

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19868

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎術後の回腸嚢炎における内因性抗菌タンパクの病態関与と治療応用の研究

研究課題名(英文) Assessment of the relationship between pouchitis and internal antimicrobial protein after surgery in ulcerative colitis

研究代表者

渡辺 和宏 (WATANABE, KAZUHIRO)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30569588

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)：大腸全摘・回腸嚢肛門吻合術(IPAA)は潰瘍性大腸炎(UC)および家族性大腸腺腫症(FAP)に対する標準術式であるが、特にUCでは回腸嚢炎を合併することがある。本研究は「回腸嚢炎は、術後の回腸嚢の大腸化に伴うUCの再燃であり、内因性抗菌ペプチドが発症に関与している」とする仮説に基づき、UCで発現が低下する大腸上皮タンパクRELM /FIZZ2(resistin-like molecule beta/Found in inflammatory zone-2)の抗菌作用の検討および発現誘導因子の検討を行った。また、UCまたはFAP術後症例を対象に、回腸嚢粘膜・糞便を採取して経時的变化を観察した。

研究成果の概要(英文)：Total colectomy with ileal pouch-anal anastomosis (IPAA) is a standard surgical procedure for ulcerative colitis (UC) and familial adenomatous polyposis (FAP). Pouchitis is a major complication after IPAA in patient with UC, which pathogenesis is unknown. RELM /FIZZ2 (resistin-like molecule beta/Found in inflammatory zone-2) is a colonic epithelial protein which expression decreases in patients with UC in our past study. This study aims to evaluate (1) the antimicrobial activity of RELM /FIZZ2, (2) the factors which modulate RELM /FIZZ2 expression, and (3) the expression of RNA and/or antimicrobial protein in ileal pouch and stool after IPAA.

研究分野：外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 家族性大腸腺腫症 回腸嚢炎 抗菌タンパク

1. 研究開始当初の背景

大腸全摘・回腸囊肛門吻合術 (Ileal-pouch Anal Anastomosis;以下、IPAA) は、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis;以下、UC) および家族性大腸腺腫症 (Familial adenomatous polyposis ; 以下、FAP) に対する現在の標準的根治術式である。通常、UC や FAP では回腸に病変は認めないが、UC の IPAA 術後には、回腸囊炎 (回腸粘膜の炎症) が 20~50% と高頻度におきることが知られている。一方、FAP の IPAA 術後では回腸囊炎の発症は極めて稀である。このことから、回腸囊炎は UC に特徴的な素因・病態を背景に顕在化する現象と考えられた。回腸囊炎の治療は抗菌剤の内服が著効することがほとんどであるが、抗菌剤の投与を終了すると再び回腸囊炎を発症することも多く実臨床での問題点となっている。抗菌剤が著効することから、回腸囊炎の発症には、回腸囊における腸内細菌が直接的または間接的に関与している可能性が示唆されている。

これまでの我々の研究成果として、炎症性腸疾患の病因/病態を明らかにすべく、無菌動物に常在腸内細菌叢を定着させる動物モデルを用いた研究、マイクロアレイ法による大腸上皮の発現遺伝子の網羅的解析、IPAA 術後の腸内細菌叢の経時的変化の研究、などを行ってきた。その結果、腸内細菌やその産物が粘膜に与える形態と遺伝子発現 (HIP/PAP, SAA, RELM など) の変化、およびそれらと炎症性腸疾患との関連を明らかにし、また IPAA 術後に回腸囊内の腸内細菌叢が経時的に“大腸化”すること、IPAA 術後の回腸囊粘膜の発現遺伝子が“大腸化”した発現パターンに変化することを報告してきた。また、大腸上皮のマイクロアレイ解析および無菌動物に常在腸内細菌叢を定着させる動物モデルを用いた研究の過程で、腸内細菌の暴露によって大腸上皮に強発現 (回腸上皮でも弱く発現) するシステインを多く含むタンパクである RELM /FIZZ2 (resistin-like molecule beta / Found in inflammatory zone-2) に着目し、機能を検討したところ、RELM /FIZZ2 が大腸上皮から分泌される新規の内因性抗菌タンパク (Antimicrobial protein/peptide;以下 AMP と略記) であることが示された。*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) や、耐性菌である methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) に抗菌活性を持つ一方で、*Escherichia coli* (*E. coli*) では抗菌活性を認めないなど、選択的な抗菌活性を有していた。これらのことから、「RELM /FIZZ2 は生体自身が産生する腸内細菌叢の調節因子である」という仮説が想起された。また、Western blot による半定量検討では、健康人の糞便中には抗菌活性を示すに十分な量の RELM /FIZZ2 が存在していた。非常に興味深いことに、UC の大腸粘膜における RELM /FIZZ2 の発現は、大腸粘膜の炎症の程度やステロイ

ドの投与の有無によらず著明に低下していた。

これらの検討から、「回腸囊炎とは、便貯留による腸内環境の変化が回腸粘膜の“大腸化”を促し、これに伴い UC と同様の発症機序により慢性粘膜炎症が顕在化した病態、すなわち回腸囊における UC の再発ではないか」と着想した。また、回腸囊炎では抗菌剤が著効すること、RELM /FIZZ2 の発現が UC で著明に低下していることから、RELM /FIZZ2 などの内因性 AMP が回腸囊炎や UC における大腸炎の発症機序に関与している可能性を想起した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) RELM /FIZZ2 の抗菌活性を確認すること、(2) IPAA 術後の回腸囊粘膜の変化を、AMP を中心に経時的に解明することである。回腸囊炎の発症経過と機序を明らかにし、さらには UC の病因解明の突破口を見つけようとするものである。

3. 研究の方法

(1) RELM /FIZZ2 の抗菌活性・発現調節因子に関する研究:

(1)- : 抗菌活性の検討

我々の今までの検討において、ヒト RELM /FIZZ2 は、*S. aureus*・MRSA に対して濃度依存性の抗菌作用を有する一方で、*E. coli* については抗菌活性を認めず、選択的な抗菌作用があることが示唆されている。より詳細な抗菌スペクトラムを確認するために、ヒト RELM /FIZZ2 のリコンビナントタンパクを用いて抗菌活性の検討を行う。検討予定の細菌としては、*S. aureus* (JCM2413), *E. coli* (JCM5491), *Campylobacter coli* (NCTC11366), *C. jejuni* (81116), *Bacteroides distasonis* (JCM5825T), *B. fragilis* (DSM2151T), *B. vulgatus* (ATCC8482T), *Clostridium cocleatum* (ATCC29901T), *C. clostridioforme* (ATCC29084T), *C. paraputrificum* (VPI6372 and VPI1534), *C. perfringens* (NAC521 and H3), *C. ramosum* (ATCC13937T) を候補とする。寒天培地法 (agar spot test) でスクリーニングした後、液体培地法 (liquid broth test) として、細菌 (1×10^5 CFU/mL) をヒト RELM /FIZZ2 (0-20 μ M) を含んだ液体培地で培養し、6 時間後に CFU を測定し抗菌活性を確認する ($n=5$)。また、ヒト RELM /FIZZ2 はジスルフィド結合によって六量体を形成するため、還元状態で単量体としたときの抗菌活性の変化を確認するために、培地の pH を 6.0、7.0、8.0 に設定して抗菌活性を確認する。Western blot によって、各 pH における RELM /FIZZ2 の重合体の状態を確認し、pH6.0 で単量体が得られていることを確認する。

(1)- : ヒト RELM /FIZZ2 発現誘導因子の検討

大腸上皮細胞株 (LST174T) に対して、細菌構成成分 (ペプチドグリカン、リポポリサッカライド、ムラミルジペプチド) を刺激投与し、ヒト RELM /FIZZ2 の経時的な発量の変化を Western blot 法、定量 RT-PCR 法にて確認する。

(2) UC、FAP に対する IPAA 術後サンプルを用いた検討

UC または FAP の診断で IPAA・一時的回腸瘻造設術を施行した症例を対象に、回腸囊閉鎖術直前、1 か月後、以後 3 か月毎に 2 年以内視鏡検査を行い、PDAI (Pouchitis disease activity index) による回腸囊炎の有無を評価する。同時に 6~8 カ所の粘膜を生検する。うち 1~2 個は H-E 染色および免疫染色による形態 / 蛋白発現の検討に用い、残りから RNA を抽出する。同時に糞便を採取する。これらのサンプルを用いて、ストマ閉鎖直前から 2 年後までの経時的な遺伝子発現の変化を real-time PCR 法にて検討する。RELM /FIZZ2 を含む AMP の遺伝子の発現、これまで回腸囊炎において発現が亢進するとされているサイトカイン、ケモカイン、細胞接着分子の発現、以前のマイクロアレイの検討によって得られた小腸の“大腸化”によって発現が増加する遺伝子の発現を測定する。これらの遺伝子発現の局在と変化を免疫染色法、in situ hybridization 法により確認する。また同時に得られた生検組織像と臨床症状により、回腸囊炎の有無を同定する。また、上述の糞便サンプルを用いて、RELM /FIZZ2 を含む AMP のタンパク発現の経時的な変化を、ELISA 法による定量または Western blot による半定量にて測定する。

4. 研究成果

(1) RELM /FIZZ2 の抗菌活性・発現調節因子に関する研究 :

(1)- : 抗菌活性の検討

購入した RELM /FIZZ2 のリコンビナントタンパクを用いて、上記の菌株に対して、寒天培地法・液体培地法によって抗菌活性作用の検討を行った。従来のわれわれの検討では、*S. aureus* に対して、RELM /FIZZ2 濃度依存性に抗菌活性を認めていたが、今回の検討ではいずれの菌株に対しても明らかな抗菌活性を認めなくなっていた。この原因として、RELM /FIZZ2 はジスルフィド結合によって 3 量体が 2 つ結合し 6 量体を形成する非常に特殊な構造をしており (文献 1 : Pastel et al, Science, 2004) 条件によって抗菌活性が大きく変化することが理由と考えられた。実際、従来の検討において、液体培地法では寒天培地法の 1/100 の低濃度で RELM /FIZZ2 の抗菌活性を認めており、抗菌活性を示す至適条件を検討することが必要と考えた。培地の pH を調整し pH6.0 の条件で RELM /FIZZ

が 6 量体から単量体に変化することを確認したのち、再度、pH6.0、7.0、8.0 の条件で液体培地法による抗菌活性作用の検討を行った。しかしながら、いずれの pH の条件でも再現性のある抗菌作用を得ることができなかった。

RELM /FIZZ2 に抗菌活性があるということが今回の研究の大前提であることから、従来の検討で得られていた RELM /FIZZ2 の抗菌活性を再確認することが最重要と考えた。抗菌活性が得られない原因として、購入した RELM /FIZZ2 の品質が影響している可能性を考えた。そこで、我々で RELM /FIZZ2 タンパクを作製することとした。RELM /FIZZ2 リコンビナントタンパクを、パキユロウイルスベクターを用いて作製している段階である。

以上のように、RELM /FIZZ2 の抗菌活性についての検討を行っていたが、2017 年 10 月になり、他施設から RELM /FIZZ2 に抗菌活性があるとの論文が出された (文献 2 : Propheter et al, PNAS, 2017)。RELM /FIZZ2 に抗菌活性があることは、今まで我々のみが発表しているのみであり、抗菌活性を再確認することが最重要と考えていたが、抗菌活性を示す菌株のデータが我々とは若干異なるものの、他施設からも発表になったことから、RELM /FIZZ2 の抗菌作用はより確実と考えられ、in vitro のみの検討から、臨床検体を用いた検討へと研究の重点を移していく予定である。

(1)- : ヒト RELM /FIZZ2 発現誘導因子の検討

大腸上皮細胞株 (LST174T) に対して、細菌構成成分 (ペプチドグリカン、リポポリサッカライド、ムラミルジペプチド) を刺激投与し RELM /FIZZ2 の発現量を検討した。定量 RT-PCR 法において、ペプチドグリカン刺激のみがヒト RELM /FIZZ2 の発現量を増加させた。リポポリサッカライドとムラミルジペプチドの刺激では発現量に変化を認めなかった。

ペプチドグリカンは、*S. aureus* などのグラム陽性球菌に存在している。ペプチドグリカン刺激で RELM /FIZZ2 の発現が増加することは、in vivo において、*S. aureus* が大腸上皮に暴露された際に、*S. aureus* に抗菌活性のある RELM /FIZZ2 の発現が増加することで、*S. aureus* の増加を制御する、といった新しい生体防御のシステムが想起された。

(2) UC、FAP に対する IPAA 術後サンプルを用いた検討

得られた臨床検体は、潰瘍性大腸炎 5 例、家族性大腸腺腫症 2 例と、当初の予測よりも少ない症例数であった。経時変化を追っていたが、回腸囊炎・回腸囊腺腫症を発症した症例を認めなかった。そのため、回腸囊炎・

回腸囊腺腫症を発症した症例の臨床検体を得ることが出来なかった。引き続き症例サンプルを集積していく予定である。

引用文献

1. Patel SD, et al. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. Science, Vol.304, No. 5674, 2004, pp.1154-1158.

2. Propheter DC, et al. Resistin-like molecule is a bactericidal protein that promotes spatial segregation of the microbiota and the colonic epithelium. Proc Natl Acad Sci USA, Vol.114, No.42, 2017, pp.11027-11033.

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3件)

Watanabe K, Nagao M, Suzuki H, et al. The functional outcome and factors influencing the quality of life after ileal pouch anal anastomosis in patients with ulcerative colitis. Surgery Today, 査読有, Vol.48, No.4, 2018, pp.455-461

渡辺和宏、内藤剛、海野倫明、クローン病に対する新たな吻合法 - Anti-mesenteric cutback end-to-side isoperistaltic anastomosis (東北大法) 手術、査読無、Vol.71、2017、pp.1069-1075

渡辺和宏、ストーマの基礎知識、消化器外科 Nursing、査読無、Vol.21、2016、pp.100-103

[学会発表](計7件)

渡辺和宏、高浸透圧を利用した slug 法 (ナメクジ法) によるストーマ脱・直腸脱・浮腫腸管ストーマ造設の手技、第35回ストーマ排泄リハビリテーション学会総会、2018年2月24日、札幌(会長賞)

渡辺和宏、開腹手技と腹腔鏡手技の利点を組み合わせた重症潰瘍性大腸炎に対する HALS 大腸全摘術の術野展開、第30回日本内視鏡外科学会総会、2017年12月7日、京都

渡辺和宏、短腸症候群におけるカテーテル関連血流感染症に対する抗菌剤/抗真菌剤併用口ック療法の有用性の検討、第8回日本炎症性腸疾患学術集会、2017年12月1日、東京

Watanabe K, Surgical Management for IBD Patients: When and How, 2017 Annual

meeting of Chinese Medical Association Taipei (中華医学会大会)、2017年6月10日、台北、台湾(招待講演)

Watanabe K, New reconstructive procedure after intestinal resection for Crohn's disease: Antimesenteric cutback end-to-side isoperistaltic anastomosis, DDW annual meeting 2017 (SSAT), 2017年5月9日、Chicago

Watanabe K, Clinical features of anorectal cancer in Crohn's disease, 12th Congress of ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation), 2017年2月17日、バルセロナ、スペイン

渡辺和宏、大腸上皮分泌タンパク RELM (FIZZ2) は MRSA/MSSA に抗菌活性を有し潰瘍性大腸炎で発現が低下する(続報)、第7回日本炎症性腸疾患学術集会、2016年7月9日、京都(優秀ポスター賞)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 和宏 (WATANABE, KAZUHIRO)
東北大学病院・胃腸外科・助教
研究者番号：30569588

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

河野 えみ子 (KOUNO, EMIKO)