

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09406

研究課題名(和文) ヒト内視鏡生検検体を用いた腸炎上皮傷害に関わるバイオマーカーの探索的研究

研究課題名(英文) Evaluation of biomarkers related to intestinal epithelial disorder using endoscopic biopsy specimen

研究代表者

中村 正直 (Nakamura, Masanao)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60467321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸生検材料によりヒト小腸粘膜の生物学的マーカーmRNA発現の分布を明らかにし、小腸疾患患者の腸粘膜で栄養吸収構造が保持され得る可能性を示した。急性腸炎モデルマウスにおける腸上皮障害に関係する因子を調べ、その治療における再生医療の可能性を調べた。幹細胞の細胞内容成分に着目し、その抗炎症、創傷治癒効果を示した。腸上皮と粘膜関連細菌叢の関係を考え、内視鏡下に腸粘膜をブラシ鉗子で採取し粘膜関連細菌叢と腸炎との強い関係を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎やクローン病の炎症性腸疾患は腸の表面の異常からスタートするので、腸表面の上皮のみならずそれに接する粘膜関連細菌叢に着目し、その重要性を発信できたことに学術的意義があると考えられる。粘膜関連細菌叢は腫瘍と非腫瘍の表面で異なっていたことは、腸炎にも応用できる方法や成果であるともいえる。また、今回の検討で腸炎の治療に再生医療を試みたが、本治療法の有効性が示されれば昨今の高騰した医療費の節約に貢献できるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Intestinal biopsy specimen in endoscopy revealed the distribution of mRNA expression of biological marker in human small intestinal mucosa, and showed that nutrient absorption structure could be maintained in intestinal mucosa of patients with small bowel disease. Factors related to intestinal epithelial damage in acute enteritis model mice were examined, and we considered the potential of regenerative medicine in the treatment. Focusing on some components of stem cells, we showed their anti-inflammatory and healing effects for acute colitis. Considering the relationship between the intestinal epithelium and the mucosa-associated bacterial flora, the sample of intestinal mucosa was collected with a brush forceps during endoscopy and we showed a strong relationship between the mucosa-associated bacterial flora and colitis.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸炎 クローン病 潰瘍性大腸炎 脂肪由来間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管内視鏡によるヒト臨床生検検体を用いた栄養吸収と腸疾患に関する臨床と基礎を繋ぐ研究について知見が得られてきた。経口摂取された栄養は十二指腸からその上皮において能動的な吸収が始まり、その生理機能は小腸を主体に置くが大腸まで続く。人体にとって重要なのは糖質、蛋白質、脂質の3大栄養素であるが、各々は粘膜表面にある特異的なトランスポーターによりトラップされ、続いて粘膜内に取り込まれて吸収されていく。ヒトにおいてこのような構造機能の詳細は今まで十分な理解がなされていなかった。当科ではダブルバルーン内視鏡を用いた小腸疾患の臨床診療を積極的に行っており、その生検検体を用いて栄養関連バイオマーカーの腸粘膜における分布と相対量に関する前向き探索的研究(内視鏡医学研究振興財団、長寿医療研究開発費)を行い(UMIN000011132; 粘膜生検材料を用いた消化管生物学的マーカーの探索的研究、平成29年までの研究期間)、その成果を発表してきた。測定した項目は栄養素のトランスポーター、アディポサイトカインであった。腸粘膜内 mRNA は、例えば GLP は回腸側で多く、上行結腸で再び減る。コレステロールトランスポーター Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) の粘膜での存在も確認し、空腸側で広く認められた。必須アミノ酸トランスポーターである LAT1, LAT2 は大腸も小腸と同様に存在を認められた。栄養関連バイオマーカーのタンパク質発現は各々の抗体を用いた免疫染色によって確認した。3大栄養素全てのトランスポーターにつき上皮を含む粘膜内に確認できた。GLP は小腸における上皮に広く存在し、絨毛の陰窩近くに多く認められた。NPC1L1 は陰窩にのみ存在し、トランスポーターの発現頻度は GLP に比べ低かった。GIP も上皮にのみ存在したが、糖トランスポーターの SGLT1, SGLT5, アミノ酸トランスポーターは上皮に高頻度で広く発現していたため、吸収の場が多く存在することが認識された。更に機能異常として、慢性膵炎によって空腸での粘膜表面に存在する糖トランスポーター、インクレチンが減じることを報告し、膵内分泌機能よりも外分泌機能が相関すること、また小腸内視鏡所見で慢性膵炎における絨毛萎縮を病理学的に証明した (Nakamura Y, et al. Pancreas)。各蛋白質の定量解析において、粘膜固有層に多く含まれる分子の場合、厳密に言えば各生検で採取した検体の上皮と粘膜固有層の比率の差が生じ、上皮における定量が不安定になることが危惧された。例えば、アディポネクチンは脂肪細胞から産生される善玉アディポサイトカインであり、ヒト粘膜固有層に存在することが報告されていたが (Matsunaga, Miura, et al. IBD 2008)、当科は生検検体を用いた本研究の免疫染色において大腸上皮にもそのタンパクが存在することを証明した。しかし粘膜固有層にも存在するためアディポネクチンの上皮定量解析を行うには上皮のみの検体が必要であり、それには通常の生検法では不能であった。

腸上皮は栄養吸収の他に管腔内において外界からの抗原を特有のバリア(表面粘液、細胞間接着因子、細胞内消化など)によって制御している。しかし、高濃度の薬剤や細菌感染など強い抗原に曝露され腸炎に罹患した場合、その腸上皮における膜透過性が亢進することで、局所の炎症が惹起される。特に上皮細胞間のタイトジャンクションがルーズになりその間隙から抗原が入り込む構造が推測されているが、この際の上皮の変化について十分な理解は得られていない。タイトジャンクションは、上皮細胞側底膜の刷子縁膜近傍に局在する、巨大なタンパク質複合体であり、occludin や claudin などの膜貫通型タンパク質と Z0 (zonula-occludens) などの細胞内裏打ちタンパク質から構成されるが、ヒトの各種腸炎においてどの構造で変化が起きているかわかっていない。同様に腸内細菌叢が変化し抗原性を持った細菌によって上皮細胞内における Toll-like receptor を介したシグナル伝達経路が活性化され炎症が惹起されると多く報告されてきた。正常部、膜透過性が亢進した部位、びらん潰瘍の形成や出血がみられる部位があるが、内視鏡上正常に観察されたとしてもその上皮では炎症部位と同様もしくは変化に

違いがあるのかもしれない。

炎症性腸疾患と腸粘膜治癒との関係を見てみると、クローン病において、粘膜治癒が得られると再燃率、入院率、手術率の低下が報告されており、それは主要な治療目標となっている。寛解期に粘膜治癒の評価をどの様に行うかは非常に重要な課題であるが、近年種々の検査法が利用可能である。その中でカプセル内視鏡 (Capsule endoscopy : CE) は小腸粘膜の非侵襲的観察が可能であり、クローン病に対して様々な有用性が報告されている。一方、CE を安全に行うためには、手術を必要とする滞留を避けることが重要であり、PillCam パテンシーカプセル (Patency capsule : PC) が開発され、日本で 2012 年に保険収載された。PC はラクトースとバリウムを非溶解性のコーティングで覆った CE と同一サイズの崩壊型カプセルであり、嚥下し小腸の通過を確認することで消化管開通性を確かめることができ、よってその後の CE を安全に行うことができる。もし PC が消化管狭窄を通過しなければ、40 時間経過すると PC は崩壊しコーティング膜が狭窄を通過するようになり、滞留に関する問題を避けることが出来る。PC は消化管狭窄を疑う症例に対する有効性、安全性を臨床試験で確認し導入されたが、現時点で臨床経験はまだ少ない。また、クローン病患者では消化管狭窄を有する可能性があり、消化管開通性自体が臨床症状、転帰に影響する可能性を考えた。

以上のようなクリニカルな側面と組織検体を用いた分子生物学的な検討を加えた側面から食事の消化吸収と腸炎における腸粘膜上皮、粘膜内の異常との関係を明らかにする必要があった。

2 . 研究の目的

- (1) ヒトにおける消化管内視鏡生検材料を用いて栄養関連また炎症性バイオマーカーの分布を見出すことと、タンパク質の質量分析により栄養、炎症に大きく関わる因子を見出すこと。
- (2) クローン病患者において、カプセル内視鏡を利用した粘膜治癒と予後の関係を調べること、また、その粘膜治癒に係る因子や通過障害による影響を調べること。
- (3) 腸粘膜透過性研究として DSS 腸炎を用いた上皮透過性と再生因子による治療の効果を検討すること。
- (4) ヒト腸粘膜表面における粘膜関連細菌叢 (mucosa-associated microbiota: MAM) と粘膜治癒、腸管障害との関係を調べること。

3 . 研究の方法

(1) 当院においては多くの小腸大腸の炎症性腸疾患、過敏性腸症候群の患者が通院し定期的もしくは増悪時に消化管内視鏡検査、特に小腸内視鏡を受ける。生命倫理審査委員会の承認を得たうえで粘膜生検材料を用いた消化管生物学的マーカーの探索的研究 (平成 29 年までの研究期間) を行っていた。この研究において小腸、大腸の各所において正常粘膜に観察される部位から粘膜生検を行い、アディポサイトカインを含む粘膜内栄養関連バイオマーカーの mRNA とタンパク質の腸管内分布を調べ、その実験系を確立してきたが、腸炎に応用し臨床診療で腸炎患者に説明し研究への参加を促した。小腸または大腸内視鏡を行う際に研究用生検を行った。経肛門的小腸内視鏡における標的部位は深部回腸、下部回腸、回腸末端、上行結腸、下行結腸、直腸の正常に見える箇所と、小腸、大腸に病変があればその部位でも検体を採取し臨床診断を確認した。経口小腸内視鏡では十二指腸、上部空腸、深部空腸で生検した。大腸内視鏡ではその各所で生検を施行した。生検検体は RNA 安定化保存液に入れて保管した。2 検体はバイオマーカーの mRNA とタンパク質の定量解析に使用することとした。

(2) 臨床面において、小腸型または大腸病変が寛解状態にある小腸大腸型クローン病患者を対象とし、PC と CE により消化管の開通性に伴った臨床上的特徴を調べた。PC 施行に関して嚥下は前後の食事制限は行わず、消化管蠕動を促進する薬剤は使用せず、朝もしくは就寝前に行った。PC 原型排泄もしくは嚥下 33 時間以内に X 線か CT スキャンにて PC の小腸通過が確認できたものを「消化管開通性あり」、それ以外を「消化管開通性なし」と定義し、2 群を比較した。消化管開通性にかかわる因子について、年齢、性別、罹病期間、手術歴、腹痛、Crohn's Disease Activity Index (CDAI)、採血データの統計学的解析、また累積非入院率と累積非手術率について臨床的予後の比較検討を行った。

(3) 上皮透過性異常をきたす急性腸炎モデルマウスにおける再生因子投与の有効性、有効成分を検討することも試みた。C57BL/6J マウスに、2.5%DSS を自由飲水で 5 日間投与し急性腸炎モデルを作成、歯髄から採取した再生因子と、マウス鼠径部皮下脂肪より単離した間葉系幹細胞からの精製液を薬剤開始 2,3,4 日目に 0.2ml ずつ腹腔内投与した(1 回, 2 回, 3 回投与の比較を行った)。コントロール群には同様に PBS を 0.2ml ずつ投与した。臨床効果として生存率、体重減少率、DAI (Disease activity index) を評価した。薬剤投与開始 6 日目での腸管長を測定し、組織学的評価を行った。脂肪由来間葉系幹細胞濾液 (Filtrated Stem Cell Lysate; FSCL) の成分および急性腸炎モデルマウスに対する有効性の検討について 2019 年に行った。内因性の多機能タンパク質である alarmin はネクロシスに陥った細胞から急速に分泌され、組織再生、生体の恒常性維持に寄与すると報告されている。その成分が含まれるかも検討した。FSCL を作成し、C57BL/6J マウスに、2.5%DSS を自由飲水で 5 日間投与し急性腸炎モデルを作成し、FSCL を DSS 開始 2,3,4 日目に 0.2ml ずつ腹腔内投与した(1 回, 2 回, 3 回投与の比較を行った)。FSCL について液体クロマトグラフィ質量分析法を用いて成分解析を行い、FSCL 群、無血清培養上清群 (PBS)、培養上清群の 3 群におけるタンパク質発現を検討した。

(4) ヒト腸管における MAM 研究において

小腸：対象は小腸内視鏡を施行したクローン病患者であった。糞便は内視鏡前に採取し、十二指腸、空腸、回腸、S 状結腸の粘膜をブラシ鉗子で擦過することにより MAM 検体を採取した。細菌叢は DNA を抽出後、16SrRNA 遺伝子の V3-4 領域を増幅し Miseq (Illumina 社) により解析した。また潰瘍を認めた患者を UL+群、それ以外を UL-群と定義し、各部位で菌叢を比較した。

大腸：大腸粘膜関連細菌叢の研究を追加で行い、その腸上皮への影響を調べた。糞便の細菌叢と粘膜関連細菌叢は異なることが推測され、また大腸内での粘膜関連細菌叢は部位ごとに違いが無いとの報告があった。大腸内視鏡時にブラシ鉗子にて大腸表面を複数回擦過することで腸表面の粘液を採取し、粘膜関連細菌叢は DNA を抽出後、16SrRNA 遺伝子の V3-4 領域を増幅し Miseq (Illumina 社) により解析した。

4. 研究成果

(1) ヒトのアディポネクチンの小腸大腸における mRNA 発現により粘膜内分布を調べたところ、個体差が大きいこと、小腸大腸に同等の発現が認められた。

(2) PC の消化管通過より「消化管開通性あり」、それ以外を「消化管開通性なし」と分けた場合、消化管開通性があった群は有意にその後の腸管予後が良好であり、累積緊急入院率が低かった (Yoshimura T, Nakamura M, et al. Nagoya J Med Sci. 2018)。

(3) 結果、各再生因子は単回投与よりも複数回投与により投与時間が長いほど効果があった。FSCL の 3 回投与にて FSCL 群は PBS 群に比して、体重減少率で有意な改善を認めた。成分解析では、Heat shock protein , S100 蛋白らは FSCL の腸炎改善に効果があり、内因性の多機能タンパク質である alarmin の関与が示唆された。

(4) クローン病では便サンプルにおいて活動期と寛解における便中の細菌叢が異なることが示された。糞便と MAM 検体は菌叢が大きく異なることを示しただけでなく、腸管各部位間でも菌叢が異なった。またクローン病の活動性に関わる潰瘍の有無によって菌叢が異なることを示すことで病態との関連が示唆された。MAM の評価はクローン病の病態解明の一助になりうると期待され、小腸内視鏡とブラシ鉗子を用いた検体採取は MAM の評価に有用であると考えた。

粘膜内にとどまる早期大腸癌と進行がんの患者間で *Fusobacterium nucleatum* を含めた腸内細菌叢プロファイルが異なることを示した(Zorrón Cheng Tao Pu L, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura M, Yamamura T, Maeda K, Sawada T, Mizutani Y, Ishikawa T, Furukawa K, Ohno E, Kawashima H, Miyahara R, Koulaouzidis A, Hirooka Y; Nagoya University Crohn's Disease Study Group	4. 巻 7
2. 論文標題 Validity of Capsule Endoscopy in Monitoring Therapeutic Interventions in Patients with Crohn's Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 E311-E311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm7100311.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura T, Hirooka Y, Nakamura M, Watanabe O, Yamamura T, Matsushita M, Ishikawa T, Furukawa K, Funasaka K, Ohno E, Kawashima H, Miyahara R, Goto H.	4. 巻 80
2. 論文標題 Clinical significance of gastrointestinal patency evaluation by using patency capsule in Crohn's disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 121-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.80.1.121.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zorrón Cheng Tao Pu L, Yamamoto K, Honda T, Nakamura M, Yamamura T, Hattori S, Burt AD, Singh R, Hirooka Y, Fujishiro M.	4. 巻 35
2. 論文標題 Microbiota profile is different for early and invasive colorectal cancer and is consistent throughout the colon.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 433-437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14868.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murate K, Nakamura M, Fujishiro M.	4. 巻 25
2. 論文標題 A Case Where Administration of Ustekinumab Maintained the Intestinal Patency After Balloon Dilation for Small Intestinal Stenosis Caused by Crohn's Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflamm Bowel Dis.	6. 最初と最後の頁 e140-e140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izz166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa T, Nakamura M, Yamamura T, Maeda K, Sawada T, Mizutani Y, Ishikawa T, Furukawa K, Ohno E, Miyahara R, Kawashima H, Hirooka Y.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Lewis Score on Capsule Endoscopy as a Predictor of the Risk for Crohn's Disease-Related Emergency Hospitalization and Clinical Relapse in Patients with Small Bowel Crohn's Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 4274257-4274257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/4274257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura R, Watanabe O, Nakamura M, Yamamura T, Matsushita M, Suhara H, Furukawa K, Ishikawa T, Funasaka K, Ohno E, Kawashima H, Miyahara R, Hirooka Y, Goto H.	4. 巻 80
2. 論文標題 Fecal calprotectin reflects endoscopic activity in patients with small-bowel Crohn's disease according to double-balloon endoscopy findings.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 257-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.80.2.257.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 服部 峻、中村正直、藤城光弘
2. 発表標題 クローン病における小腸粘膜関連細菌叢の検討
3. 学会等名 DDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanao Nakamura, Hidemi Goto
2. 発表標題 Diagnosis and Treatment of Small Bowel Diseases using Capsule Endoscopy and Double-Balloon Endoscopy
3. 学会等名 The Vietnam association of Gastroenterology, 12TH GASTROENTEROLOGICAL CONGRESS OF SOUTHEAST ASIAN NATIONS 24TH NATIONAL SCIENTIFIC CONGRESS OF GASTROENTEROLOGY (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川貴広、中村正直、廣岡芳樹
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞濾液の成分および 急性腸炎モデルマウスに対する有効性の検討
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川貴広, 渡辺修, 中村正直, 山村健史, 松下正伸, 水谷泰之, 澤田つな騎, 山本徳則, 石川卓哉, 古川和宏, 船坂好平, 大野栄三郎, 川嶋啓揮, 宮原良二, 廣岡芳樹
2. 発表標題 急性腸炎モデルマウスにおける脂肪由来間葉系幹細胞濾液(FSCL)反復投与の有効性の検討
3. 学会等名 JDDW 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanao Nakamura, Yoshiki Hirooka, Osamu Watanabe, Takeshi Yamamura2, Masanobu Matsushita, Hiroki Suhara, Takuya Ishikawa, Kazuhiro Furukawa, Kohei Funasaka, Eizaburo Ohno, Hiroki Kawashima, Ryoji Miyahara, Naoki Ohmiya, Wataru Honda, Anastasios Koulaouzidis, Hidemi Goto
2. 発表標題 Evaluation of Mucosal Healing by Small Bowel Capsule Endoscopy in Patients with Known but Asymptomatic Crohn ' s Diseas
3. 学会等名 DDW 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Keiko Maeda, Tsunaki Sawada, Yasuyuki Mizutani, Takeshi Kuno, Keisaku Yamada, Takuya Ishikawa, Kazuhiro Furukawa, Eizaburo Ohno, Ryoji Miyahara, Hiroki Kawashima, Yoshiki Hirooka
2. 発表標題 CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE PATENCY OF GASTROINTESTINAL TRACT IN CROHN'S DISEASE EVALUATED BY PATENCY CAPSULE
3. 学会等名 DDW 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川貴広, 渡辺修, 中村正直, 山村健史, 松下正伸, 水谷泰之, 澤田つな騎, 丹羽慶樹, 内田元太, 大塚裕之, 鈴木悠土, 石田哲也, 後藤秀実, 廣岡芳樹
2. 発表標題 クローン病診療におけるカプセル内視鏡Lewis scoreの臨床的意義
3. 学会等名 JDDW 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 秀実 (Goto Hidemi) (10215501)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	川嶋 啓揮 (Kawashima Hiroki) (20378045)	名古屋大学・医学部附属病院・准教授 (13901)	
研究分担者	廣岡 芳樹 (Hirooka Yoshiki) (50324413)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	宮原 良二 (Miyahara Ryoji) (50378056)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	渡辺 修 (Watanabe Osamu) (80378059)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	