S, Zhe W, Na W, Yifan Z, Xinhua R, Yulan L. Alteration of Fungal Microbiota After 5-ASA Treatment in UC Patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2020;26(3):380-390.
- Xu J, Chen N, Wu Z, Song Y, Zhang Y, Wu N, Zhang F, Ren X, Liu Y. 5-Aminosalicylic Acid Alters the Gut Bacterial Microbiota in Patients With Ulcerative Colitis. *Front Microbiol.* 2018;9:1274.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田晴香, 三好潤, 黒沼智, 日比則孝, 西成田悠, 小栗典明, 松浦稔, 竹内修, 小林拓, 秋元義弘, 日比紀文, 久松理一
2. 発表標題 5-アミノサリチル酸の抗炎症作用における腸管微生物叢の関与
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三好潤, 和田晴香, 久松理一
2. 発表標題 5-アミノサリチル酸の抗炎症作用機序における腸管微生物叢の関与
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022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
研究協力者	松浦 稔  (Matsuura Minoru)		
研究協力者	三好 潤  (Miyoshi Jun)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	和田 晴香  (Wada Haruka)		
研究協力者	日比 則孝  (Hibi Noritaka)		
研究協力者	西成田 悠  (Nishinarita Yuu)		
研究協力者	小栗 典明  (Oguri Noriaki)		
研究協力者	小林 拓  (Kobayashi Taku)		
研究協力者	日比 紀文  (Hibi Toshifumi)		
研究協力者	竹内 修  (Takeuchi Osamu)		
研究協力者	黒沼 智  (Kuronuma Satoshi)		

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
---------	---------