

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21178

研究課題名(和文) 腸粘膜のバリア破綻が誘発する全身疾患発症モデルの作製とその診断法確立への応用

研究課題名(英文) Establishment of diagnostic method for leaky gut syndrome using mice model.

研究代表者

白田 春樹 (Usuda, Haruki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：30707667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸粘膜バリアの慢性的な低下(leaky gut syndrome: LGS)は全身疾患の発症に深く関与することが示唆されている。しかし、ヒトに使用可能で適切にLGSを評価する方法は確立していない。本研究では、軽度、中等度、重度のLGSを呈するマウスモデルを確立し、これらを用いてLGSの新規診断指標(試薬K)を確立した。また、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)とクローン病を誘発したマウスでは、発症初期の段階でLGSが生じることが試薬Kによって判明した。特にクローン病の小腸ではLGS状態と炎症の両方に関連する内因子の発現が増加しており、LGSがクローン病の発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic disruption of gut mucosal barrier let harmful molecules being absorbed and likely to cause systemic diseases. This increased permeability of gut mucosa is called leaky gut syndrome (LGS). However, diagnostic methods for LGS have not been established yet. It is mainly due to lacking animal model of LGS. We succeeded to establish mild, moderate, severe LGS model using mice, then we found promising reagent (named "reagent K") for evaluating LGS with these models. Reagent K could detect LGS occurring in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and Crohn's diseases in mice at early stage of each disease. Especially, an intestinal mRNA, which closely involved both in inflammation and LGS, is upregulated in Crohn's disease model mice. It suggests that LGS are involved in pathogenic mechanism of Crohn's disease.

研究分野：腸粘膜透過性、アレルギー、口腔内細菌

キーワード：リーキーガットシンドローム 腸粘膜バリア 診断法 全身疾患

1. 研究開始当初の背景

腸粘膜から吸収される分子の大きさは通常 200 Da 程度であり、分子がそれよりも大きくなるにつれて腸粘膜を通過しにくくなる。この分子ふるいは外来異物に対するバリアとして機能しており、病原性微生物由来のリポポリサッカライド (LPS) あるいは食物抗原などの有害物質の吸収を防いでいる。したがって、腸粘膜のバリア機能が破綻すると、通常腸粘膜を透過しない大きさの有害物質が吸収されて全身循環にのり、腸管局所のみならず全身的な障害をもたらす可能性がある。実際に、気管支喘息や I 型糖尿病の患者では、腸粘膜の透過性が亢進することが報告されている (Arch Dis Child. 2004, Diabetologia. 2006)。また、3 歳未満の小児では腸粘膜のバリア機能が未発達で、未消化な食物由来のタンパク質が腸管を透過して全身循環に移行し、それが抗原として認識されることで食物アレルギーを発症する可能性が考えられている。こうした慢性的な腸管の透過性亢進は leaky gut syndrome (LGS) と呼ばれており、すでに欧米では種々の疾患を起こしうるリスクが高い疾患予備状態として認知されつつある。しかしながら、LGS に特徴的な症状や、LGS の程度と相関するヒトでの検査値の変動が不明であるため、明確な診断基準は確立されておらず、現状では LGS の治療法の探索をはじめとする臨床研究や疫学調査を進めることすら困難な状態である。その一因として、①適切な LGS の動物モデルが未だに確立されていない、②ヒトに適用可能な LGS の適切な評価指標がないために、LGS 研究についての足掛かりとなる知見を得る手だてがないことが挙げられる。そこで本研究では LGS モデルマウスを作製し、それを用いて LGS の発症機序の解明と診断指標の開発、ならびに全身疾患の発症における LGS の関与について検討することとした。LGS モデルの確立とその発生機序の一端が明らかになれば、将来的な治療標的の探索も可能になると思われる。

2. 研究の目的

以下の 3 点を明らかにすることを目的に検討を行った。

1. LGS の発症条件 (モデルマウス作製)

マウスに腸粘膜バリアを破綻させる負荷をかけ、軽度、中等度、重度の LGS を引き起こす条件について明らかにする。

2. LGS を診断しうる指標の確立

現在、ヒトでの暫定的な LGS の評価方法はラクツロース/マンニトール試験 (L/M 試験) だけであり、これが golden standard である。しかし、ラクツロースは小分子 (分子量 342) であるため、LPS をはじめとする大きな分子の漏出を判定するには無理がある。動物実験では FITC-dextran (平均分子量 4000) が用

いられているが、安全性の面からヒトに投与不可能であり、患者での腸粘膜バリア機能を本当に反映するのか確認できない。そこで本研究では、これらの問題を解消できる、ある試薬 (試薬 K) を新規指標候補として用いることを発案し、その有用性を検討することとした。試薬 K は健康食品として服用されている糖の重合体で、分子量を変化させることができ、腸内細菌や生体内酵素で消化・分解されない特性を有している。この試薬 K を、①で確立した軽度、中等度、重度の LGS モデルマウスに投与し、試薬 K が LGS 状態を適切に判定できるかを評価し、指標の確立を目指す。

3. 全身疾患の発症における LGS の関連性の解明

試薬 K を指標として種々の全身疾患の発症に LGS がどのように関わるかを検討し、両者の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LGS の発症条件 (モデルマウス作製)

以下に示す 3 つの条件を検討した。

・NSAIDs+PPI の投与

C57BL/6J マウスに aspirin (100 mg/kg p.o) と omeprazole (10 mg/kg i.p) を 1 日 2 回、6 日間投与し、20 時間の絶食、絶水後に LGS 状態の評価を行った。

・ニワトリ卵白アルブミン (OVA) による食物アレルギーの誘発

Balb/c マウスに OVA 水酸化アルミニウムゲル (Alum) を腹腔内投与して感作し、感作成立後に隔日で OVA (10 mg) を 4 回経口投与し、さらにその 1 週間後に高容量の OVA (50 mg) を LGS 評価試薬とともに経口投与して食物アレルギー症状を惹起させた。なお、最後の OVA 投与の前日から 20 時間の絶食、絶水後させ、LGS 状態の評価を行った。

・小腸血流の遮断/再灌流

20 時間の絶食、絶水後を行った C57BL/6J マウスに LGS 評価試薬を経口投与する。30 分後に麻酔下で開腹し、クリップを用いて小腸に流れ込む血流を一定時間遮断し、その後再灌流させた。

(2) LGS 状態の評価

L/M 試験、FITC-dextran、試薬 K によって評価を行った。L/M 試験はラクツロース、マンニトールを経口投与し、4 時間後に尿中濃度を LC/MS にて測定し、比率を計算した。FITC-dextran と試薬 K についてはそれぞれ経口投与 1 時間後に血中濃度を測定した。なお、L/M 試験は投与から測定までに時間がかかることから、虚血再灌流ではプロトコル上適用できないため、行わなかった。また、小腸組織を HE 染色して病理組織像を観察した。

(3) 試薬 K を用いた大腸における LGS 状態の評価

C57BL/6J マウスに 2.5% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 水溶液を 72 時間自由飲水させて大腸炎 (軽度) を誘発させ、FITC-dextran、試薬 K を経口投与して 4 時間後に血中濃度を測定した。また、これらの評価試薬を肛門から大腸に直接注入し、1 時間後に血中濃度の測定を行った。なお、L/M 試験は評価試薬が盲腸で分解するため、行わなかった。また、組織を HE 染色して病理組織像を観察した。

(4) 全身疾患モデルにおける解析

・ NASH モデル

NASH 誘発食 (高脂肪、高コレステロール食: D09100301) を自由に摂取させ、5 週間後に試薬 K 投与 1 時間後に試薬の血中濃度を測定した。また、小腸と肝臓を HE 染色して病理組織像を観察した。

・ クローン病モデル

クローン病自然発症マウス (SAMP マウス) のリンパ節より T 細胞を採取し、これを SCID マウスの腹腔内に投与して小腸の炎症を誘発した。病態が形成されるまでに 8 週間ほどかかることから、試薬 K の吸収量を 2 週間ごとに測定した。測定はそれぞれ試薬 K 投与 1 時間後に行った。試薬 K の吸収量が増大し始めるタイミングで小腸組織を採取し、HE 染色による病理組織像の評価とマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

1. LGS モデルマウスの作成

小腸からの FITC-dextran の吸収は ischemia 群で顕著に認められた。これと比較して食物アレルギー群では吸収量はわずかであり、NSAIDs+PPI 投与群ではまったく吸収されなかった。一方、L/M 比はアレルギー群と NSAIDs + PPI 投与群の両群で増加し、増加率は、食物アレルギー群のほうがやや大きかった。また、評価試薬の吸収が増大するにつれて、病理組織像における小腸粘膜のダメージが大きくなった。したがって、各条件が誘発する LGS の程度は NSAIDs+PPI < OVA 誘発食物アレルギー < 腸血流 ischemia となり、それぞれ軽度、中等度、重度の LGS モデルとして確立することができた。(右上図参照)

2. LGS を診断する新規指標 (試薬 K) の確立と有用性の検証

確立した 3 つの LGS モデルに試薬 K を投与したところ、ischemia 群では顕著な吸収が認められた。食物アレルギー群では有意な吸収増加が認められたが、その程度はわずかであった。NSAIDs + PPI 投与群ではまったく吸収されなかった。以上のこと試薬 K の吸収量は LGS の重症度が高くなるにつれて増大することから、試薬 K は LGS の評価指標として有用

であることが示された。(右上図)

また、DSS による大腸炎モデルに試薬 K を投与したところ、病理組織像の変化が認められなかったにもかかわらず、経口投与と注腸の両条件において大腸からの吸収増大が認められた。その程度は同じ条件で FITC-dextran 投与した場合と同等であった。したがって、試薬 K は大腸の LGS 状態を大腸のダメージが生じ始める早期の段階で評価できることが示された。(下図参照)

3. 全身疾患の発症における LGS の関連性の解明

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) とクローン病モデルマウスを用いて、各疾患の病態形成と腸粘膜バリアの破綻との関連性を検討した。その結果、いずれのモデルにおいても症状 (NASH: 肝臓の炎症、クローン病: 小腸の病変や下痢) が生じ始める前の段階で小腸から吸収される試薬 K の量が増大した。また、クローン病モデルでは症状の発現に伴って試薬 K の吸収が増大し、吸収増大が起き始める段階で小腸内の種々の内因性因子が増加していることが示された。このことから、腸粘膜バリアの破綻がクローン病の発症に関与する可能性が示唆された。

評価試薬の 漏出量    少量 大量	小腸・大腸の粘膜バリア破綻条件			
	小腸			大腸
	軽度	中等度	重度	
	NSAIDs	食物アレルギー	虚血再灌流	DSS
L/M 試験 (MW 342)	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
FITC-dextran (MW 4000)	漏出なし	↑	↑↑↑	↑
試薬 K (MW 1000)	漏出なし	↑	↑↑↑	↑

図 研究成果まとめ

4. 総括

本研究の結果から、LGS は薬剤、食物抗原、小腸の虚血、大腸炎が原因となって生じ、原因によって誘発される LGS の程度がかなり異なることが示唆された。また、LGS の新規診断指標として確立した試薬 K は①軽度から重度までの LGS を広く評価できる②小腸だけでなく大腸の LGS 状態が評価できる③内視鏡では検出が難しい微視的な粘膜の障害に起因する LGS 状態を評価することができる。という点において LGS の指標として極めて有用であることが示された。特にヒトに適用可能な大腸の評価指標はこれまでに開発されておらず、画期的な成果であると思われる。さらに、試薬 K によって LGS が全身疾患の発症過程に関与する可能性が高いことが推察された。したがって、今後のさらなる検討によって両者の因果関係や LGS が生じるメカニズムを明らかにしていくことが重要である。それによって全身疾患の新たな治療標的や予知予防に資する知見が提供できると思われる。

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4件)

1. Kessoku T, Imajo K, Kobayashi T, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Higurashi T, Yoneda M, Kirikoshi H, Kubota K, Taguri M, Yamanaka T, Usuda H, Wada K, Saito S, Nakajima A.

Efficacy, safety, and tolerability of lubiprostone for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adult patients with constipation.

Contemporary clinical trials, 69, 40-47, 2018

doi.org/10.1016/j.cct.2018.04.002.

査読あり

2. Kato T, Honda Y, Kurita Y, Iwasaki A, Sato T, Kessoku T, Uchiyama S, Ogawa Y, Ohkubo H, Higurashi T, Yamanaka T, Usuda H, Wada K, Nakajima A.

Lubiprostone improves intestinal permeability in humans, a novel therapy for the leaky gut: A prospective randomized pilot study in healthy volunteers.

PLoS One, 12, e0175626, 2018

doi.org/10.1371/journal.pone.0175626

査読あり

〔学会発表〕(計5件)

1. 結束貴臣、今城健人、本多靖、小川祐二、留野渉、米田正人、嶋川真木、田中良紀、川原知浩、斉藤聡、臼田春樹、和田孝一郎、中島淳

非アルコール性脂肪肝疾患における腸内細菌叢と腸内代謝産物の役割ー肝病態進展と肝外合併症発祥のメカニズムー

第1回消化器臓器間ネットワーク研究会(東京, 2017年4月)

2. 結束貴臣、今健人、本田靖、小川祐二、留野渉、米田正人、斉藤聡、臼田春樹、和田孝一郎、中島敦

Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease.

第90回日本薬理学会年会 シンポジウム(長崎, 2017年3月)

3. 結束貴臣、今健人、本田靖、加藤孝征、小川祐二、留野渉、嶋川真木、田中良紀、及川洋祐、大野裕史、臼田春樹、日暮琢磨、遠藤宏樹、米田正人、斉藤聡、和田孝一郎、中島敦

腸管透過性を介した非アルコール性脂肪肝炎の病態進展における腸内細菌叢とエンドトキシンの関連性の検討

第53回日本消化器免疫学会総会(大阪, 2016年3月)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 腸粘膜の透過性の診断薬, 診断方法, 診断装置

発明者: 和田孝一郎、臼田春樹、中村守彦、高森吉守、黒住誠司

権利者: 島根大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-007130

出願年月日: 2017年

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼田 春樹 (USUDA HARUKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 30707667

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

和田 孝一郎 (WADA KOICHIRO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 90263467

岡本 貴行 (OKAMOTO TAKAYUKI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号: 30378286

田中 徹也 (TANAKA TETSUYA)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 10346380

新林 友美 (NIIBAYASHI TOMOMI)

島根大学・医学部・技術職員

研究者番号: 50529675