

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590940

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における増悪因子としての鉄の役割 - 腸内細菌および鉄関連分子からの解析

研究課題名(英文) Role of iron as a detrimental influence on inflammatory bowel disease - analysis based on enteric microbiota and iron-related molecules

研究代表者

松浦 稔 (MATSUURA, MINORU)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30402910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：食事は炎症性腸疾患(IBD)における有力な環境因子の1つである。腸内細菌は腸炎の発症および慢性化に重要な役割を果たし、鉄は細菌の増殖・生存および毒性維持に必須である。IL-10KOマウスに鉄含有量の異なる食餌を与えた結果、鉄制限食群で組織学的腸炎の軽減と炎症性サイトカインの発現低下を認めた。また盲腸内の腸内細菌数は両群間で有意差を認めず、腸内細菌叢の組成に差を認めた。in vitroの検討にて、鉄負荷を受けたE.coliはJ774細胞内におけるsurvivalが延長し、炎症性サイトカイン産生も有意に高かった。以上より、鉄は腸内細菌叢の組成と毒性変化を介してIBDの病態に関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：Diet is a potential environmental influence in inflammatory bowel diseases (IBD). Enteric bacteria are required to induce and perpetuate intestinal inflammation in IBD, and iron is essential for the growth and virulence of bacteria. IL-10 deficient mice were fed normal- or low-iron diets. Histologic inflammation in the low-iron diet group was ameliorated and colonic IL-12p40 and MLN IL-17 secretion was lower in mice fed low-iron diet. There was no significant difference in concentrations of cultivable cecal bacteria, while T-RFLP analysis revealed distinct difference in the profile between two groups. The intracellular survival of iron-loaded E. coli in J774 macrophage cells was significantly enhanced compared to non-iron-loaded E. coli. TNF secretion from J774 cells phagocytosing iron-loaded E. coli was higher than J774 cells phagocytosing non-iron-loaded E. coli. Dietary iron potentiates intestinal inflammation by alteration of growth and virulence of enteric microbiota.

研究分野：医歯薬学

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 環境因子 鉄 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease; 以下 IBD)は腸管特異的に炎症が生じ、生涯にわたる治療の継続を余儀なくされる原因不明の慢性疾患である。IBD の病態として様々な腸管内抗原に対する過剰な免疫応答が慢性の腸管病変を形成すると考えられているが、中でも腸内細菌は腸炎の発症および慢性化に重要な役割を果たしている。その一方、IBD の病態形成には宿主側因子に加え、さまざまな環境因子の関与が示されており、食事は IBD における最も有力な環境因子の1つと考えられている。近年、経口的な鉄摂取量の増大が IBD の発症リスクや疾患活動性と相関することが報告され、IBD の環境因子として鉄が注目されている。鉄は細菌の増殖・生存および毒性維持に必須の栄養素であるが、その全てを宿主あるいは周囲環境から獲得している。一方、経口的に摂取された鉄の約 10%は十二指腸で吸収され、残りの大部分は IBD の病変好発部位である遠位小腸や大腸の管腔内に豊富に存在すると考えられる。さらに、これまでの臨床的および基礎的検討の結果、経静脈的投与と比較し、経口的な鉄投与により腸炎が増悪することが報告されている。以上のことから、経口的な鉄摂取は腸内細菌叢のバランスや細菌毒性を変化させることによって IBD の病態に関与することが推測されるが、そのメカニズムについては十分に解明されていない。

2. 研究の目的

鉄摂取が腸内細菌のバランスやその毒性に与える直接的影響と、それに基づく IBD の病態への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 慢性腸炎に及ぼす鉄の影響についての検討：腸内細菌の存在下で慢性腸炎が自然発症する IL-10 ノックアウト(IL-10KO)マウス

および Wild type(WT)マウスに生後 4 週齢から鉄含有量の異なる食餌(Normal- iron diet、low-iron diet)を与え、組織学的炎症および炎症性サイトカイン(大腸組織：IL-12p40, 腸間膜リンパ節：IL-17, IFN- γ)の発現を経時的に検討した。

(2) 腸内細菌叢に与える鉄の影響：鉄含有量の異なる食餌投与開始 8 週後の上記マウスから無菌的に採取した盲腸内容物(便)を用いて、細菌学的手法(CFU assay)および生物学的手法(T-RFLP 解析、PCR)にて腸内細菌叢の変化を解析した。

(3) 細菌毒性へ与える鉄の影響についての検討：マウスマクロファージ細胞株(J774)に異なる鉄濃度で培養した大腸菌(E.coli)を感染させ、Gentamycin protection assay を用いてマクロファージ内での細菌の増殖や殺菌抵抗性について検討した。また上記マクロファージから培養液中に産生される炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-12p40)の発現を ELISA にて検討した。

4. 研究成果

(1) 慢性腸炎に及ぼす鉄の影響

Normal-iron diet 群と比較し、Low-iron diet 群では食餌投与開始 4 週および 8 週後の組織学的腸炎が軽減し、腸管組織および腸間膜リンパ節細胞からの炎症性サイトカインの発現も有意に低下していた。

(2) 腸内細菌叢に与える鉄の影響

CFU assay では Normal-iron diet 群と Low-iron diet 群の間で腸内細菌総数に有意差を認めなかったが、形成されるコロニーの形態は明らかに異なっていた。そこで盲腸内容物から抽出した細菌の genomic DNA の 16SrDNA を増幅し T-RFLP 解析を行った結果、両群間において腸内細菌叢の組成が大きく変化していた。さらに IL-10KO マウスに腸炎を直接惹起することが証明されている腸内細菌(E.coli, E. faecalis, K.pneumoniae)

に特異的な primer を用いて定量的 PCR を行った結果、Normal-iron 群と比べ Low-iron 群で E.coli の有意な低下を認め、E.faecalis では両群間に有意な差を認めなかった。

(3) 細菌毒性へ与える鉄の影響

異なる鉄濃度で培養した E.coli (iron-depleted vs iron-loaded E.coli) をマウスマクロファージ細胞株 (J774) に感染させ、感染 2 時間後と 24 時間後の細胞内細菌を CFU assay にて検討した結果、鉄負荷を受けていない E.coli と比較し、鉄負荷を受けた E.coli は J774 細胞内における survival が有意に延長し、炎症性サイトカイン産生も有意に高かった。

以上より、鉄は腸内細菌の組成と毒性変化を介して IBD の病態に関与することが示された。

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 10 件：すべて査読あり)

Honzawa Y, Nakase H, Shiokawa M, Yoshino T, Imaeda H, Matsuura M, Kodama Y, Ikeuchi H, Andoh A, Sakai Y, Nagata K, Chiba T. Involvement of interleukin-17A-induced expression of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease. Gut. 2014 Feb 17. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305632.

Yoshino T, Nakase H, Minami N, Yamada S, Matsuura M, Yazumi S, Chiba T. Efficacy and safety of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for ulcerative colitis: a meta-analysis. Dig Liver Dis. 2014 Mar;46:219-26.

doi: 10.1016/j.dld.2013. 10.011.

Toyonaga T, Nakase H, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Honzawa Y, Hukata N, Yoshino T, Chiba T, Okazaki

K. Refractoriness of intestinal Behçet's disease with myelodysplastic syndrome involving trisomy 8 to medical therapies - our case experience and review of the literature. Digestion. 2013;88:217-21. doi: 10.1159/000355341.

Matsumura K, Nakase H, Kosugi I, Honzawa Y, Yoshino T, Matsuura M, Kawasaki H, Arai Y, Iwashita T, Nagasawa T, Chiba T. Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection: in vivo identification of cytomegalovirus persistent infected cells. Inflamm Bowel Dis. 2013;19:1951-63. doi: 10.1097/MIB.0b013e318293c5bf.

Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Matsumura K, Uza N, Yamaguchi Y, Mizoguchi E, Chiba T. Heparan sulfate on intestinal epithelial cells plays a critical role in intestinal crypt homeostasis via Wnt/ β -catenin signaling. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2013 ;305:G241-9. doi:10.1152/ajpgi.00480.2012.

Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Higuchi H, Toyonaga T, Matsumura K, Yoshino T, Okazaki K, Chiba T. Prior use of immunomodulatory drugs improves the clinical outcome of endoscopic balloon dilation for intestinal stricture in patients with Crohn's disease. Dig Endosc. 2013;25:535-43. doi: 10.1111/den.12029.

Fukuchi T, Nakase H, Matsuura M, Yoshino T, Toyonaga T, Ohmori K, Ubukata S, Ueda A, Eguchi T, Yamashita H, Ito D, Ashida K. Effect of intensive granulocyte and monocyte adsorptive apheresis in patients with ulcerative

colitis positive for cytomegalovirus. *J Crohns Colitis*. 2013;7:803-11.
doi:10.1016/j.crohns.2012.12.003.
Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- α production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17: E140-2. doi: 10.1002/ibd.21750.
Fukuchi T, Nakase H, Ito D, Yamashita H, Matsuura M, Nagatani Y, Koga H, Senda K, Eguchi T, Ubukata S, Kawaguchi S, Ueda A, Tanaka T, Ohashi R, Otsuka M, Ashida K. Rapid induction of mucosal healing by intensive granulocyte and monocyte adsorptive aphaeresis in active ulcerative colitis patients without concomitant corticosteroid therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34:583-5.
doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04768.x.
Uza N, Nakase H, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Shimaoka T, Kume N, Minami M, Yonehara S, Ikeuchi H, Chiba T. SR-PSOX/CXCL16 plays a critical role in the progression of colonic inflammation. *Gut*. 2011;60:1494- 505.
doi: 10.1136/gut.2010.221879.

[学会発表](計6件:すべて査読あり)

Toyonaga T, Nakase H, Matsuura M, Yamada S, Minami S, Honzawa Y, Yoshino T, Okazaki K, Chiba T. Microbial balances altered by restriction of dietary iron ameliorated immune-mediated colitis. *ECCO*, Copenhagen, 2014.2.21
Toyonaga T, Matsuura M, Yamada S,

Minami S, Honzawa Y, Yoshino T, Nakase H, Okazaki K, Chiba T. Fecal lipocalin2 reflects colonic inflammation in murine colitis model: A possible role of measuring fecal lipocalin2 as a biomarker of IBD. *UEGW*, Berlin, 2013.10.16

Matsuura M, Nakase H, Yoshino T, Chiba T. Importance of magnifying colonoscopy for evaluation of mucosal healing and prediction of disease relapse in quiescent ulcerative colitis. *AOCC*, Tokyo, 2013.6.14

Matsuura M, Nakase H, Yoshino T, Chiba T. Characteristics of colonoscopic features in patients with ulcerative colitis concomitant cytomegalovirus infection. *AOCC*, Tokyo, 2013.6.13
Matsuura M, Nakase H, Yoshino T, Chiba T. Long-term follow-up in patients with ulcerative colitis treated with tacrolimus: early and long-term data from a retrospective observational study. *ECCO*, Vienna, 2013.2.15

松浦 稔, 仲瀬裕志, R. Balfour Sartor. 炎症性腸疾患の病態における鉄の関与 - 腸内細菌からの解析. 第97回日本消化器病学会総会, 東京, 2011.5.13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 稔 (MATSUURA MINORU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 30402910

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし