

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11509

研究課題名（和文）炎症性腸疾患における腸粘膜バリア機能の定量的評価法の確立とその早期診断への応用

研究課題名（英文）A challenge study to establish early diagnosis method for inflammatory bowel diseases by utilizing revolutionary quantifying method for intestinal barrier function

研究代表者

臼田 春樹（Usuda, Haruki）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30707667

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）：腸粘膜透過性の新規評価試薬であるキトサンが、炎症性腸疾患（IBD）腸炎の病状や予後予測の評価試薬として利用可能であるか否かを検証した。2種類の腸炎マウスモデル（T細胞の移入、IL10KO）において、キトサンは腸組織の器質的な変化が顕在化する前に腸粘膜透過性が亢進することを評価できた。また、マイクロアレイを用いた検討によって、T細胞移入による腸炎モデルではmast cell proteaseが腸粘膜透過性の亢進に寄与する可能性が示された。一方、キトサンはIBD患者でも病状の悪化を評価できることが示された。以上の結果から、キトサンはIBDの評価試薬となりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、IBDの肉眼的所見や病理所見だけでなく、そのような変化が見られない潜在的なIBDの状態悪化やその兆しを評価する手法を開発するための基礎的な知見を提供できたと考えている。これを利用すれば、疾患の増悪や緩解の評価の方法がより多様になるだけでなく、疾患の発症の予測やリスク評価にも利用できる可能性があり、社会的意義は大きいと考えられる。また、病理組織学的な変化がみられる前に分子量1000もの大きさの分子が通るほど腸粘膜透過性が増加するということは学術的な知見としても新規性があり意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether chitosan, a novel evaluation reagent for intestinal mucosal permeability, could be used as an assessment tool for the condition and prognosis prediction of inflammatory bowel disease (IBD) colitis. In two types of colitis mouse models (T-cell transfer and IL10KO), chitosan was able to evaluate increased intestinal mucosal permeability before the histopathological changes in intestinal tissue became evident. Furthermore, analysis using microarray suggested that mast cell protease may contribute to the increased intestinal mucosal permeability in the colitis model induced by T-cell transfer. On the other hand, chitosan was shown to assess the worsening of the condition in IBD patients. Based on these results, chitosan has been indicated as a potential evaluation reagent for IBD.

研究分野：応用薬理学

キーワード：腸粘膜バリア 腸粘膜透過性 IBDの予後予測

1. 研究開始当初の背景

1-1. 炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Diseases : 以下 IBD) について

IBD は慢性あるいは寛解・再燃性の腸管炎症の総称である。特に原因不明の難治性疾患であるクローン病 (Crohn's disease) と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis) の2つの疾患を IBD と呼称する場合が多い。本研究ではこの2疾患を IBD とみなし、研究対象とする。両疾患とも10-30代に好発し、長期間病変を有する患者では、大腸・小腸のガン発生率が高くなることが知られていることから、効率的なサーベイランス法の開発が期待されている。現在、IBD の診断は身体的所見と内視鏡等を用いた画像検査とを併せて行われている。しかし、いずれの診断法も症状がある程度進行している状態でしか発見ができず、IBD の早期発見、予後予測や治療介入時期の判断を精度よく行える指標の確立は依然として課題である

1-2. 腸粘膜バリアとその評価法の現状

腸粘膜は通常 200-500 Da 程度までの大きさの分子を吸収するが、それより大きなサイズである病原性微生物や、その毒素などの有害物質は透過させない。この分子ふるいは腸粘膜バリアと呼ばれる。現在、ヒトでの腸粘膜バリア評価方法はラクツロース/マンニトール経口負荷試験 (L/M 試験) のみであり、これが golden standard である。この評価法は腸の器質的・機能的障害によってラクツロースの吸収量が増大するという経験則に基づいている。IBD 患者ではこの試験によって、腸粘膜バリアが低下していることが示唆されている。しかし、ラクツロースは分子量 342 の小分子であることに加え、トランスポーターを介して吸収されることから腸粘膜バリアの評価法として精度に疑問がある。また、腸内細菌で分解されるため、IBD の好発部位である小腸下部や大腸の粘膜バリアの評価には適さない。そこで申請者は腸内で分解されず、ヒトに適用可能な、広い分子量領域をカバーする腸粘膜バリア評価試薬としてキトサンを利用することを発案した。キトサンはグルコサミンが β 1,4 結合した多糖類の一種である。甲殻類の甲羅に含まれるバイオマス成分であり、健康食品として流通している。通常、分子量は数万から数十万と大きいのが、我々は低分子量のキトサン (分子量 1000) を開発した。さらに、小腸・大腸のバリアを低下させたマウスを用いて種々の検討を行い、開発したキトサンが小腸と大腸いずれの腸粘膜バリア機能も評価できることを実証した。この試薬を利用すれば、腸粘膜バリア機能を指標として IBD の早期発見や寛解の判断や予後予測ができる可能性が高い。

2. 研究の目的

上記の背景から、IBD において腸粘膜バリアが低下する時期や機序についてはほとんど検討されていない。そこで本研究では、IBD の早期発見や予後予測へのキトサンの応用性を検証することを目的として検討を行った。具体的には腸粘膜バリアと IBD の発症や悪化との関連性の検討を行った。また、それに関連して腸粘膜バリアの低下にどのような機序が関与するかについても併せて検討を行った。

3. 研究の方法

3-1. 検討 1: IBD の病態形成において腸粘膜バリアが低下する時期の特定

SCID マウスに SAMP1/Yit マウスから採取した T 細胞を移入する IBD モデルと、IBD 自然発症モデルである IL-10 KO マウスを用いて検討を行った。前者では T 細胞の移入後 8 週間程度で顕著な腸炎が生じるのに対し、IL-10 KO マウスの腸炎は緩徐に発症・進行する。IBD 病態が形成されていくまでの種々のタイミングでキトサンによる腸粘膜バリア機能の評価を行い、バリア機能が低下する時期の特定を行った。

3-2. 検討 2: 腸粘膜バリア低下の原因因子の特定

検討 1 の結果を基に、腸粘膜バリアが低下するタイミングの前後で腸管のマイクロアレイを実施し、腸粘膜バリアの低下をもたらす因子を推定した。

3-3. 検討 3: キトサンの経口投与による IBD 患者での腸粘膜バリアの評価

プレリミナリーな検討として、同意の得られた IBD 患者 (16 名) より採血を行い (pre 採血)、その後試薬 C を投与した。1 時間後に再度採血を行い (pro 採血)。試薬 C の血中濃度を測定した。Pro 採血の測定値より pre 採血の測定値を差し引き、腸管から吸収された試薬 C の濃度を算出した。また、IBD を含め、特定の疾患を有していない健康者 (2 名) でも同様の検討を行った。なお、本検討は介入試験となることから、使用したキトサンは既に健康食品として流通している分子量 600 のキトサンを用いた。また、キトサンの投与量はマウスでは 100mg/kg であるのに対してヒトでは患者の耐用性の面から 8.3mg/kg として検討を行った。

4. 研究成果・考察

4-1. IBD の病態形成において腸粘膜バリアが低下する時期の特定

腸の炎症に付随する腸粘膜の透過性を評価するため、SAMP マウスより採取した T 細胞を SCID マウスに移入することで腸炎を生じるモデルを用いた (以下 T 細胞移入モデル)。T 細胞移入モデルで経時的に透過性を評価したところ、移入後 4 週目に腸粘膜透過性がピークに達し、6 週目にも 4 週目と同等の腸粘膜透過性の亢進が観察された。このモデルに比べて比較的緩徐な

腸炎を自発的に生じる IL-10KO マウスでは、生後 11 週齢において腸粘膜透過性の亢進が観察された。一般的にこれらのモデルにおいて腸の病理組織学的な変化が生じるのは本検討において腸粘膜透過性が認められた時期よりも後であることが知られていることから、腸粘膜の透過性は腸炎の早期に生じる可能性が推察された。

4 - 2 . 腸粘膜バリア低下の原因因子の特定

安定的に結果が得られた SCID マウスへの T 細胞の移入による腸炎モデルにおいて、マイクロアレイ解析を実施した。検討 4 - 1 を複数回実施したところ、T 細胞の移入 2 週間後の時点では腸粘膜透過性の亢進が認められなかったが、4 週間後には顕著に認められた。その後、移入 6 週間後に評価を行ったところ、4 週間後と同程度の透過性の亢進が認められた。これらの検討結果から、腸粘膜透過性が亢進するのは T 細胞の移入より 2-4 週の間であることが推察された。そこで、T 細胞移入後 3 週間後の時点で解剖を行い、移入を行ったマウスの内、腸粘膜透過性が最も亢進した個体と全く亢進しなかった個体をそれぞれ 2 個体ずつ選別し、大腸サンプルをマイクロアレイによって解析した。その結果、炎症性サイトカインやケモカインについては両者で差のある因子はほとんどなく、少数の差がある因子についてもバリア破壊と関連付けられる因子は見つからなかった。一方で、透過性の亢進が認められた 2 個体で共通して増加していた因子として肥満細胞に発現する Mcpt1 および Mcpt2 (MCP: mast cell protease) が見出された。発現増加の程度は前者が 10 倍、後者が 9 倍であった。これまでの報告において、MCP1 の KO マウスでは *Trichinella spiralis* の感染によって誘発される腸粘膜透過性の亢進がほぼ完全に抑制されることが示されている(Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ;100(13):7761-6)。また、*Nippostrongylus brasiliensis* 由来の抗原で感作したラットに同抗原を静脈注射すると、十二指腸の管腔内への Mcpt2 の分泌が増加し、同時に腸粘膜透過性の指標であるアルブミンの漏出が十二指腸で生じることが示されている (J Exp Med. 1995; 182(6): 1871-1881.) これらの報告は、MCP が腸粘膜透過性を誘発する因子であることを示唆している。本検討では、マイクロアレイに供したサンプルに組織学的な上皮の障害や腸の構造変化はみられなかったことから、組織の形態的な破壊が明らかに生じるまえに腸粘膜透過性が亢進し、その機序には MCP が関与する可能性があると考えられる。

4 - 3 . キトサンの経口投与による IBD 患者での腸粘膜バリアの評価

健常者においてはキトサンの血中濃度は 3~6 ng/mL であった。クローン病や潰瘍性大腸炎の患者では 10 名が検出限界以下であり、2 名が健常者と同等の値であった。残りの 3 名については 8.6, 10, 15 ng/mL と高値を示した。この 3 名は臨床現場での経時的な診断によって、本検討を行った時点で病状が悪化している状態であったことが分かった。本検討は前述のように、試薬の投与量が少なく、採血のタイミングについても複数検討して最適化を行っていないことから、今後 IBD の状態の評価を適切に行うためにさらなる条件検討が必要である。しかし、病状の悪化している患者においてキトサンの血中濃度の増加が認められたことから、我々が開発したキトサンは IBD 患者の状態を評価する指標として利用できると考えられる。

5 . 結語

キトサンはマウスの IBD モデルにおいて、組織障害が顕在化する前に腸粘膜バリアの低下を評価可能であり、以て IBD の疾患活動性の評価ひいては予後予測に利用できる可能性が示された。また、ヒトにおいても評価条件の最適化が必要であるものの疾患の状態把握の指標や予後予測指標として使用できる可能性が示された。

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 0件）

1. 著者名 Misawa N, Higurashi T, Takatsu T, Iwaki M, Kobayashi T, Yoshihara T, Ashikari K, Kessoku T, Fuyuki A, Matsuura T, Ohkubo H, Usuda H, Wada K, Naritaka N, Takei H, Nittono H, Matsumoto M, Honda A, Nakajima A, Camilleri M	4. 巻 52
2. 論文標題 The benefit of elobixibat in chronic constipation is associated with faecal deoxycholic acid but not effects of altered microbiota	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Alimentary Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 821 ~ 828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apt.15950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	三島 義之 (Mishima Yoshiyuki) (30397864)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201)	
研究分担者	和田 孝一郎 (Wada Koichiro) (90263467)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	

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