

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460949

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における腸管内分泌L細胞の役割の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)The morphology of small intestine and the restorative effect on drug induced colitis in proglucagon derived peptides knockout mice

研究代表者

安藤 貴文(Ando, Takafumi)

名古屋大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80378041

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)：GFP (green fluorescent protein) が pro-Glucagon 領域にノックインされた GLP-2 を含む proglucagon derived peptides (PGDPs) 損欠マウスを使用した。PGDPs^{-/-}マウスと PGDPs^{+/+}マウスに DSS (dextran sodium sulfate) 腸炎を発生させたところ、体重減少、臨床活動度において両者に有意な差は認められなかった。このことから、GLP-2 というインクレチンは、作用増強により腸炎の回復を早める効果はあるが、回復に必須のものではない可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the morphology of small intestine and the restoration on colitis with deficiency of proglucagon derived peptides (PGDPs) containing GLP-2. Mice deficient with PGDPs were used. Eight-week-old male mice of PGDPs^{-/-} and PGDPs^{+/+} were sacrificed to check the morphology of the small intestine. To elucidate the effect of the deletion of PGDPs on colitis, 12-week-old PGDPs^{-/-} and PGDPs^{+/+} male mice were exposed to 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) for 6 days. Severity of colitis was assessed daily by body weight loss and disease activity index. Histological examinations were performed on day 7 and 21. There were no deformity and no differences in the villous height and crypt depth in PGDPs^{-/-} mice. In DSS colitis, the decline and amelioration of body weight and disease activity index were not different between PGDP^{-/-} and PGDP^{+/+}. PGDPs deletion did not showed the morphological deformity of small intestine and differences in colitis.

研究分野：消化器内科

キーワード：GLP-2 DSS腸炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国で急速に患者数が増加している炎症性腸疾患(クローン病、潰瘍性大腸炎)は、腸粘膜に炎症を引き起こす難治性の疾患である。免疫応答の異常がその発症に寄与すると考えられているが、不明な点が多い。5-ASA 製剤、免疫調節剤、副腎皮質ステロイド、抗 TNF- 抗体、顆粒球除去療法がそれぞれ単独または組み合わせて用いられるが、十分な効果を得ることができずに広範囲の腸管切除が必要となる症例が存在する。また免疫調節剤、副腎皮質ステロイド、抗 TNF- 抗体は重篤な副作用に注意が必要な薬剤であり、適応の検討など慎重に使用する必要がある。炎症性腸疾患に対する新たな治療薬の出現が望まれているが、生涯にわたる疾患であるため、長期投与の際の有効性と安全性が要求される。

(2) 腸管には、L 細胞や K 細胞と呼ばれる内分泌細胞が存在し、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や glucose-dependent insulintropic polypeptides (GIP) と呼ばれるインクレチンをそれぞれ産生し、様々な栄養素によりインクレチン分泌が惹起される。GLP-1 や GIP は膵細胞にある特異的受容体に結合し、インスリン分泌を促進することに注目して、インクレチン作用を標的とした新たな糖尿病治療薬が開発されている。

最近、GLP-2 受容体欠損マウス(Glp2r^{-/-})の解析 (Lee et al. *Endocrinology* 153: 1141-1151, 2012) が報告されたが、Glp2r^{-/-} マウスでは、小腸の重さ、絨毛の長さ、陰窩の深さや細胞増殖は、対照マウスと変わらなかった。この結果は、腸管機能の維持に、内因性 GLP-2 は必須ではないことを示唆している。グルカゴン受容体欠損マウス(Gcgr^{-/-})では、GLP-1、GLP-2 共に代償性の増加を認めている。このマウスでは、腸管上皮細胞の増殖が増加し、GLP-1 のアンタゴニストの投

与によりその増殖が抑制されることが報告されている(Grigoryan et al. *Endocrinology* 153: 3076-3088, 2012)。

一方、外因性に GLP-2 を投与した研究からは、GLP-2 が腸管上皮細胞の増殖、アポトーシスや栄養素の吸収などの腸管機能の維持に重要な役割を果たすことが、様々な腸管障害モデル (Dextran sulfate sodium (DSS) 誘発腸炎など) によって示されている(Yazbeck et al. *Current Opinion in Investigational Drugs* 11: 440-446, 2010)。

(3) さらに、欧米では、GLP-2 のアナログ製剤が、短腸症候群やクローン病の治療に応用されつつあり、根治的な治療法のなかった炎症性腸疾患の新しい治療法として期待されている。我々は研究分担者の尾崎と共同して、糖尿病治療薬である Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬の炎症性腸疾患への治療応用への可能性を探るために C57BL/6 マウスを用いて予備的な動物実験を行った。選択的 DPP4 阻害薬 (SK0403) はマウス DSS 誘発腸炎の発症にはほとんど影響しなかったが、腸炎の治癒過程において大腸粘膜上皮の増殖を促進しその回復を早めた。

また、2011 年 Ban H らは、DPP-4 阻害薬が、腸管上皮の増殖を亢進させることを報告した (Ban H et al. *Oncol Rep* 25: 1699-703, 2011)。

(4) DPP-4 阻害薬は副作用リスクの低い薬剤であり、糖尿病の治療薬であるだけに長期投与の安全性も十分検討されている。もしこの薬剤の炎症性腸疾患に対する有効性を証明できれば、治療薬の選択肢が増え患者には大きな福音になると考えている。しかしながら、この DPP-4 阻害薬が炎症性腸疾患に有効であることの根拠となるべき腸管内分泌 L 細胞から分泌される内因性の GLP-1、GLP-2

の炎症保護効果について、十分解明されていないことから本研究を計画した。

グルカゴン遺伝子によりコードされるプログルカゴンは、膵 胞において、プロホルモン変換酵素 2 (PC2) によりグルカゴンが、腸管内分泌 L 細胞においては、PC1/3 により GLP-1 と GLP-2 が産生され、分泌される。林良敬 (名古屋大学環境医学研究所) は、プログルカゴン遺伝子に GFP を挿入し、プログルカゴン由来ペプチドをすべて欠損したグルカゴン遺伝子欠損 (以下 GcgKO) マウスを作製した。GcgKO マウスは、グルカゴンのみならず、GLP-1 や GLP-2 等の L 細胞由来のホルモンをすべて欠失している。そのため、腸管における GLP-1 及び GLP-2 の役割を解明するのに有用なマウスモデルと考える。

2 . 研究の目的

wild type マウスと GcgKO マウスにおける、小腸及び大腸の形態の差異を検討し、また、DSS 誘発腸炎における腸炎発症過程、回復過程の違いを観察する。これにより、グルカゴン由来ペプチドの腸管炎症と粘膜修復の制御作用ならびに腸管の炎症における L 細胞の役割が明らかになり、GLP-1 及び GLP-2 分解抑制作用を有する DPP-4 阻害薬の炎症性腸疾患治療薬としての役割を推起することが可能となる。同薬剤は既に糖尿病患者において広く使用されており、効果的かつ安全な画期的治療法につなげることをこの研究の目的とする。

3 . 研究の方法

(1) wild type マウスと GcgKO マウスを培養し、8 週齢、オスのマウスを各 8 匹用意し、各マウスの基本データと小腸及び大腸の、腸管の長さ、重さ、病理学的評価による絨毛の高さ、幅、陰窩深さの測定を行う。

(2) DSS による腸炎モデルの検討

DSS 腸炎の検討に適切な投与濃度、投与期間の調整を、各種行い、検討する。設定を固定した後に、6 ~ 8 週齢のオスのマウスを各 6 - 8 匹用意し、個別飼育とした後に同時に投与を開始、毎日の体重変化、腸炎の臨床データ (便性状、血便の程度など) を回復期終了まで測定する。

評価項目 : 腸炎の程度は、体重減少率、Disease Activity Index (DAI) を用いて評価する。炎症の程度、修復過程は、介入前、介入直後、回復期を定めた上で、解体し、小腸、大腸の炎症を病理学的に検討し、病理学的スコアを用いて評価する。

4 . 研究成果

GFP (green fluorescent protein) が pro-Glucagon 領域にノックインされた GLP-2 を含む proglucagon derived peptides (PGDPs) 損欠マウスを使用した。

まず PGDPs-/- マウスに正常な GLP-1、GLP-2 が発現しないことを確認した (図 1)。

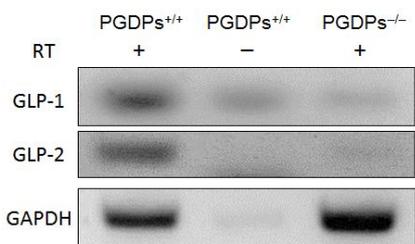
次に、8 週齢のオスの PGDPs-/- マウス (GcgKO マウス) と PGDPs+/+ マウスにおける、小腸、大腸の基礎データ、病理学的な形態評価を行った。(図 2-1,2)

そして、2.5% の DSS (dextran sodium sulfite) を 6 日間投与し、体重減少、臨床活動度を計測した。(図 3 - 1、2)

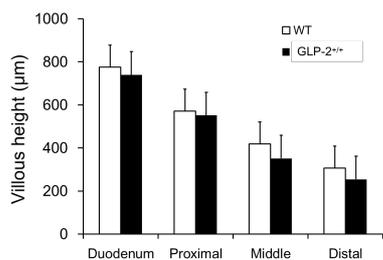
投与開始後 9 日目 (DSS 投与終了後 3 日目) において、2 群間に体重減少及び DAI スコアには有意な差は見られなかった (PGDPs-/- group, BW $-15.9 \pm 4.4\%$, DAI 3.8 ± 1.8 ; PGDPs+/+ group, BW $-14.9 \pm 3.8\%$, DAI 4.1 ± 3.3 ; NS)。10-24 日目においては、PGDPs-/- 群の体重は Gcg+/+ 群より 1.0-5.1% 程低値であったが、有意ではなかった。さらに、投与開始後 7 日目と、21 日目におけるマウスの腸管を組織学的に検討したところ、腸管絨毛の高さと、腺窩の深さにおいて、PGDPs-/- マウ

スと PGDPs^{+/+}マウスに差は見られなかった。(表1)

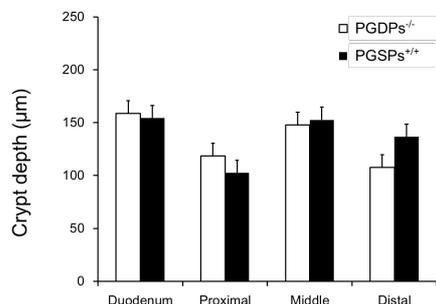
以上のことより、GLP-2 が欠損している状況において、腸炎の回復過程が完全に阻害されることはなく、治癒が遅延する傾向がみられる程度との結論に至った。このことから、GLP-2 というインクレチンは、作用増強により腸炎の回復を早める効果はあるが、回復に必須のものではない可能性が考えられた。



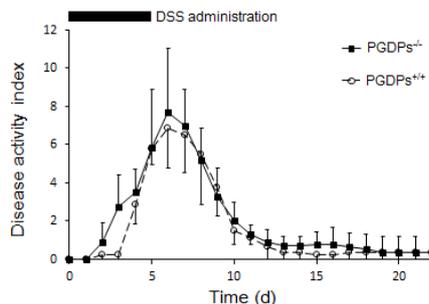
(図1) GcgKO マウス(PGDPs^{-/-})におけるGLP-1、GLP-2 非発現の確認



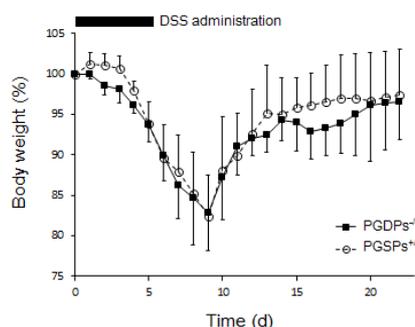
(図2-1) GcgKO マウス (PCDPs^{-/-}) における小腸絨毛の高さの wild マウスとの比較



(図2-2) GcgKO マウス (PCDPs^{-/-}) における小腸絨毛の高さの wild マウスとの比較



(図3-1) GcgKO マウス(PCDPs^{-/-})と wild マウスの臨床的活動度 (Disease activity index:DAI) の比較 wild マウスとの比較



(図3-2) GcgKO マウス(PCDPs^{-/-})と wild マウスの DSS 投与後の体重推移の比較

Histological evaluation on DSS colitis

Portion of gut	PGDPs	Control	Day 7	Day 21
Duodenum	PGDPs ^{-/-}	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	PGDPs ^{+/+}	0 ± 0	0.6 ± 0.5	0 ± 0
Distal small intestine	PGDPs ^{-/-}	0 ± 0	2.0 ± 0.7	0.2 ± 0.5
	PGDPs ^{+/+}	0 ± 0	1.6 ± 0.9	1.8 ± 1.1
Distal colon	PGDPs ^{-/-}	0 ± 0	1.8 ± 0.8	0 ± 0
	PGDPs ^{+/+}	0 ± 0	1.8 ± 0.8	1.0 ± 1.0

(表1) GcgKO マウス (PCDPs^{-/-})と wild マウスの DSS 腸炎前後の病理学的スコア (Historical score)の比較

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1件)

Small intestine morphology and recovery after drug-induced colitis in

proglucagon-derived peptides knockout mice

Masanobu Matsushita, Osamu Watanabe, Takafumi Ando, Osamu Maeda, Ryoji Miyahara, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Hidemi Goto, Yoshiki Hirooka, and Udo Schumacher

Cogent Medicine Vol. 3 , Iss. 1,2016
<http://dx.doi.org/10.1080/2331205X.2016.1215783>

査読有り

[学会発表](計1件)

Role of Endogenous GLP-2 in The Recovery Phase Of DSS-Induced Colitis in Mice

21th United European Gastroenterology Week "UEGW 2013", 2013

Berlin, Germany, 14th of Oct

Masanobu Matsushita, Osamu Watanabe, Takafumi Ando, Osamu Maeda, Ryoji Miyahara, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Yoshiki Hirooka, Hidemi Goto

6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤 貴文 (Ando, Takafumi)
名古屋大学・大学院医学系研究科
・招へい教員
研究者番号：80378041

(2)研究分担者

後藤 秀実 (Goto, Hidemi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10215501

前田 修 (Maeda, Osamu)
名古屋大学・大学院医学系研究科
・特任講師
研究者番号：20378053

渡辺 修 (Watanabe, Osamu)
名古屋大学・医学部附属病院
・病院講師

研究者番号：80378059

大宮 直木 (Ohmiya, Naoki)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：00335035

尾崎 信暁 (Ozaki, Nobuaki)
(平成25年度まで参加)

名古屋大学・総合保健体育化科学センター・特任教授
研究者番号：70378082

(3)研究協力者

林 良敬 (Hayashi, Yoshitaka)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授