

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04811

研究課題名(和文) 遺伝子操作マウスとPG質量分析を用いた難治性小腸潰瘍症の病態解明と治療法探索

研究課題名(英文) Elucidation of the pathology and treatment of refractory small intestinal ulcer disease using genetically engineered mouse and PG mass spectrometry

研究代表者

久松 理一 (HISAMATSU, TADAKAZU)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60255437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：CEAS患者の診断についてはSLC02A1蛋白の蛍光免疫染色法による簡易診断技術を確立した。患者に認められるSLC02A1変異蛋白の機能解析についてはアフリカツメガエル卵母細胞による遺伝子導入系を立ち上げPGの輸送実験の行った結果、完全に機能喪失する変異と部分的にしか機能低下を認めない変異が存在することが明らかとなった。さらに女性ホルモンがPG輸送能に影響を及ぼすことが示された。血管内皮特異的SLC02A1欠損マウスを樹立するとともに、マウス小腸におけるPG代謝解析系の質量分析法を確立した。これにより遺伝子改変マウスをはじめとした各小腸潰瘍モデルにおけるPG代謝変化が観察可能になった。

研究成果の概要(英文)：For the diagnosis of a patient with a CEAS patient, a simple diagnostic technique by SLC02A1 protein fluorescent immunostaining method was established. For functional analysis of SLC02A1 mutant protein found in patients, a gene transfer system by *Xenopus* oocytes was set up and as a result of the transport experiment of PG, Mutations that completely lost function and mutations that only partially declined in function were observed. Furthermore, it was shown that female sex hormone influences PG transporting ability. We established vascular endothelial specific SLC02A1 deficient mice and established a mass spectrometry method of PG metabolism analysis system in mouse small intestine. As a result, changes in PG metabolism in each small intestinal ulcer model including genetically modified mice could be observed.

研究分野：下部消化管 小腸潰瘍

キーワード：小腸潰瘍 プロスタグランジン SLC02A1 CEAS

1. 研究開始当初の背景

非特異性多発性小腸潰瘍症は低栄養、貧血をきたす慢性疾患で希少難病に指定され治療法は確立していない。申請者を含めた多施設共同研究グループが本疾患はプロスタグランジン E (PGE) の輸送蛋白をコードする human solute carrier organic anion transporter family, member 2A1 (SLCO2A1) 遺伝子の変異が原因であることを突き止め、新たな疾患概念として SLCO2A1 関連腸症 (chronic enteropathy associated with SLCO2A1; CEAS) が提唱された (Umeno J, Hisamatsu T, et al. PLoS Genet 2015). SLCO2A1 遺伝子は希少難病である肥厚性皮膚骨膜症 (pachydermoperiostosis; PDP) (J Dermatol Sci. 2012) の原因遺伝子としても同定されている。しかし両疾患ともに発症メカニズムは解明されておらず、SLCO2A 分子機能解析を含めた病態解明は治療薬開発に必須である。本研究では CEAS 病態メカニズムの本質に迫り新たな治療標的探索につなげることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は SLCO2A1 蛋白の機能解析と小腸組織内における PG 代謝を明らかにすることによって CEAS の病態を解明し治療薬開発につなげることである。

3. 研究の方法

(1)CEAS 補助診断法としての小腸組織 SLCO2A1 免疫染色法の確立。CEAS の診断は内視鏡や X 線写真による特徴的な形態と典型的な臨床像によってなされる (Hosoe N, Hisamatsu T, et al. J Crohns Colitis. 2017)。しかしながら既報にあるようにクローン病と診断された患者群の中に CEAS 患者が混在している可能性がある (Umeno J, Hisamatsu T, Matsumoto T, et al. PLoS Genet 2015)。我々の研究から最も頻度の高い c.940+1G>A 変異 (exon7 以下が欠失する) では C 末端側のペプチドを認識する抗 SLCO2A1 抗体による免疫組織化学が鑑別診断に有用であることが示唆されている。アミノ酸変異をもたらす一塩基置換を含めた他の変異型においても一部を除けば免疫組織化学が鑑別診断に有用である可能性がある。

(2)血管内皮特異的 SLCO2A1 欠損マウスを用いた病態解明

Cre-loxp システムを用いて血管内皮特異的 SLCO2A1 欠損マウスを作成した (図 2)。本マウスは通常飼育下では表現型は示さないことがわかっている。本マウスにインドメタシン誘発性小腸潰瘍を引き起こし感受性や重症度を検討する。さらに後述する質量分析法により小腸粘膜における PG とその代謝物

を網羅的に解析し野生型マウスのそれと比較する。の分化への影響を把握する

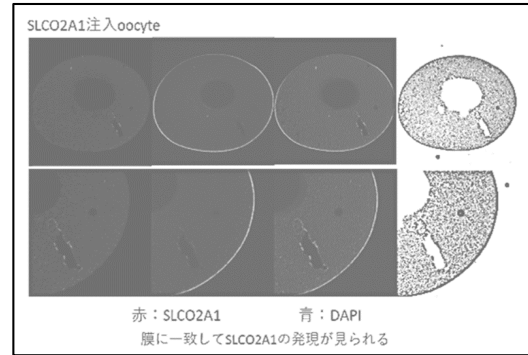


図 3 SLCO2A1 の免疫染色 (アフリカツメガエル卵母細胞)

(3)アフリカツメガエル卵母細胞を用いた SLCO2A1 蛋白のトランスポーター機能の解析。SLCO2A1 蛋白の PG トランスポーターの機能解析を目的としてアフリカツメガエル卵母細胞への SLCO2A1 発現系を確立した (図 3, 4)。

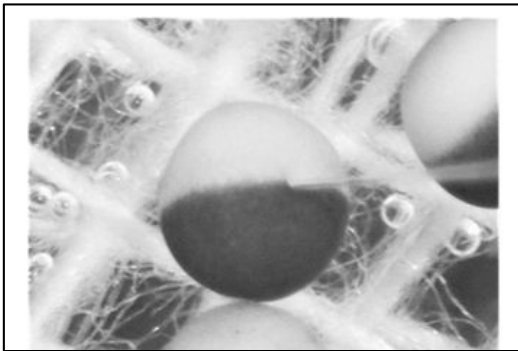


図 4 卵母細胞への cRNA 注入

4. 研究成果

(1)我々の研究により最も頻度の高い c.940+1G>A 変異 (exon7 以下が欠失する) では C 末端側のペプチドを認識する抗 SLCO2A1 抗体による免疫組織化学が鑑別診断に有用であることが明らかとなった。アミノ酸変異をもたらす一塩基置換を含めた他の変異型においても一部を除けば免疫組織化学が鑑別診断に有用である可能性がされた (図 5)。当施設ではすでに倫理委員会の承認を得て他の医療機関からの組織染色依頼を受諾している。集積した症例のゲノム解析の結果と免疫組織化学の結果を解析することで各変異型における免疫組織化学の有用性を確立した。

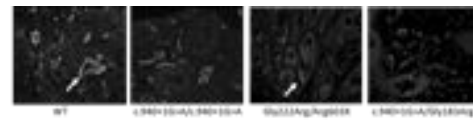


図 5 小腸粘膜生検組織を用いた抗 SLCO2A1 抗体蛍光免疫染色による CEAS 診断

(2) PG などの脂質メディエーターの質量分析はその安定性などの点から困難とされていたが、研究分担者杉浦（慶應義塾大学医学部医化学）らは脂質メディエーター関連物質の網羅的解析方法を確立した。まず我々は PG が関与するインドメタシン誘発小腸潰瘍において脂質メディエーターの変動解析を行い、その測定に成功した。インドメタシン誘発小腸潰瘍においては PG の低下だけでなくロイコトリエン (LT) の上昇が病態形成に関与している可能性が示唆された。さらに免疫不全マウスである NOG マウスでは小腸潰瘍は誘発されず免疫系の関与が示唆された（未発表データ）。現在、野生型マウスと SLC02A1 欠損マウスにおいてインドメタシンに対する感受性を含めて検討中である。

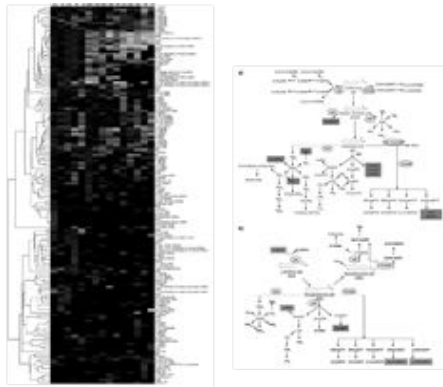


図 6 質量分析を用いたマウス小腸潰瘍モデルでの脂質メディエーターの網羅的解析

(3) SLC02A1 (野生型・変異型) を強制発現させ、放射性同位元素でラベルした基質 (PG 等) の取り込みを行った。患者に認められる変異型の中にも完全に機能が喪失するもの、部分的にしか機能低下しないものが存在した。これは臨床表現型や症状の重症度に影響する

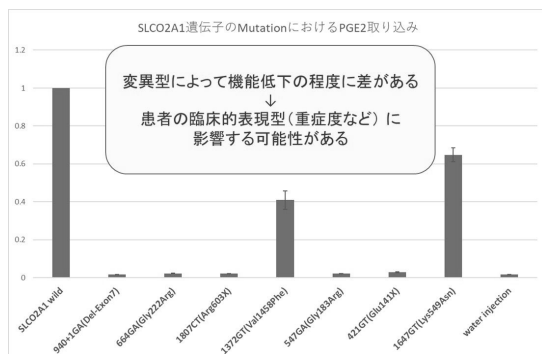


図 7 各変異型における PGE 輸送能可能性があり今後検討していく予定である。また同じ SLC02A1 遺伝子異常とされる CEAS や PDP において発現フェノタイプが性別により異なっていることから性ホルモンによる輸送動態の変化が生じている可能性がある。すでに予備検討として女性ホルモンの一部が PG 輸送を亢進させる可能性が示唆された。

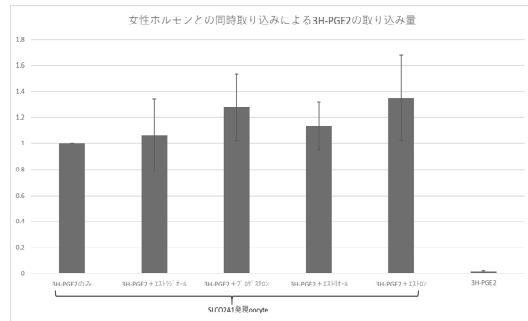


図 8 SLC02A1 の PGE 輸送における女性ホルモンの影響

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)

Umeno J, Esaki M, Hirano A, Fuyuno Y, Ohmiya N, Yasukawa S, Hirai F, Kochi S, Kurahara K, Yanai S, Uchida K, Hosomi S, Watanabe K, Hosoe N, Ogata H, Hisamatsu T, Nagayama M, Yamamoto H, Abukawa D, Kakuta F, Onodera K, Matsui T, Hibi T, Yao T, Kitazono T, Matsumoto T; CEAS study group. Clinical features of chronic enteropathy associated with SLC02A1 gene: a new entity clinically distinct from Crohn's disease. J Gastroenterol. 2018 Jan 8. doi: 10.1007/s00535-017-1426-y. (査読有)

Hosoe N, Ohmiya N, Hirai F, Umeno J, Esaki M, Yamagami H, Onodera K, Bamba S, Imaeda H, Yanai S, Hisamatsu T, Ogata H, Matsumoto T; CEAS atlas group. Chronic enteropathy associated with SLC02A1 gene (CEAS) - Characterization of an enteric disorder to be considered in the differential diagnosis of Crohn's disease. J Crohns Colitis. 2017 Oct 1;11(10):1277-1281. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx068. (査読有)

小林 拓, 梅野淳嗣, 久松理一, 江崎幹宏, 松井敏幸, 松本主之, 日比紀文 非特異性多発性小腸潰瘍症の難病指定と SLC02A1 関連小腸症. 日本消化器病学会雑誌 113(8): 1380 -1385 2016 (査読有)

Umeno J, Hisamatsu T, Esaki M, Atsushi Hirano A, Kubokura N, Asano K, Kochi S, Yanai S, Fuyuno Y, Shimamura K, Hosoe N, Ogata H, Watanabe T, Aoyagi K, Ooi H, Watanabe K, Yasukawa S, Hirai F, Matsui T, Iida M, Yao T, Hibi T, Kosaki K, Kanai T, Kitazono T, Matsumoto T. A Hereditary Enteropathy Caused by Mutations in the SLC02A1 Gene, Encoding a Prostaglandin Transporter.

PLoS Genetics 2015 Nov
5;11(11):e1005581. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

Hisamatsu T, Umeno J, Matsumoto T.
Identification of a novel disease entity,
chronic enteropathy associated with
SLC02A1 (CEAS)
The 10th International Gastrointestinal
Consensus Symposium
Feb 17, 2017. Nagoya, Japan

久松理一

特別講演 非特異性多発性小腸潰瘍症の原
因遺伝子同定から学んだこと
若手消化器内科 Dr.へのメッセージ
日本消化器病学会関東支部 第 341 回例会
2016 年 9 月 24 日 海運クラブ

〔図書〕(計 2 件)

久松理一, 關 里和
『非特異性多発性小腸潰瘍症/CEAS- 遺伝子
異常と類縁疾患』主題研究 1 . SLC02A1 の機
能とその異常. 胃と腸 2017 52 巻 第 11 号
p1453-1457 医学書院

梅野淳嗣, **久松理一**, 江崎幹宏, 平野敦士,
松本主之 TOPICS プロスタグランジン輸送体
をコードする SLC02A1 遺伝子の変異を原因と
する遺伝性腸症-非特異性多発性小腸潰瘍症
INTESTINE 2016 Vol.20 No.5 p500-503 株式
会社日本メディカルセンター

〔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

久松 理一 (HISAMATSU, Tadakazu)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号: 60255437

(2) 研究分担者

金井 隆典 (KANAI Takanori)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40245478

杉浦 悠毅 (SUGIURA Yuuki)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 30590202

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()