

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460943

研究課題名(和文) 腸管粘膜上皮層バリア機能を制御するアミノ酸の同定および作用機序の解明

研究課題名(英文) Identification of the amino acids regulating barrier function of the intestinal mucosal layers

研究代表者

勝野 達郎 (KATSUNO, Tatsuro)

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10343089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：まず最長観察期間12年間の長期インフリキシマブ継続投与中のクローン病患者74名を対象に、後ろ向きコホート研究を行った。1日600kcal以上の経腸栄養療法併用が、長期寛解維持に有用な因子であることを解明した。

次にin vitroで、経腸栄養剤に含まれるアミノ酸が大腸粘膜上皮細胞層のバリア機能へ影響するかを調べた。TNF刺激によりバリア機能が低下した上皮細胞層において、それぞれグリシンとグルタミン添加により、バリア機能が有意に回復することを見出した。PCR arrayの結果、グリシン添加群ではclaudin-14遺伝子の発現が有意に上昇しており、バリア機能の回復に関与するものと推定された。

研究成果の概要(英文)：We first carried out a retrospective cohort study for 74 patients with Crohn's disease (CD) treated with infliximab (IFX). The longest observation period was 12 years. This study demonstrated that concomitant use of enteral nutrient (EN) at a dose of 600 kcal/day yielded a sustained response to IFX maintenance therapy in patients with CD.

We next investigated whether the amino acids included in the EN can affect the barrier function of the large intestinal mucosal epithelial cell layers. We found that glycine and glutamine individually recovered barrier function of the epithelial cell layers treated with TNF, a well-known cytokine to decrease the barrier function. The results of PCR array showed that the treatment with glycine significantly increased the gene expression of claudin-14, suggesting that up-regulation of claudin-14 is one of the mechanism of EN.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸管粘膜上皮 バリア機能回復 アミノ酸 グリシン グルタミン TNF クローン病 経腸栄養剤

## 1. 研究開始当初の背景

本邦におけるクローン病患者数は3万人を越え、うち抗 TNF $\alpha$  抗体製剤を投与している患者数は3割以上と言われている。抗 TNF $\alpha$  抗体製剤は有効性が非常に高い治療薬であるが、高価であること、投与初期には有効であっても維持投与を継続するうちに効果が低下してくること(二次無効)が問題点とされている。二次無効については、国際的なデータでも1年間の維持投与の間に30%程度の症例に認められるとされている。二次無効のメカニズムは複数考えられているが、最も頻度が高いのが抗 TNF $\alpha$  抗体に対する抗体が産生されることにより、血中抗 TNF $\alpha$  抗体濃度が保たれなくなることである。この状態に対する最も有効な方法は抗 TNF $\alpha$  抗体の投与量の増量や投与間隔の短縮であり、これらの方法は実臨床では有効であるが、高価な抗 TNF $\alpha$  抗体製剤の投与量をさらに増やすことになり、医療費の圧迫をもたらす可能性がある。

現在本邦ではクローン病の診療に多成分製剤である経腸栄養剤が用いられているが、TNF $\alpha$  抗体製剤による維持投与クローン病症例の二次無効予防に有効である機序については十分解明されていない。

一方、クローン病症例では腸管上皮のバリア機能が低下していることが報告されており(Zeissig S., et al. GUT 2007)、バリア機能の補正が病態の改善をもたらすと考えられている。そこで、本研究の目的は、経腸栄養剤の主成分であるアミノ酸に着目し、アミノ酸成分の中に腸管粘膜上皮のバリア機能を制御し得る物質を見だし、さらにこの作用機序を明らかにすることとした。今後のクローン病患者に対する診療だけでなく、他の消化管疾患治療や健常者の消化管機能の扶助にも有益な結果が得られるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

消化管の生理的機能の中でバリア機能は特に重要な機能であり、クローン病などの病的腸管ではバリア機能が低下していると考えられている。クローン病に対しては近年効果の高い抗 TNF $\alpha$  抗体製剤が臨床的に使用されているが、我々は経腸栄養療法の併用により臨床効果が短期的に有意に高まることを見いだした。

そこで、本研究の目的は、まず長期的な経腸栄養療法併用の臨床効果を明らかにすることである。一方、経腸栄養剤にはアミノ酸を豊富に含むことから、*in vitro* で腸管粘膜上皮バリア機能を増強させるアミノ酸を同定する。さらに、作用機序を明らかにし、消化管バリア機能制御療法の開発に資することとした。消化管バリア機能制御因子の解明は、クローン病患者のみならず健常者腸管の恒常性の維持、さらに疾患予防のためにもきわめて有益な情報となると考えられる。

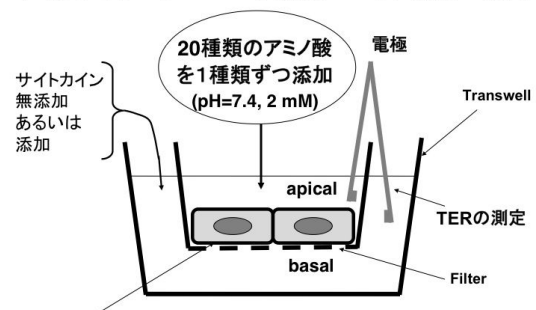
## 3. 研究の方法

Infliximab は本邦でクローン病治療に承認されている抗 TNF $\alpha$  抗体製剤の1種である。そこで、我々の施設において infliximab 長期投与クローン病症例74名に対して、二次無効にならず効果が維持できている44名と二次無効に陥った30名の臨床的背景を比較検討する(8年間の後ろ向きコホート、観察期間中央値85週間)。

次に、*in vitro* の系にて、培養腸管上皮細胞層のバリア機能を制御する生理活性を有するアミノ酸を同定する。

具体的には、最初に、経腸栄養剤の主成分であるアミノ酸が腸管上皮細胞層のバリア機能を制御する生理活性を有するか明らかにするために *in vitro* の系を用いて同定する。Transwell の filter 上に、腸管粘膜上皮のバリア機能の検討に頻用されている T84 ヒト大腸粘膜上皮細胞を confluent となるまで培養し、24時間無血清化後に、basal 側から炎症性サイトカインを添加し、apical 側から20種類のアミノ酸を1種類ずつ添加する。24時間の incubation 後に腸管上皮細胞層のバリア機能を TER (transepithelial electrical resistance) として測定し、TER を変化させるアミノ酸を同定する。

本研究で用いる *in vitro* 実験系とバリア機能の測定



Confluent後1週間経過した無血清化T84ヒト大腸粘膜上皮細胞層

腸管上皮バリア機能を正に制御するアミノ酸が同定できた場合、tight junction 構成蛋白である抗 claudin 抗体を用いて、上皮細胞内の claudin 蛋白量に与える変化を明らかにする。さらに、tight junction を構成する蛋白の遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。上記で同定されたアミノ酸添加によって変化する遺伝子発現を、PCR array を用いて網羅的に解析する。PCR array として SA Bioscience 社の"Human Tight Junctions PCR Array"を用いる。この array は claudin 遺伝子発現だけでなく、他の tight junction 構成蛋白、ZO-1 などの裏打ち蛋白を網羅しており、アミノ酸の作用の全貌を明らかにできる。

## 4. 研究成果

まず、アミノ酸を含有する経腸栄養療法の投与が、クローン病患者の長期的な寛解維持に意味があるかどうかを明らかにする臨床的検

討を行った。具体的には Infliximab により寛解導入に成功したクローン病患者において、寛解維持の成否と、経腸栄養療法の有無ならびに臨床的特徴について検討した。

当院で 2002 年から 2010 年に Infliximab で寛解導入し、かつ 6 ヶ月以上の寛解維持ができたクローン病症例を対象とした。寛解維持群と二次無効群を 2014 年 8 月まで追跡調査して解析を行い、経腸栄養療法の寛解維持への寄与を含めて各群の臨床的特徴を精査した。

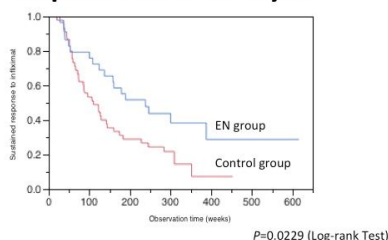
最終的な対象症例は 74 症例、平均観察期間 40.8 ヶ月 (5~143 ヶ月)、男性/女性 = 56 例/18 例、平均発症年齢 23.7 歳 (13 歳~53 歳)、Infliximab 使用開始までの平均罹病期間は 91.4 ヶ月 (9~290 ヶ月)、Infliximab 開始平均年齢 31.2 歳 (18~60 歳)、小腸型/大腸型/小腸大腸型 = 9 名/14 名/51 名であった。観察の結果、寛解維持症例は 19 名、二次無効症例は 55 名であった。寛解維持症例は、二次無効症例に比し、1 日 600kcal 以上の経腸栄養療法併用率が有意に高かった ( $p=0.023$ , Log-rank test)。経腸栄養療法以外には、寛解維持成功因子は見いだせなかった。従って、この 12 年間のコホート研究で、アミノ酸を含有する経腸栄養療法 (1 日 600kcal 以上) の併用が、Infliximab 投与クローン病患者の寛解維持に有効であることが示された。

#### Demographic characteristics of patients

Characteristic	EN $\geq$ 600kcal(n=29)	EN<600kcal(n=45)	P-value
Gender	25/4	31/14	0.156
Age of disease onset	22.8	24.2	0.782
Disease duration before starting IFX(mo)	97.4	87.5	0.744
Age at starting IFX	30.8	31.4	0.978
Area of involvement			0.313
Ileum	6	3	
Colon	6	8	
Ileum and colon	17	34	
Current smoking (person)	4	6	0.770
Concomitant medications (person)			
5-aminosalicylates	28	43	0.695
Corticosteroids	3	4	0.843
Azathioprine	2	3	0.680
6-mercaptoprine	2	1	0.695

Mann-Whitney U-test Fisher's exact test

#### Kaplan-Meier analysis



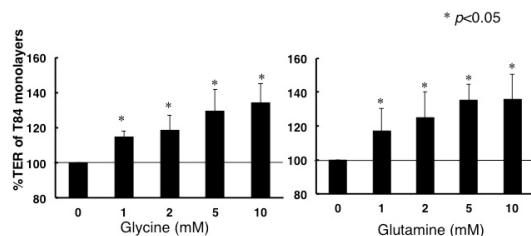
Kaplan-Meier analysis confirmed the significantly higher sustained response to IFX in the "enteral nutrition group" compared with that in the "control group" ( $p=0.0229$ ).

上記の臨床的データから、経腸栄養製剤に含まれるアミノ酸が腸管粘膜上皮のバリア機能の保持に与える可能性を考え、*in vitro* でアミノ酸が腸管粘膜上皮のバリア機能に与え

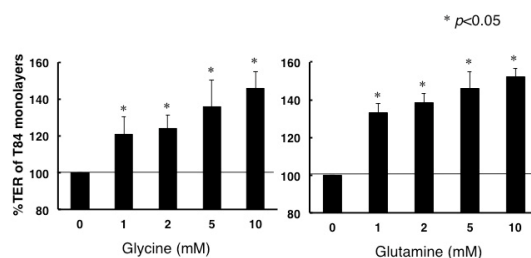
る影響に関する検討を行った。まず無血清化した T84 大腸粘膜上皮細胞層の基底膜側から IL-6 あるいは IL-10 を添加しバリア機能の変化を観察した。IL-6 添加により TER (transepithelial electric resistance) は、control (100%) と比較して優位に低下した ( $87 \pm 0.6\%$ )。一方、IL-10 添加により TER は増加した ( $124 \pm 5.6\%$ )。IL-6 添加により、選択的に claudin-2 蛋白量が増加していた。次に、上記の系に対して、20 種類のアミノ酸 ( $pH=7.4$ , 2 mM) を個々に添加し TER の変化を観察した。その結果 glycine および glutamine 添加時のみ、TER 値はサイトカイン無添加群で、それぞれ  $118 \pm 0.1\%$ 、 $116 \pm 2.6\%$ 、IL-6 添加群で  $100 \pm 1.8\%$ 、 $97 \pm 2.1\%$ 、IL-10 添加群で  $150 \pm 10\%$ 、 $140 \pm 7.5\%$  と、いずれの群においても優位に増加した。また、glycine および glutamine 添加により、いずれの群においても選択的に claudin-2 蛋白量が有意に抑制されていた。

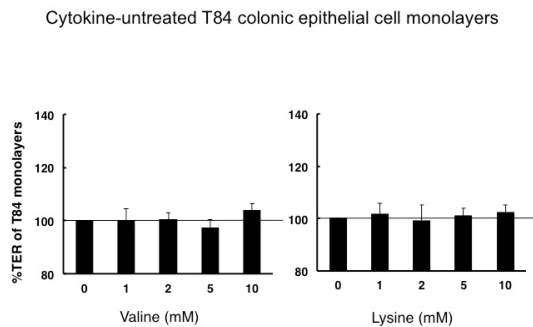
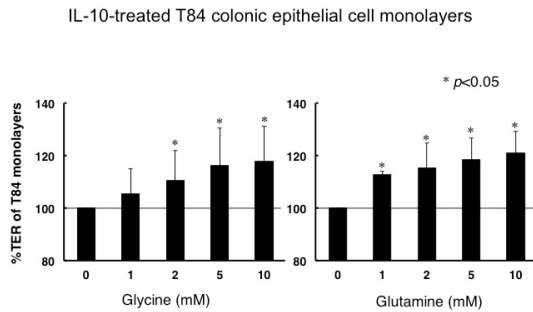
Glycine および glutamine の効果をさらに裏付けるため、dose-dependency と他のアミノ酸 (valine と lysine) における dose-dependency の検討を行った。その結果、glycine および glutamine は dose-dependent に有意に TER を上昇させることが明らかになった。

Cytokine-untreated T84 colonic epithelial cell monolayers



IL-6-treated T84 colonic epithelial cell monolayers





以上より、大腸粘膜上皮細胞層において、IL-6 は claudin-2 蛋白の蛋白量を選択的に up-regulate し、TER を抑制してバリア機能を低下させるが、glycine および glutamine は、逆に claudin-2 蛋白を選択的に down-regulate し TER を上昇させバリア機能保持に働くことが明らかになった。

そこで、さらに glycine および glutamine によるバリア機能強化のメカニズムを *in vitro* で確認するため、10 ng/ml の TNF $\alpha$  刺激によりバリア機能が低下した T84 大腸粘膜上皮細胞層に glycine と glutamine をそれぞれ添加した。その結果、有意にバリア機能が回復することを見出した。Valine 添加はバリア機能に影響を与えなかった。

この機序解明のために、glycine と glutamine 添加がそれぞれ tight junction 構成蛋白遺伝子発現に影響を与えるか網羅的に PCR array により検討した。

その結果、T84 大腸粘膜上皮細胞に対する 10 ng/ml の TNF $\alpha$  刺激により、ICAM-1 と ICAM-2 の遺伝子発現が有意に増強され、これがバリア機能の低下原因の一つと推定された。Glycine と glutamine 添加は、ICAM-1 と ICAM-2 の遺伝子発現には影響を与えなかったが、glutamine 同時添加群では、claudin-14 遺伝子の発現が有意に上昇しており、バリア機能の維持に關与するものと推定された。しかし、glycine 添加による有意なバリア機能強化は、claudin-14 の遺伝子発現増強だけでは説明が付かないと思われた。

本研究の結論として、アミノ酸の中で特に glycine と glutamine が、炎症性サイトカインの

存在下においても、大腸粘膜上皮細胞層のバリア機能を有意に増強させることが明らかになった。Glycine 添加は一部の tight junction 構成蛋白遺伝子発現を有意に増強させたものの、アミノ酸によるバリア機能強化の機序として、バリア機能調節蛋白質の分解制御やリン酸化制御にも關与している可能性も示唆された。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

櫻井健洋、勝野達郎、横須賀 收  
Infliximab 維持投与クローン病に対する経腸栄養療法併用の長期観察結果 第 101 回日本消化器病学会総会 2015 年 04 月 23 日～2015 年 04 月 25 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Takehiro Sakurai, Tatsuro Katsuno, Osamu Yokosuka. Concomitant use of enteral nutrition therapy increases sustained response to infliximab in patients with Crohn's disease – A long-term cohort study. American Gastroenterological Association (DDW2015) 2015 年 05 月 16 日～2015 年 05 月 19 日 Washington, D.C. (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 勝野 達郎

(KATSUNO, Tatsuro)

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10343089

(2)研究分担者 中川 倫夫  
( NAKAGAWA, Tomoo )  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：4 0 3 9 6 6 7 7

(3)連携研究者 なし  
( )

研究者番号：