

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460967

研究課題名(和文) 鉄代謝関連分子Ngalの炎症性腸疾患における役割とその鉄利用阻害に基づく治療開発

研究課題名(英文) Role of iron metabolism-related molecule, NGAL, in the pathophysiology of inflammatory bowel disease

研究代表者

松浦 稔 (MATSUURA, MINORU)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：30402910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Neutrophil gelatinase-associated lipocalin(Ngal)はIBD患者の炎症粘膜において発現亢進が認められるが、その病態への関与は不明である。IL-10KOマウスでは腸炎進展とともに腸管組織でのNgal発現が亢進した。IL-10KOマウスと比較し、IL-10/NgalダブルKO(DKO)マウスでは発症早期から著明な腸炎増悪を認め、IL-10/Ngal DKO由来マクロファージでは貪食された細菌のクリアランスが低下し、炎症性サイトカイン産生が有意に増加した。以上よりNgalは貪食細菌のクリアランスを促進することにより腸炎発症に抑制的に作用することが示された。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil gelatinase B-associated lipocalin (Ngal) expression has been shown to be increased in the inflamed intestinal tissues of patients with inflammatory bowel disease (IBD), but the role of Ngal in the pathophysiology of IBD remains unclear. Ngal expression in the colonic tissues of IL-10KO mice increased with the development of colitis. Ngal/IL-10 double KO mice showed a more rapid onset and development of colitis, and remarkable exacerbation of colitis compared to IL-10KO mice. IL-10/Ngal DKO mice-derived peritoneal macrophage showed the decrease of phagocytic bacterial clearance and produced significantly higher amounts of inflammatory cytokines compared to IL-10KO mice-derived peritoneal macrophage. Our findings revealed that Ngal prevents the development of intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症性腸疾患 Ngal

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(以下 IBD)は腸管特異的に炎症が生じる慢性疾患であり、その病態には腸内細菌や食事などの環境因子が関与すると考えられている。申請者らは、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、また鉄が細菌の増殖および毒性維持に必須の因子であることに着目し、食事に含まれる鉄が腸内細菌叢のバランスや細菌の毒性変化を介して IBD の病態に関与することを報告してきた。

細菌は siderophore と呼ばれる強力な鉄結合能を有する非ペプチド性の小分子を産生し、宿主体内に存在する鉄結合性分子から鉄を引き剥がし、細菌自身に必要な鉄を確保している。一方、宿主側にも微生物による鉄利用を阻害し、生体防御に働く機構が存在している。その1つに近年新たに同定された Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal)が挙げられる。Ngal は好中球分泌顆粒に含まれ、細菌由来の siderophore と結合することで細菌の鉄利用を阻害し、細菌感染に対して防御的に作用することが知られている。さらに Ngal の発現は好中球のみならず、気管、消化管などにおいてグラム陰性桿菌の菌体成分である LPS や炎症性サイトカインにより誘導されること、また活動期 IBD 患者の血清中および便で高値を示すことが報告されている。以上のことから、細菌の鉄獲得能に影響を与える宿主の Ngal は感染防御のみならず、腸管局所での腸内細菌への影響を介して IBD の病態に関与する可能性が考えられるが、これらの点については未だ検討されていない。

2. 研究の目的

宿主の鉄代謝関連分子 Ngal が腸内細菌叢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)慢性腸炎の進展に伴う Ngal の経時的発現についての検討

腸内細菌の存在下で慢性腸炎を自然発症する IL-10 ノックアウト(IL-10KO)マウスおよび野生型マウスを用いて、腸管組織および糞便中の Ngal の発現を免疫染色、real-time PCR および ELISA にて検討した。また Ngal 発現を誘導する因子についても検討した。

(2)Ngal の IBD 病態への関与とそのメカニズムについての検討

IL-10KO マウスおよび IL-10/Ngal ダブルノックアウト(IL-10/Ngal DKO)マウスを用いて、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)の発現を経時的に比較検討した。また盲腸内容物を用いて腸内細菌叢の変化を T-RFLP 法にて検討した。さらに、IL-10KO マウスおよび IL-10/Ngal DKO から採取した腹腔内由来マクロファージを用いて Gentamycin protection assay を行い、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。

4. 研究成果

(1)慢性腸炎の進展に伴う Ngal の経時的発現と腸内細菌への影響

野生型マウスと比較して、IL-10KO マウスの腸管組織における Ngal の遺伝子発現は有意に増強し、かつ腸炎の進展とともに経時的に増加した。また IL-10KO マウスの糞便中 Ngal 濃度は経時的に増加し、Histologic score と有意な正の相関を示した。また免疫染色による検討では IL-10KO マウスの大腸組織における Ngal の発現は主として腸管上皮細胞であった。さらにマウス腸管上皮細胞株(CT26)を用いた検討では IL-1 β 、IL-17、TLR4 ligand による刺激で CT26 細胞からの Ngal 産生が有意に増強した。さらに IL-1 β や IL-17 に対する中和抗体および TLR4/

IL-10 double KO マウスを用いた検討にて、これらの因子による Ngal 発現誘導効果を in vivo でも確認した。

(2) Ngal の IBD 病態への関与とそのメカニズムについての検討

IL-10KO マウスと比較し、IL-10/Ngal DKO では生後早期(4週齢)から組織学的炎症は著明に増悪し、各種炎症性サイトカイン産生の有意な増加を認めた。また生後3週齢の盲腸内の腸内細菌叢を検討したが、両群間に有意差を認めなかった。さらに IL-10KO マウスおよびIL-10/Ngal DKO から採取した腹腔内由来マクロファージを用いて in vitro で検討した。IL-10KO 由来マクロファージと比較し、IL-10/Ngal DKO 由来マクロファージでは貪食された細菌の殺菌処理能が低下し、マクロファージからの炎症性サイトカイン分泌も有意に増加した。加えて IL-10/Ngal DKO 由来マクロファージでは LC- / 比の低下を認め、細胞内でのオートファジーの障害が関与している可能性が示唆された。

以上より、Ngal はマクロファージ内に貪食された細菌のクリアランスを促進することにより IBD の病態に関与する可能性が示唆された。

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8件:すべて査読あり)

Toyonaga T, Matsuura M, Mori K, Honzawa Y, Minami N, Yamada S, Kobayashi T, Hibi T, Nakase H. Lipocalin 2 prevents intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages. *Sci Rep*. 2016 Oct 13;6:35014. doi:10.1038/srep35014.

Minami N, Yoshino T, Matsuura M, Koshikawa Y, Yamada S, Toyonaga T,

Madian A, Honzawa Y, Nakase H. Tacrolimus or infliximab for severe ulcerative colitis: short-term and long-term data from a retrospective observational study. *BMJ Open Gastroenterol*. 2015;2:e000021. doi: 10.1136/bmjgast-2014-000021.

Toyonaga T, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Yoshino T, Honzawa Y, Itou A, Namba K, Minami N, Yamada S, Koshikawa Y, Uede T, Chiba T, Okazaki K. Osteopontin deficiency accelerates spontaneous colitis in mice with disrupted gut microbiota and macrophage phagocytic activity. *PLoS One*. 2015;10:e0135552. doi:10.1371/journal.pone.0135552.

Yoshino T, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Honzawa Y, Kimura M, Koshikawa Y, Madian A, Toyonaga T, Nakase H. Efficacy of thiopurines in biologic-naïve Japanese patients with Crohn's disease: a single-center experience. *Intest Res*. 2015;13:266-73. doi:10.5217/ir.2015.13.3.266.

Yamada S, Yoshino T, Matsuura M, Kimura M, Koshikawa Y, Minami N, Toyonaga T, Honzawa Y, Nakase H. Efficacy and safety of long-term thiopurine maintenance treatment in Japanese patients with ulcerative colitis. *Intest Res*. 2015;13:250-8. doi: 10.5217/ir.2015.13.3.250.

Hiejima E, Kawai T, Nakase H, Tsuruyama T, Morimoto T, Yasumi T, Taga T, Kanegane H, Hori M, Ohmori K, Higuchi T, Matsuura M, Yoshino T, Ikeuchi H, Kawada K, Sakai Y, Kitazume MT, Hisamatsu T, Chiba T, Nishikomori R, Heike T. Reduced numbers and proapoptotic features of mucosal-associated invariant T cells as a characteristic finding in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:1529-40.

doi: 10.1097/MIB.0000000000000397.
Nakase H, Honzawa Y, Toyonaga T, Yamada S, Minami N, Yoshino T, Matsuura M.
Diagnosis and treatment of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: importance of controlling mucosal inflammation to prevent cytomegalovirus reactivation. *Intest Res*. 2014;12:5-11.
doi:10.5217/ir.2014.12. 1.5.
Nakase H, Yoshino T, Matsuura M. Role in calcineurin inhibitors for inflammatory bowel disease in the biologics era: when and how to use. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20: 2151-6.
doi: 10.1097/MIB.0000000000000130.

[学会発表](計 10 件 : すべて査読あり)

1) 海外学会

Toyonaga T, Matsuura M, Nakase H, Mori K, Kobayashi T, Hibi T. Lipocalin2 affecting bacterial clearance in activated macrophages contributes to the onset of intestinal inflammation. *APDW 2016*, Kobe, 2016.11.3
Matsuura M, Nakase H, Honzawa Y, Shuji Y, Seno H. Treatment of ulcerative colitis with CMV infection -Optimal control of mucosal inflammation and a limited role of antiviral therapy-. *AOCC*, Kyoto, 2016.7.9
Bamba S, Matsuura M, Kawamura T, Takagi T, Katsushima S, Obata H, Kusaka T, Naito Y, Andoh A, Nakase H, Kogawa T. Long-term efficacy and safety of thiopurines in patients with biologic-naïve ulcerative colitis: A multicenter cohort study. *DDW 2016*, San Diego, 2016.5.23
Koshikawa Y, Nakase H, Minami N, Yamada S, Toyonaga T, Honzawa Y,

Matsuura M, Chiba T. The characteristics and clinical outcomes of ulcerative colitis patients with concomitant cytomegalovirus infection. *DDW 2015*, Washington, 2015.5.16
Toyonaga T, Nakase H, Koshikawa Y, Yamada S, Minami N, Honzawa Y, Yoshino T, Matsuura M, Okazaki K, Chiba T. Lipocalin2 affecting bacterial clearance in activated macrophages contributes the onset of intestinal inflammation. *CCFA*, Orlando, 2014.12.5

2) 国内学会

松浦稔. クローン病における生物学的製剤二次無効の現状とその対策 . 第 7 回日本炎症性腸疾患学会学術集会 , 京都 , 2016.7.20
松浦稔, 馬場重樹, 粉川文隆 . 潰瘍性大腸炎に対するチオプリン製剤の長期寛解維持効果 - 京滋多施設共同研究からの報告 - 第 102 回日本消化器病学会総会 , 東京 , 2016.4.22
松浦稔, 南尚希, 仲瀬裕志 . 手術回避効果からみた重症潰瘍性大腸炎に対する Infliximab および Tacrolimus の治療適正化 第 102 回日本消化器病学会総会 , 東京 , 2016.4.21
豊永貴彦, 仲瀬裕志, 松浦稔, 小林拓, 日比紀文 . Lipocalin2 の欠損はマクロファージ細胞内での殺菌処理能力低下を伴い腸炎を増悪させる . 第 52 回日本消化器免疫学会総会 , 東京 , 2015.7.31
豊永貴彦, 松浦稔, 仲瀬裕志 . Lipocalin2 欠損はマクロファージ内での bacteria clearance 低下を介して腸炎を増悪させる . 第 101 回日本消化器病学会総会 , 仙台 , 2015.4.25

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

(4)研究協力者

豊永貴彦 (TOYONAGA, Takahiko)

関西医科大学・内科学第三講座・大学院生

本澤有介 (HONZAWA, Yusuke)

京都大学・大学院医学研究科消化器内科学・

大学院生

南尚希 (MINAMI, Naoki)

京都大学・大学院医学研究科消化器内科学・

大学院生

山田聡 (YAMADA, Satoshi)

京都大学・大学院医学研究科消化器内科学・

大学院生

越川頼光 (KOSHIKAWA, Yorimitsu)

京都大学・大学院医学研究科消化器内科学・

大学院生