

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15985

研究課題名（和文）クローン病における腸管上皮幹細胞の分化誘導を介した大腸炎治療の試み

研究課題名（英文）Development a novel treatment for Crohns disease targeting intestinal epithelial cells

研究代表者

豊永 貴彦（TOYONAGA, Takahiko）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30773634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：既知の119種類の腸内細菌代謝産物を用いてCaco2細胞を刺激したところ、アミノ安息香酸によるTEER上昇率が最も高く、上皮細胞間透過性を低下させた。ヒト糞便を用いた予測メタゲノム解析と質量分析の結果、クローン病患者では健常者と比較してアミノ安息香酸の分解に関わる遺伝子発現量が上昇しており、糞便中のアミノ安息香酸の含有量が有意に低下していた。デキストラン硫酸を用いて上皮障害性急性大腸炎モデルマウスを作成し、アミノ安息香酸を注腸投与による腸炎減弱効果を検証したところ、アミノ安息香酸注腸群では体重減少の改善と腸管重量/腸管長比率の低下が見られ、アミノ安息香酸による腸炎減弱効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病患者の腸管における細菌代謝産物の構成変化については、短鎖脂肪酸やトリプトファン、胆汁酸などいくつかの報告が見られるが、アミノ安息香酸の減少については未だ報告はなく、クローン病の病態における役割も未だ不明である。本研究の成果によって、クローン病患者の腸管では、腸内細菌叢の機能変化に伴いアミノ安息香酸の分解が亢進しており、腸管上皮細胞間透過性の亢進を介して腸炎発症に寄与していることが示唆された。これらの結果は、クローン病の病態におけるアミノ安息香酸の役割を明らかとし、アミノ安息香酸を標的とした新たなクローン病治療の開発に有用と考える。

研究成果の概要（英文）：Caco2 cells were stimulated with a library of gut microbial metabolites and evaluated for the changes in the transepithelial electrical resistance (TEER). Among 119 metabolites, the highest elevation of TEER was obtained by stimulation with aminobenzoic acid. A 16S rRNA metagenomic analysis were performed on patient-derived stool samples and followed by a PICRUSt2-based functional prediction analysis. Functional prediction of intestinal microbiota demonstrated that patients with Crohn's disease (CD) were significantly more enriched with the bacteria involved in the degradation of aminobenzoic acid than healthy controls. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) revealed a significantly reduced amount of fecal aminobenzoic acid in patients with CD than in the healthy controls. Rectal administration of aminobenzoic acid ameliorated dextran sulfate-induced colitis in mice with mitigated reduction of body weight loss and decreased intestinal weight/length ratio.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：クローン病 アミノ安息香酸 腸内細菌代謝産物 腸管上皮細胞 炎症性腸疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病 (Crohn's disease, CD) 患者の大腸では、炎症の有無に関わらず上皮細胞間透過性が亢進していることが報告されているが、その機序は未だ不明である。大腸上皮細胞間透過性の亢進は、齧歯類を用いた研究において腸炎の発症と進展に寄与することが報告されている。大腸吸収上皮細胞 colonocyte は強い細胞間接着を以て大腸上皮透過性の減弱に寄与しているが、申請者らは、CD 患者の大腸上皮細胞では細胞間接着分子の発現低下を伴い、colonocyte 特異的マーカーの発現量が低下していることを報告した。これらの結果は、colonocyte への分化障害が CD における上皮細胞間透過性亢進の一因であることを示唆すると共に、積極的な colonocyte への分化誘導が、CD 大腸病変に対する新たな治療となる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

クローン病患者の大腸上皮幹細胞において colonocyte への分化を誘導する化合物を同定し、同化合物による上皮細胞間透過性の低下効果を評価すると共に、マウス腸炎モデルを用いて腸炎減弱効果を検証する。

3. 研究の方法

【研究開始当初からの変更点】

本研究では、まず大腸上皮幹細胞における colonocyte 分化誘導化合物を同定し、その後に同化合物による腸管上皮バリア増強効果を確認する予定であった。しかし、より効果的に目的の化合物を同定するために、先に化合物ライブラリーの中から上皮細胞間透過性を低下させる物質を探索する方針とした。また、化合物ライブラリーとして、幹細胞分化を促す既知の化合物群を使用する予定であったが、近年腸内細菌代謝産物が腸管上皮細胞の機能に影響を与えることが多数報告されていることから、本研究においてもクローン病患者における腸内細菌叢及びその代謝産物の変化が腸管上皮に与える影響に着目し、腸内細菌代謝産物ライブラリーを使用する事とした。

(1) 大腸上皮細胞間透過性を低下させる腸内細菌代謝産物の探索

ヒト大腸上皮細胞株である Caco2 細胞をトランスウェルインサート一体型 96 well plate (Corning 社) 上槽で培養し、既知の 119 種類の腸内細菌代謝産物ライブラリー (MedChem Express 社) を用いて刺激する。EVOM2 用電極 STX100C9G を用いて、刺激前後で経上皮電気抵抗 (trans-epithelial electrical resistance, TEER) を測定し、刺激 48 時間後の TEER 変化率 (Δ TEER%) を算出する。

(2) クローン病患者の大腸における腸内細菌叢機能変化を介したアミノ安息香酸代謝異常の解明

大腸上皮細胞間透過性を低下させる腸内細菌代謝産物として、アミノ安息香酸に着目した検討を行う。健常者とクローン病患者の糞便を用いて 16SrRNA メタゲノム解析を行い、PICRUSt2 を用いた予測メタゲノム解析によって、クローン病患者の大腸における細菌叢の変化が、腸管内アミノ安息香酸の代謝に与える影響を評価する。

(3) クローン病患者の大腸におけるアミノ安息香酸減少の確認

健常者とクローン病患者の糞便を用いた質量分析 (LC-MS/MS) によって、クローン病患者の大腸におけるアミノ安息香酸の存在量を健常者と比較し、クローン病患者の大腸におけるアミノ安息香酸の減少を確認する。

(4) アミノ安息香酸による腸炎減弱効果の検証

C57BL/6 マウスに 3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を経口投与して上皮障害性急性腸炎モデルを作成し、アミノ安息香酸の注腸投与による腸炎減弱効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 大腸上皮細胞間透過性を低下させる腸内細菌代謝産物の探索

既知の 119 種類の腸内細菌代謝産物を用いてヒト大腸上皮細胞株 Caco2 細胞を刺激したところ、多くの細菌代謝産物が TEER に影響を与え、上皮細胞間透過性の亢進あるいは低下に働くことが明らかとなった。TEER 上昇率の最も高かった 10 種類の細菌代謝産物を用いて再検を行ったところ、4-アミノ安息香酸による TEER 上昇率が最も高く、上皮細胞間透過性を低下させた (図 1.

N=3 per group. Paired t test)。

② クロウン病患者の大腸における腸内細菌叢機能変化を介したアミノ安息香酸代謝異常の解明

(1)の結果から、アミノ安息香酸は腸内細菌代謝産物の中でも、上皮細胞間透過性を低下させることで腸管上皮恒常性の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。クロウン病患者の腸管では腸内細菌叢の多様性低下と構成変化が報告されていることから、腸内細菌叢の機能変化を介して腸管内アミノ安息香酸の代謝変化が生じていると考えた。そこで本仮説を検証するために、クロウン病患者と健常者の便検体より DNA を抽出し、16SrRNA メタゲノム解析を行った。この結果、既報通りクロウン病患者の腸管では細菌叢の多様性低下と構成変化が確認された。さらに、PICRUST2 を用いた予測メタゲノム解析の結果、クロウン病患者の腸内細菌では健常者と比較して、アミノ安息香酸の分解に関わる遺伝子発現量が上昇していることが明らかとなった (図 2. N=6 per group. LEfSe 解析)。

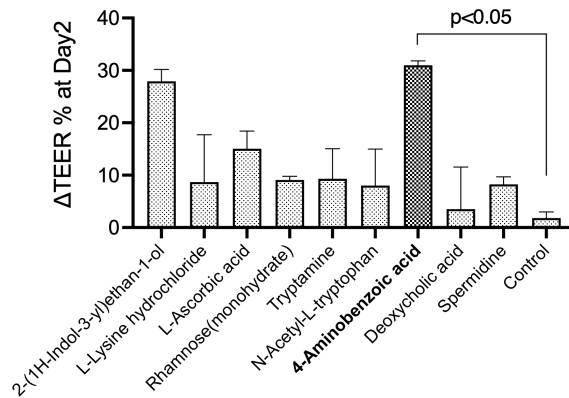


図 1. 腸内細菌代謝産物による TEER 変化率。

③ クロウン病患者の大腸におけるアミノ安息香酸減少の確認

クロウン病患者の腸管では、腸内細菌叢の機能変化に伴いアミノ安息香酸の分解が亢進している事が、予測メタゲノム解析の結果より明らかとなった。クロウン病患者の腸管におけるアミノ安息香酸の減少を確認するため、(2)と同じ便検体より腸内細菌代謝産物を抽出し、LC-MS/MS を用いた質量分析によって、腸管内のアミノ安息香酸量をクロウン病患者と健常者と比較した。この結果、ヒト腸管内における主なアミノ安息香酸は、4-アミノ安息香酸の構造異性体である 3-アミノ安息香酸であり、クロウン病患者の腸管では、健常者と比較して 3-アミノ安息香酸の含有量が有意に低下している事が分かった (図 3. N=6 per group. Mann-Whitney test)。以上の結果から、クロウン病患者の腸管では腸内細菌叢の機能変化に伴いアミノ安息香酸の分解が亢進しており、上皮細胞間透過性の亢進を介して腸炎発症に寄与している可能性が示唆された。

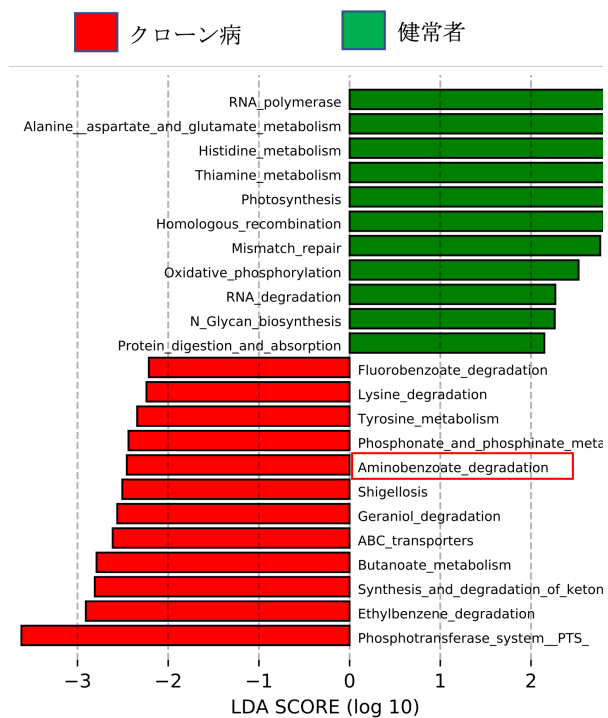


図 2. PICRUST2 を用いた腸内細菌代謝経路予測解析

④ アミノ安息香酸による腸炎減弱効果の検証

腸管内アミノ安息香酸が腸炎の発症と進展に与える影響を検証するために、DSS 誘発性大腸炎モデルマウスに 3-アミノ安息香酸を注腸投与して、腸炎減弱効果を検証した。3% DSS を 5 日間投与した後、3 日間の自由飲水を行うことで、急性腸炎を惹起した。500 μM の 3-アミノ安息香酸 200 μL を 1 日目、3 日目、5 日目に注腸投与して、8 日目に腸管を摘出した。アミノ安息香酸注腸群では、3% DSS 投与に伴う体重減少の改善が見られ、腸管重量/腸管長比率は control DSS 投与群と比較して低値であった(腸管重量/腸管長比, DSS 非投与 control 群 vs. DSS 投与 control 群 vs. 3-アミノ安息香酸投与群; 28.4 vs. 42.8 vs. 35.8 mg/cm)。これらの結果より、アミノ安息香酸による腸炎減弱効果が示唆された (図 4)。

(2) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

クローン病患者の腸管における細菌代謝産物の構成変化については、短鎖脂肪酸やトリプトファン、胆汁酸などいくつかの報告が見られるが、アミノ安息香酸の減少については未だ報告はなく、クローン病の病態における役割も未だ不明である。本研究の成果によって、クローン病患者の腸管では、腸内細菌叢の機能変化に伴いアミノ安息香酸の分解が亢進しており、腸管上皮細胞間透過性の亢進を介して腸炎発症に寄与していることが示唆された。これらの結果は、クローン病の病態におけるアミノ安息香酸の役割を明らかとし、アミノ安息香酸を標的とした新たなクローン病治療の開発に有用と考える。

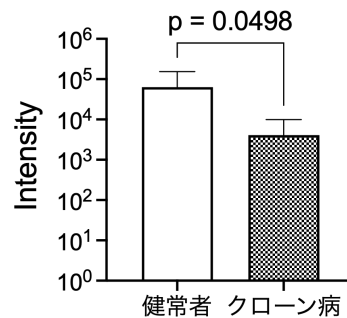


図 3. 腸管内アミノ安息香酸量

(3) 今後の展望

本研究の当初の計画では、大腸上皮幹細胞における colonocyte 分化誘導化合物を同定し、腸管上皮バリア増強効果を確認する予定であった。このため、今後はヒト初代培養大腸上皮幹細胞を用いて、アミノ安息香酸による colonocyte 分化誘導効果を検証する予定である。また、腸炎モデルマウスを用いた検討では、アミノ安息香酸の濃度を調整して、濃度依存的な腸炎減弱効果を確認する予定である。

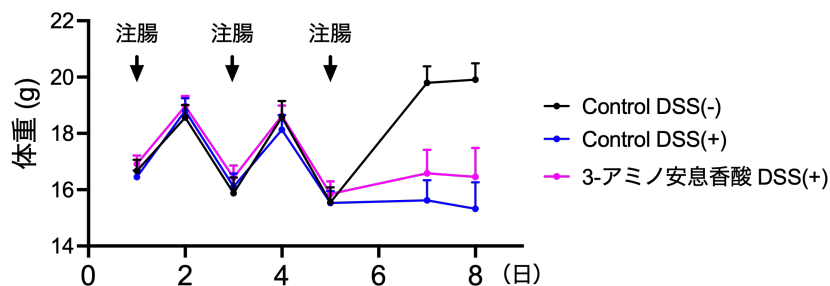


図 4. DSS 誘発性腸炎モデルマウスにおける体重変動

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 1件）

1. 発表者名 田中美帆、豊永貴彦、猿田雅之
2. 発表標題 炎症性腸疾患における腸管内アミノ安息香酸代謝異常と上皮バリア機能の関連検討
3. 学会等名 第109回 日本消化器病学会総会 ワークショップ8
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miho Tanaka, Takahiko Toyonaga, Fumiya Nakagawa, Naoki Shibuya, Masayuki Saruta
2. 発表標題 ACCELERATED DEGRADATION OF FECAL AMINOBENZOIC ACID DISRUPTS INTESTINAL EPITHELIAL BARRIER FUNCTION IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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	田中 美帆 (TANAKA Miho)		

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