様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：２０７９０５００
研究課題名（和文）アドレノメデュリンを利用した炎症性腸疾患治療薬開発のための基盤研究
研究課題名（英文）Basic study of adrenomedullin as a possible new drug for inflammatory bowel disorder.

研究代表者
芦塚　伸也（ASHIZUKA SHINYA）
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：90468033

研究成果の概要（和文）：アドレノメデュリン（AM）は 1993 年に当教室で発見された強力な降圧作用を有する新規生理活性ペプチドである。AM は生体内に広く分布し循環調節因子として重要な役割を果たしていることが明らかにされ、循環器疾患治療薬として有望である。一方、AM には強力な抗炎症・臓器保護作用があることが明らかにされている。実際、本研究代表者は炎症性腸疾患のモデルである酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデル動物に AM を投与すると、炎症が抑制され、病態が改善することを明らかにした。本研究では、AM の炎症性腸疾患(IBD)発症・増悪化抑制効果およびその機序について、dextran sulfate sodium salt (DSS)による腸管上皮層破綻によるマウス腸炎モデルを用いて検討した。その結果、AM は抗炎症および抗菌作用を示すことにより、極めて有効な腸炎治療薬になりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) is a potent vasorelaxing and hypotensive peptide which was discovered in our laboratory in 1993. AM is ubiquitously distributed and an important cardiovascular regulatory hormone and it has potential therapeutic value in cardiovascular disorders. In addition, AM also exerts anti-inflammatory and organprotective activity. Indeed, we showed that AM has actually been shown to reduce the severity of colitis in the acetic acid. In this study, I showed that intra-rectal AM-treated mice showed a reduction in loss of body weight and severity of colitis in the DSS-induced colitis model mouse. Further the protective capability of AM is associated with suppression of inflammation and maintenance of the intestinal epithelial barrier function. A broad spectrum of AM induced effects with respect to protection against DSS-induced colitis, and suggest a potential therapeutic value of this treatment for inflammatory bowel diseases (IBD).

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008　年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009　年度	1,400,000	400,000	1,800,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,100,000	910,000	4,010,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：循環器内科学
キーワード：アドレノメデュリン、炎症性腸疾患、dextran sulfate sodium salt (DSS)腸炎、酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデル、臓器保護作用、抗炎症作用、循環器疾患治療薬、炎症細胞

１．研究開始当初の背景

AM は、1993 年に研究代表者の教室において、ヒト褐色細胞腫組織中より単離・同定された生理活性ペプチドである。AM 遺伝子発現は、ヒト正常副腎髄質、肺、血管壁、心房、心室、腎臓、脳、消化管等の幅広い臓器や組織で認められる。遺伝子発現に一致して、蛋白（ペプチド）レベルでも、これらの臓器や組織において、かなりの濃度で存在している。AM の短期的長期的投与実験や遺伝子改変動物の解析により、AM は種々の臓器や組織に作用して、降圧作用や臓器保護作用を含めて極めて多彩な作用（pleiotropic effects）を発揮する。特に急性心筋梗塞における効果が期待され、新たな循環器疾患治療薬として期待されている。

一方、AM は消化管の粘膜や筋層にも認められ、炎症性疾患では血中濃度が増加している。また AM 遺伝子は、IL-6 や TNF-αなどの炎症性サイトカインで誘導され、誘導された AM はこれらの炎症性サイトカインを強力に抑制する。これらの結果は、AM が内在性の抗炎症物質として機能していると示唆されている。

実際、本研究代表者らは、酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデルラットを用いて、AM の新規かつ特徴的作用である大腸潰瘍治癒促進効果を報告した（Ashizuka, S. et al. Peptides. 26: 2610-2615 (2005)）。本大腸炎モデルは炎症性腸疾患モデルであり、AM が炎症性腸疾患の治療に有用である可能性がある。AM の炎症性腸疾患治療薬としての有用性を示す動物実験の成果はヨーロッパのグループからも、我々の論文から半年遅れて公表（Gonzales, R. E, et al. Gut. 55: 824-832 (2006)）された。

本研究では、有効な治療手段に乏しい炎症性腸疾患をターゲットに、AMによる治療応用の可能性を明確にすることで、将来のAMによる炎症性腸疾患患者の治療を実用化するための基礎的研究を行う。

２．研究の目的

AM は 1993 年に本研究協力者の北村等により発見された強力な降圧作用を有した５２個のアミノ酸からなる新規生理活性ペプチドである。AM の発見とその後の研究により、AM による新たな循環調節機構が明らかとなり、AM 自体は循環器疾患の治療薬として極めて有望である。一方、AM には循環調節因子としての役割以外に、炎症性疾患では AM の産生が増加し、抗炎症・臓器保護因子として作用していることを明らかにしてきた。実際、本研究代表者等は酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデル動物に AM を投与すると、炎症が抑制され、病態が改善することを明らかにし、AM の炎症性腸疾患治療薬としての特許を申請した。本研究では将来 AM を炎症性腸疾患の新たな治療薬として実用化するための基盤となる基礎的研究を推進する。

３．研究の方法

AM の IBD 発症・増悪化抑制効果およびその機序について明確にするため、1.8% dextran sulfate sodium salt (DSS)マウス腸炎モデルを用い検討を行なった。対照群には生理食塩水、AM 投与群には１匹あたり 0.05μg をそれぞれ７日間注腸投与し、同時に 1.8% DSS 水を自由摂取させ、次の５項目について検討した。

（１）症状と病理学的所見：経時的な体重変化を測定し、症状を観察した。また、腸管の病理学的な変化をヘマトキシリンエオジン染色で観察した。

（２）通性嫌気性菌数：IBD 患者で一部の常在菌が異常に増加し、宿主免疫反応の破綻を招き腸炎の発症・増悪化の原因になることが報告されている。本研究では、常在菌の大半

を占める通性嫌気性菌数を調べた。

（３）上皮間Ｔ細胞（intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL）の検討：腸管粘膜上皮層には上皮細胞の他、上皮間 T 細胞（intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL） が存在し、腸管粘膜上皮の恒常性維持に働くことが広く知られている。大腸 IEL を分離し FACS 解析を行なった。

（４）IEL からのサイトカイン産生：サイトカインバランスの破綻は腸炎の発症・増悪化に強く関与することが知られている。腸管上皮より単離した IEL からの各種のサイトカインを ELISA で定量した。

（５）ジャンクション分子発現：腸管バリアの破綻は炎症や感染症などさまざまな疾患を引き起こすことが知られている。バリア制御は宿主防御を考える上で重要であるので、上皮バリアの構築に不可欠な分子であるジャンクション分子の発現を RT-PCR で調べた。

４．研究成果

（１）症状と病理学的所見：

1.8% DSS を摂取させた結果、対照群では顕著な体重減少、下痢、下血などが示されたが、AM 投与群ではそれらの症状が著しく軽減した（図１）。

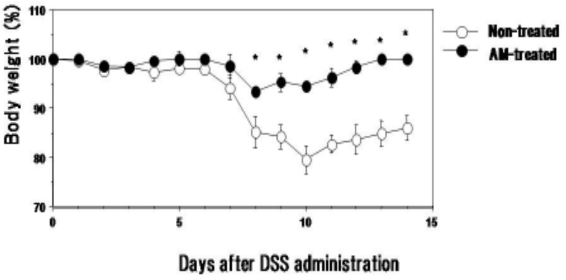


図１：DSS マウス腸炎モデルの体重の変化。

組織病理学的解析では、対照群では好中球や炎症細胞の浸潤、粘膜上皮の糜爛、筋層の肥厚が顕著であり、これら炎症像の回復の遅延が認められた。一方、AM 投与群では筋層の肥厚は見られたが、炎症像は顕著に軽減した。それに伴い、重症度スコアも AM 投与により、有意に改善した（図２）。

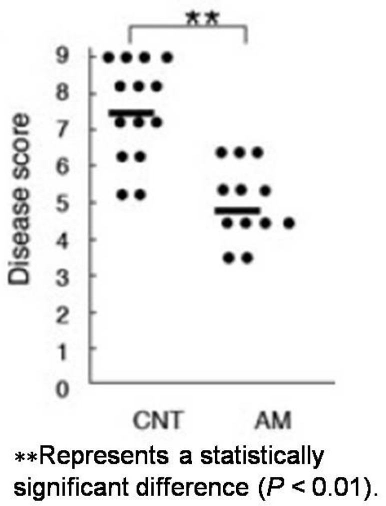


図２：DSS マウス腸炎モデルの重症度スコア

（２）通性嫌気性菌数：

AM は強力な抗菌活性を示すことが報告されている。IBD 患者で一部の常在菌が異常に増加し、宿主免疫反応の破綻を招き腸炎の発症・増悪化の原因になることが報告されている。そこで、常在菌の大半を占める通性嫌気性菌数を調べた結果、対照群と比較し AM 投与群では菌数が減少した（図３）。

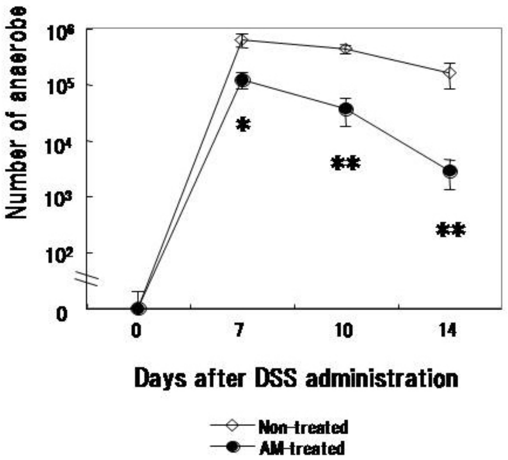
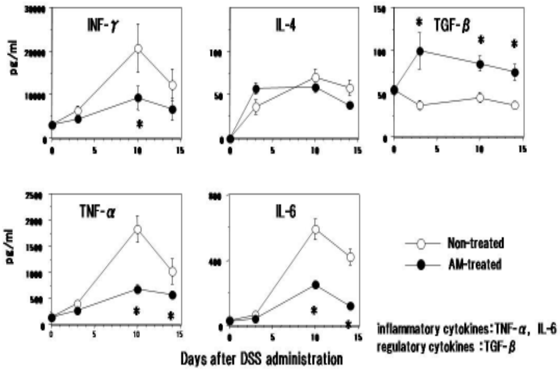


図３：DSS マウス腸炎モデルでの通性嫌気性菌数

（３）上皮間Ｔ細胞（intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL）の検討：

腸管粘膜上皮層には上皮細胞の他、上皮間 T 細胞（intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL）が存在し、腸管粘膜上皮の恒常性維持に働くことが広く知られている。T細胞はその受容体(TCR)から 型と 型に分けられる。これまでの研究により、 細胞は制御性サイトカインを産生す

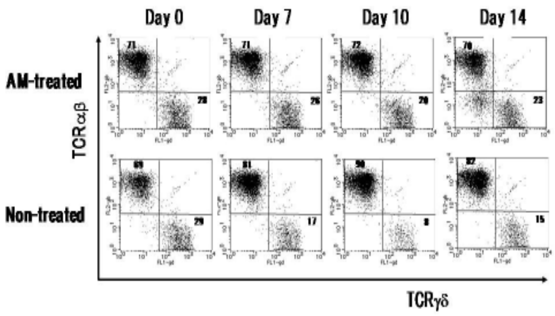


ることにより抗炎症作用を示すことが報告されている。そこで、大腸 IEL を分離し FACS 解析を行なった結果、対照群では病態の増悪化に伴い が減少するが、AM 投与群では維持された（図４）。

図４：DSS マウス腸炎モデルより単離した上皮間Ｔ細胞（intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL）の FACS 解析

（４）IEL からのサイトカイン産生：

サイトカインバランスの破綻は腸炎の発症・増悪化に強く関与することが知られている（Inagaki-Ohara, et al., Gut 55:212, 2006）。AM 投与群では IEL から産生されるサイトカインは、対照群と比較し AM 投与群で Th1(IFN-γ)および炎症性サイトカイン(IL-6, TNF-α)の産生が減少し、制御性サイトカイン(TGF-β)は増加した（図５）。AM の投与により炎症性サイトカイン産生が抑制されることは他のグループからも報告されているが（Gonzale-Rey, et al., Gut 55:824)、炎症局所でのＴ細胞を分離し AM によるサイトカインの産生への影響を調べた

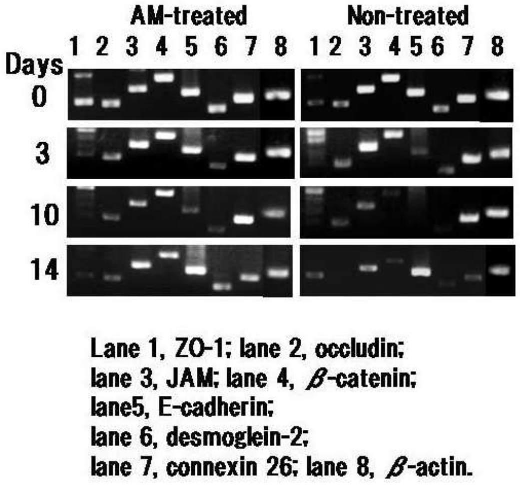


のは本研究が初めてである。

図５：DSS マウス腸炎モデルより単離した上皮間Ｔ細胞（intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL）からのサイトカイン分泌

（５）ジャンクション分子発現：

腸管バリアの破綻は炎症や感染症などさまざまな疾患を引き起こすことが知られており、そのバリア制御は宿主防御を考える上で重要である。病理学的観察により、AM 投与群で粘膜上皮層の構造の崩壊が軽減していることから（図６）、上皮バリアの構築に不可欠な分子であるジャンクション分子の発現を調べた。その結果、AM 投与群ではジャンクション分子発現の速やかな回復が示さ



れた。

図６：DSS マウス腸炎モデルの腸管上皮細胞

でのジャンクション遺伝子の発現

結論：

以上の結果より、AM は抗炎症および抗菌作用を示すことにより、極めて有効な腸炎治療薬になりうる可能性が示された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）査読有り

1. Ashizuka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, Kato J, Inatsu H and Kitamura K: Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium. *Microbiol Immunol. 53:* 573-581 (2009)

〔学会発表〕（計１件）

1. Kitamura K, Ashiduka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, Kato J, Inatsu H: Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation in mice administered dextran sulphate sodium. 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010). (2010 年 3 月 京都)

６．研究組織

(1)研究代表者

芦塚　伸也（ASHIZUKA SHINYA）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90468033