

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07535

研究課題名（和文）体内時計を利用した炎症性腸疾患の病態制御

研究課題名（英文）Regulating inflammatory bowel disease by controlling peripheral biological clock

研究代表者

折原 芳波（Orihara, Kanami）

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：60450623

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：腸内ストレスの軽減がIBDの重症度と与える影響について検証では有用食物繊維の摂取がマウスの盲腸内容物量を増加させ、*in vitro*および*in vivo*双方のモデルを通して有用食物繊維の摂取が炎症やストレスによる腸管免疫の低下を抑制することを認め、誌上発表した。腸内細菌叢の代謝産物と時計遺伝子との関係を明らかにするために、腸内細菌によるエラグ酸の代謝産物であるウロリチンA（UA）を用いて、異なる腸管上皮細胞モデルにおける時計遺伝子の発現量や発現リズムを比較し、UAの投与が炎症によって引き起こされた腸上皮細胞の概日リズムの乱れを改善する可能性を示し、現在改稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト腸上皮細胞およびマウスモデルを用いて有用食物繊維およびUAが腸管上皮免疫系の概日リズムの恒常性の維持において非炎症時、炎症時ともに重要な役割を果たすことを示した。このことは、IBD再発・重症化の予防的治療の可能性を持つだけでなく、IBD以外の免疫バランスの破綻によって引き起こされる他の疾患への応用へとつながる可能性を秘めている。また、ソフトウェアや社会的時差ぼけなど現代のライフスタイル要因による代謝性疾患に対する応用利用の可能性も秘めており、今後も研究を進展させていきたい。

研究成果の概要（英文）：In an examination of the effect of reduced intestinal stress on the severity of IBD, we found that consumption of useful dietary fiber increased the volume of cecum contents in mice. Through both *in vitro* and *in vivo* models, we found that consumption of useful dietary fiber suppressed inflammation- and stress-induced reduction of intestinal immunity and published our data in *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 21;25(5):2494.

To clarify the relationship between the metabolites of the intestinal microbiota and clock genes, we compared the expression levels and rhythms of clock genes in different intestinal epithelial cell models using Urolithin A (UA), a metabolite of ellagic acid by intestinal bacteria. We found that UA administration improved the inflammation-induced disruption of circadian rhythms in intestinal epithelial cells, and a manuscript on this topic is currently under revision.

研究分野：免疫学

キーワード：上皮バリア 食物繊維 ポリフェノール 腸内細菌代謝物 時間生物学 体内時計 IBD 炎症性腸疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は近年世界中で患者数が増加しており、腸管免疫に關与するさまざまな分野からのアプローチがされているが、全般的に、消化管炎症と体内時計の研究では未知の部分が多い。

これまでの DSS 誘導性の IBD モデルマウスを用いた研究において、炎症局所のセロトニン上昇およびメラトニン低下が観察されており、体内時計制御ホルモンとしても重要な因子が炎症局所で産生量の制御を受けていることが明らかになっている。また、免疫学的には IBD には T_H17 細胞の深い関与が明らかになっており、この T_H17 について最近、粘膜固有層に対する遊走に日内リズムがあり、このリズムが *Clock* 変異マウスや日内リズムを光刺激で乱したマウスでは観察できないこと報告された。このことから、IBD の病態メカニズムの 1 つとして、消化管における体内時計制御ホルモン低下による末梢体内時計の乱れがあり、 T_H17 細胞の遊走に日内リズムの消失を誘導する。これにより常に局所に活性化 T_H17 数が多い状態が続き、断続的な炎症を引き起こしている可能性を考えた。実際、ヒト IBD 患者の日内変動を示す遺伝子発現を検討した研究において、炎症局所において非炎症部位と比較して 14~19% の遺伝子発現が有意に増減していることが報告されている。これまでに IBD の病態に末梢体内時計が関与していることが強く示唆されており、IBD の免疫学的な解析はモデル動物を用いた研究を含め日々進んでいるが、モデル動物を用いて IBD における末梢体内時計の役割を明らかにした研究はほとんど報告されていない。

また、放射線照射による腸炎症モデルの研究において *Bmal1* 遺伝子が病態に関わっていることが示されたり、ヒトを対象とした研究において *PER3* 遺伝子の一塩基多型 (SNP) がクローン病および潰瘍性大腸炎の発症リスク因子であることを示唆されたりしてきた。一方でこれらの病態には腸内細菌叢の不均衡 (dysbiosis) が関与しているという報告が増えており、この dysbiosis にも末梢体内時計のリズム変調が影響を及ぼしていると言う報告も増えつつある。実際、IBD モデルマウスにおいて炎症を発症した腸上皮細胞増殖リズムの形成には時計遺伝子群の中核を担う *Bmal1* が必要な因子であることが報告されている。その一方で、定常状態の腸陰窩や絨毛の形態の維持には *Bmal1* や *Per1*、*Per2* の関与が弱いとの報告もある。

2. 研究の目的

本研究では、既知のモデルを用いて末梢体内時計の観点から腸管免疫制御機構を明らかにすることを目的とし、末梢体内時計を補正することで IBD 様症状を制御することを将来的な目標として考えている。近年の IBD の免疫学的基礎研究において、徐々に解明されてきたメカニズムもあるが、時間生物学的視点を取り入れて免疫学的に解析することで、ヒトを含む生物が本来持つ身体の制御機構をより活かした治療法、予防法の探索が見込まれる。本研究が完成した暁には、IBD のみならず他の免疫疾患においても末梢時計制御が症状改善、予防等に与える影響へと更なる応用性が期待される。

3. 研究の方法

マウスを用いた IBD モデルにはいくつかの種類があるが、本研究では、DSS 負荷モデルのほか、ストレス負荷により症状の再発が誘導されるモデルを用いた。ストレス負荷再発性 IBD モデルを用いて、マウスに有用食物繊維添加食の給餌をして腸内環境の整ったマウスを作製し、腸内ストレスの軽減が IBD 様症状の再発の重症度 (血便・下痢スコア、体重の減少、大腸の短縮、炎症性サイトカインの発現増加など) の軽減に与える影響を検証した。すなわち、IBD 様症状が一旦回復した後に腸内ストレスを軽減させることにより、ストレス負荷による再発を抑制、重症度を軽減できるかを検証した。

本研究ではマウスモデルと並行してヒト腸上皮細胞を用いた系での実験も進めた。Caco-2 および HT-29 を用いて必要に応じて単層培養および共培養を行った。サイトカイン処理により炎症モデルを作成し、マウス盲腸内容物上清およびウロリチン A が炎症に与える影響について検証した。

4. 研究成果

まずは腸内ストレスの軽減が IBD の重症度に与える影響について検証を行った。有用食物繊維の摂取が腸内 pH や細菌叢を整えることが明らかになって来ているため、マウスに有用食物繊維添加食の給餌をして、腸内免疫に及ぼす影響について検証した。その結果、有用食物繊維の摂取がマウスの盲腸内容物を増加させ、ヒト腸上皮細胞 2 種 (Caco-2 および HT-29) の共培養の系において、この盲腸内容物上清が炎症性サイトカインの発現を有意に抑制し、 μ チン発現を有意に増強することを見出した。ストレス負荷マウスでは、対象食物繊維群ではストレス負荷により低下した糞便中 IgA や μ チンの濃度が有用食物繊維摂取群では高濃度を保っていることが確認された。すなわち、*in vitro*、*in vivo* 双方のモデルにおいて有用食物繊維による腸管免疫の低下抑制を認めた。続いてストレス負荷再発性 IBD モデルを用いて有用食物繊維の摂取が IBD の重症

度に与える影響を検証した。DSS 飲水により IBD 様症状を誘発したマウスに回復期間を与えた後、有用食物繊維の摂食期間を設けて腸内環境を変化させたマウス群に、IBD の再発誘導を目的とする拘束ストレスを掛けた。その結果、IBD 誘導群において体重の減少、腸の萎縮、血便スコアと糞便スコアの上昇など IBD 様症状を認めた。更に、糞便中の酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸の有意な減少を検出し、小胞体ストレスの軽減が関与していることを示した。食物繊維摂取に関しては、DSS による IBD 誘導期間中は両群で血便スコア、糞便スコアの上昇が見られたが、ストレスによる再発誘導期間には対象食物繊維群でのみ血便スコア、糞便スコアの顕著な上昇が確認された。本結果は、“Protective Effects of Inulin on Stress-Recurrent Inflammatory Bowel Disease”として *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 21;25(5):2494 (doi: 10.3390/ijms25052494) に誌上発表済みである。

腸内ストレスの軽減が IBD の重症化の低下に関与していることを受け、腸内細菌叢の代謝産物と時計遺伝子との関係を明らかにするために、腸内細菌によるエラグ酸の代謝産物であるウロリチン A (UA) を用いて、異なる腸管上皮細胞モデルにおける時計遺伝子の発現量や発現リズムを比較することにより UA が腸管上皮細胞における時計遺伝子の発現に好影響を与える機能を確認した。杯細胞モデルである HT-29 では UA は *BMALI* の発現量を有意に増加させた。一方、吸収上皮細胞モデルである Caco-2 では UA は *BMALI* の発現量を低下させ、*BMALI*、*PER2* の発現リズム性を向上させることを確認した。これらの結果より、UA は腸管上皮細胞の時計遺伝子の発現量および発現リズムに好影響を与えることが示唆された。腸管上皮細胞モデルおよびマウスモデルを用いて炎症を誘導し、炎症による概日リズムの乱れに対する UA の効果を検討した結果、UA は、HT-29 および Caco-2 において、炎症性サイトカイン処理により乱れた *BMALI*、*PER2*、*OCLN* 発現量のリズム性を改善した。また、UA は Caco-2 において炎症性サイトカイン処理により誘導される *CLDN1* の過剰発現リズムを抑制し、IBD 様炎症モデルマウスにおいても同様に *Cldn1* および *Cldn4* の過剰発現リズムを抑制することを認めた。さらに、UA 投与により、特に暗期における糞便中 IgA 濃度が上昇し、SCN における *Bmal1* および *Per2* の発現量が有意に増加した。これらのデータは、UA の投与が炎症によって引き起こされた腸上皮細胞の概日リズムの乱れを改善する可能性を示唆しており、本結果は誌上発表に向けて投稿済みであり、現在改稿中である。

以上より、ヒト腸上皮細胞およびマウスモデルを用いて有用食物繊維および UA が腸管上皮免疫系の概日リズムの恒常性の維持において非炎症時、炎症時ともに重要な役割を果たすことを示した。このことは、IBD 再発の予防的治療の可能性を持つだけでなくシフトワークや社会的時差ぼけなど現代のライフスタイル要因による代謝性疾患に対する応用利用の可能性も秘めており、今後も研究を進展させていきたい。

本研究に関連して、独立基盤形成支援にも採用いただき、お蔭さまで異動先での研究基盤も整えることができた。この機会を借りて御礼申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yao Du, Kanta Kusama, Koki Hama, Xinyue Chen, Yu Tahara, Susumu Kajiwara, Shigenobu Shibata, Kanami Orihara	4. 巻 25
2. 論文標題 Protective Effects of Inulin on Stress-Recurrent Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25052494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kanami Orihara
2. 発表標題 Circadian Regulations in Epithelial Barrier Functions
3. 学会等名 International Conference on Chronobiology and Circadian Rhythms（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanami Orihara
2. 発表標題 Regulating Peripheral Clocks to Restore Epithelial Immunity
3. 学会等名 International Drug Discovery Science and Technology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yao Du, Xinyue Chen, Susumu Kajiwara, Kanami Orihara
2. 発表標題 Urolithins Regulating Circadian Rhythms in Immunity on Intestinal Epithelial Cells
3. 学会等名 Annual Meeting of Japanese Society for Chronobiology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kanami Orihara, Yao Du, Kanta Kusama, Xinyue Chen, Susumu Kajiwara
2. 発表標題 Protective Effects of Inulin on Stress-Recurrent Inflammatory Bowel Disease
3. 学会等名 Annual Meeting of the Immunology Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2024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