

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590749

研究課題名(和文)

アミノ酸代謝モニタリングを用いた炎症性腸疾患の臨床マーカーの確立と治療への応用

研究課題名(英文)

Development of a biomarker for inflammatory bowel disease by plasma amino acids profile.

研究代表者

久松 理一 (HISAMATSU TADAKAZU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60255437

研究成果の概要(和文)：我々は腸炎モデルマウスを用い成分栄養剤に含まれるアミノ酸成分が抗炎症効果を有することを示した。特に L-ヒスチジンはマクロファージの NFκB シグナルを抑制し TNFα 産生を抑制した。炎症性腸疾患患者の末梢血アミノ酸プロファイル解析では特に活動期の患者で血漿ヒスチジン濃度が低下していた。同濃度は臨床活動性指標や CRP と逆相関を示し、疾患モニタリングに有用であると考えられた。さらに我々は炎症性腸疾患の血漿アミノ酸プロファイルから診断や活動性評価を示す数式を導き出すことに成功した (アミノインデックス®)。

研究成果の概要(英文)：Amino acids in Elental® directly suppress intestinal inflammation in IL-10 transfer colitis models. Especially, L-histidine suppressed NFκB activation and significantly inhibited the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages. In human IBD, plasma amino acids profiles were dramatically changed. Plasma histidine concentration was decreased in active IBD patients and showed inverted correlation with serum CRP. Furthermore, the computer analysis of plasma amino acids profiles developed the AminoIndex® that is a parameter for diagnosis and assessment of disease activity in IBD.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 総計      | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：消化管免疫

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、アミノ酸、ヒスチジン、炎症性サイトカイン、マクロファージアミノインデックス®、メタボローム

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎や Crohn 病の原因はいまだに明らかにされていないが、遺伝的素因と腸内細菌や食餌抗原などの環境因子と免疫異常が複雑に関連した多因子疾患であると考えられている。炎症性腸疾患の臨床における大きな問題点は患

者数が年々増加しているにもかかわらず原因不明のため発症予防をすることができないこと、診断や活動性モニタリングに適切な臨床マーカーが存在しないことである。我々はこれらの臨床上の問題点を解決するために本研究を計画した。ヒト Crohn 病に対して我が国および欧州では従来から経腸栄養療

法が行われその臨床効果が報告されてきた。経腸栄養療法に用いられるエレンタール®は窒素素をアミノ酸まで分解した成分栄養剤である。その有効性のメカニズムとしてカロリー補給、低脂肪、窒素素がアミノ酸であることによる低抗原性、腸内細菌に対する効果などが報告されてきたが、残念ながらいずれのメカニズムについても科学的検証は十分ではなかった。しかし我々は成分栄養剤が治療に有効であるという事実には抗 TNF $\alpha$  製剤などの分子標的剤が炎症の最終エフェクターを抑制することによって薬理作用を發揮するのは異なるメカニズム、すなわち発症や病態形成初期の謎を解明する重要なヒントが隠されていると考えている。そこで、近年アミノ酸自身がもつ薬理作用が報告されてきていることから我々は成分栄養剤が含むアミノ酸に注目した。本研究課題はヒト炎症性腸疾患 (IBD) に対するアミノ酸の抗炎症作用を明らかにし創薬につなげるとともに、メタボロームの概念から患者個体のアミノ酸代謝状態を把握し診断・病態把握につながる非侵襲的臨床マーカーを確立することにある。IBD においてはある一つの遺伝子や蛋白質を解析するだけでは病態把握につながることは無く、個体全体の代謝を把握するメタボロームという概念が臨床に必須である。Crohn 病に対して従来から経腸栄養療法が行われその臨床効果が報告されてきた。経腸栄養療法に用いられるエレンタール®は窒素素をアミノ酸まで分解した成分栄養剤である。我々は成分栄養剤が含むアミノ酸に注目し個体のアミノ酸代謝全体を 40 種以上の血漿アミノ酸プロファイルより解析する方法 (Noguchi Y, et al. Am J Clin Nutr. 2006) を用い IBD 臨床に有用なバイオマーカー確立を試みた。

## 2. 研究の目的

ヒト IBD に対するアミノ酸の抗炎症作用を明らかにし創薬につなげるとともに、メタボロームの概念から患者個体のアミノ酸代謝状態を把握し診断・病態把握につながる非侵襲的臨床マーカーを確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス腸炎モデルを用いた各種アミノ酸の抗炎症効果の機序解明

IL-10KO マウスの脾臓細胞およびリンパ節細胞を SCID マウスに移入することにより短期間に確実に腸炎を起こす IL-10 移入腸炎モデルマウスを用いクローン病治療に用いられる成分栄養剤エレンタール®に含まれるアミノ酸成分および各種アミノ酸を混餌にて投与し腸炎抑制効果について検討した。評価は腸管重量、粘膜内 TNF 濃度、病理組織学的検査により行った。

### (2) マウス腹腔マクロファージ、RAW 細胞株

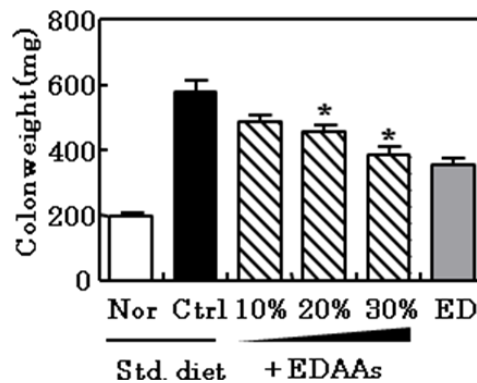
### を用いた炎症性サイトカイン産生におけるヒスチジンの関与 (in vitro)

マウス単球系細胞株である RAW 細胞を用い、各種アミノ酸存在下での LPS 刺激時のサイトカイン産生を検討した。さらに低ヒスチジン培地におけるサイトカイン産生についても検討した。

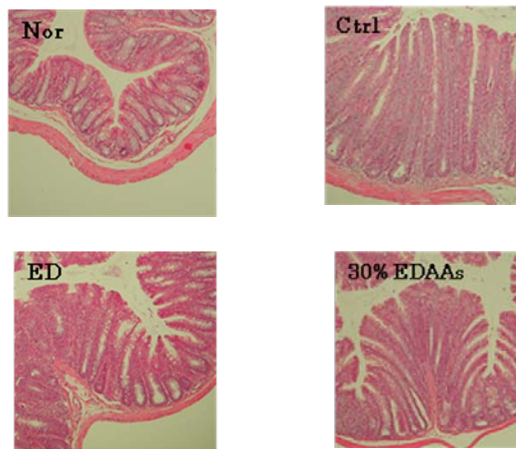
### (3) ヒト血漿アミノグラムを用いた炎症性腸疾患患者のアミノ酸動態の解析と診断・病勢評価マーカーの確立

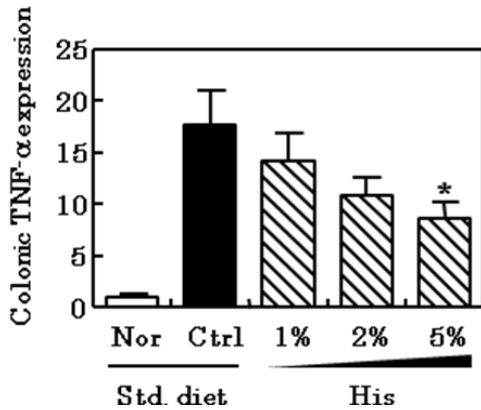
健康人と Crohn 病患者、潰瘍性大腸炎患者おのこの 102 名の血漿アミノ酸プロファイルを解析し各アミノ酸の変動を解析するとともにコンピューターによるデータ解析から各 2 群間を鑑別しうる判定式アミノインデックス®を導き出す。

## 4. 研究成果

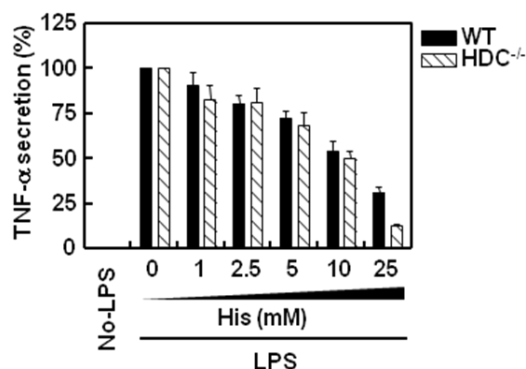
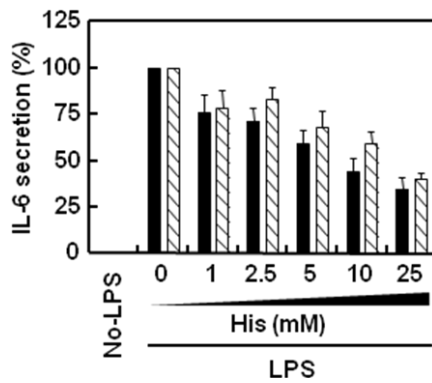


(1) エレンタール®に含まれるアミノ酸成分のみで腸炎を抑制しうること、特に成分に含まれるアミノ酸であるヒスチジンが単独で腸炎を抑制することが明らかとなった。その機序としてヒスチジンは NF $\kappa$ B の活性化を抑えることでマクロファージからの TNF $\alpha$ 、IL-6 といった炎症性サイトカイン産生を低下させることが示された。



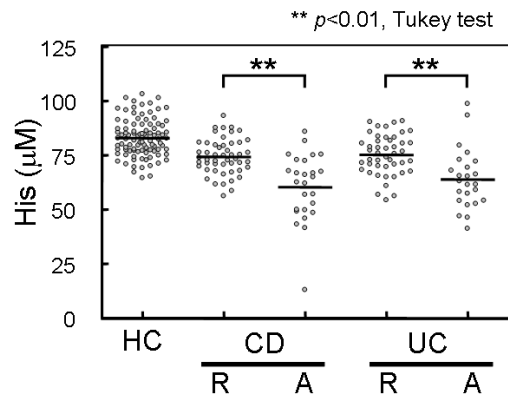


(2) ヒスチジン添加によりマウス腹腔マクロファージあるいはRAW細胞株からのTNF $\alpha$ 、IL-6産生は低下した。その効果はL体だけで認められ光学異性体であるD体では効果がないことも明らかになった。さらにヒスチジンの代謝産物であるアンセリンやカルノシンでは炎症性サイトカイン産生抑制は認められなかった。ヒスタミン合成経路が阻害されたHDO欠損マウスの腹腔マクロファージを用いた実験においてもヒスチジンは炎症性サイトカイン産生を抑制した。このことはヒスチジンの作用はヒスタミン合成系を介していないことを示している。以上の結果からヒスチジンの炎症性サイトカイン抑制作用はL体に特異的で代謝産物を介したのではなくL-ヒスチジンそのものによる可能性が考えられた。

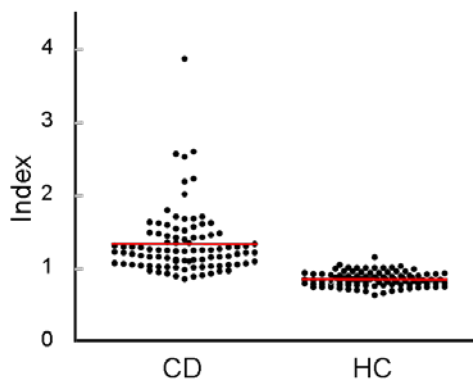


図はHDC欠損マウス腹腔マクロファージにおけるヒスチジンのTNF $\alpha$ およびIL-6産生抑制効果。すなわちこの効果はヒスタミンを介していないと考えられる。

(3) 活動性炎症性腸疾患患者の血漿ヒスチジン濃度が低下していることが明らかとなった。さらにアミノ酸プロファイルのコンピュータ解析から診断や活動性評価を示す数式を導き出すことに成功した(アミノインデックス®)。さらに他施設との共同研究によりアミノインデックス®の普遍性を確認した。これによりアミノ酸メタボロームを用いて炎症性腸疾患患者の診断や疾患活動性の評価ができることがあきらかとなった。(論文投稿中)



$$\text{Index} = \frac{\text{Orn}}{\text{Val}} + \frac{\text{Tau} + \text{Cysthine}}{\text{His} + \text{Trp}}$$



これまで成分栄養剤のクローン病における臨床効果は確認されていたものの作用機序については解明されていなかった。本研究は成分栄養剤中のアミノ酸成分のみでマウス腸炎モデルに対して有効であることを証明し、かつヒスチジンが抗炎症効果を有することを明らかにしつつある。さらにヒスチジンの作用機序を明らかにするため炎症時の細胞内アミノ酸プロファイル作成という技術・概念的にも新しい発想で企画された。

また実際の炎症性腸疾患患者でも血漿アミノ酸プロファイルが変化していること、クローン病で血漿ヒスチジン濃度がCRPと逆相関することも明らかにされつつある。さらに血漿アミノ酸プロファイルをコンピューター解析することで個体のアミノ酸代謝の状態を数値化することが可能となりこの” Amino Index” が炎症性腸疾患の診断・病態把握に有用であることを突き止めた。今後の解析により、病変部位による違い、薬物治療時の効果判定、再燃予測マーカーとしても有用である可能性が高く臨床応用の点からも現実性が高い。

#### 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8件)

①Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. Clin Exp Immunol. 2011, 164(1):137-44. **査読有**

②Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 2010, 139(3):882-92. **査読有**

③ Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Contributes to Gut Homeostasis and Intestinal Inflammation by Composition of IL-10-Producing Regulatory Macrophage Subset. J Immunol. 2010, 184(5):2671-6. **査読有**

④ Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Takayama T, Kitazume MT, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2010, 16(4):568-75. **査読有**

#### ⑤久松理一、日比紀文

血漿アミノ酸プロファイルを用いた IBD の診断 IBD Research vol.4 no.4 308-313 2010 **査読無**

#### ⑥久松理一、日比紀文

アミノ酸と免疫 Functional Food 特集『免疫と機能性食品』2010 第11号 Vol.4 No.1 p16-22 **査読無**

⑦ Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H, Kitazume M, Takayama T, Okamoto S, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen presenting ability.

J Immunol. 2009, 183(3):1724-31. **査読有**

⑧Andou A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, Hashimoto M, Okutsu T, Shimbo K, Takeda T, Matsumoto H, Sato A, Ohtsu H, Suzuki M, Hibi T. Dietary Histidine Ameliorates Murine Colitis by Inhibition of Proinflammatory Cytokine Production from Macrophages.

Gastroenterology. 2009, 136(2):564-74. **査読有**

[学会発表] (計3件)

#### ①久松理一 (招待講演)

クローン病に対する成分栄養剤の作用機序 - 最新の知見を含めて - 第7回肝・消化器代謝栄養 研究会 2010年6月19日 大阪

#### ②久松理一 (招待講演)

アミノ酸が直接炎症を抑える エレンターナル講演会 2009年4月25日 大阪

#### ③久松理一 (招待講演)

アミノ酸が直接炎症を抑える 第2回名古屋栄養セミナー 2009年3月26日 名古屋

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/medicine/ibd/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者：

久松 理一 (HISAMATSU TADAKAZU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：60255437

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし