

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02897

研究課題名(和文)腸内環境における生命金属の役割

研究課題名(英文)the role of biometal in the intestinal environment

研究代表者

大島 茂(Oshima, Shigeru)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：50376787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病の腸管組織にはニッケル粒子が沈着していることを発見しました。これまでの我々の追加研究では、大腸がん組織や潰瘍性大腸炎の組織にはニッケル粒子の沈着は見られませんでした。細胞株を用いてニッケル粒子が細胞死やサイトカイン産生などを誘導することを明らかにしました。また、クローン病の遺伝的要因であるA20/TNFAIP3の変異を持つマウスを用いて、ニッケル粒子が腸炎を悪化させることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患は、日本で急増している原因不明の消化管難病です。これらの病気の発症に直結する決定的な環境因子はまだ特定されていません。今回、これまで全く解析されていなかった生命金属の観点から調査を行い、クローン病の腸管組織にニッケル粒子が沈着していることを発見し、動物モデルで検証しました。健康な人では経口摂取した生命金属は体外に排出されますが、クローン病の遺伝的背景を持つ人(A20/TNFAIP3変異など)では、何らかの理由でニッケル粒子が腸管に蓄積し、炎症に関与するという新しい仮説が提唱され、大きなインパクトを与えています。

研究成果の概要(英文)：We have discovered the deposition of nickel particles in Crohn's disease intestinal tissues. Analysis of human disease samples so far has not shown deposition in non-cancerous parts of colorectal cancer tissues or tissues of ulcerative colitis. Using cell lines, we have elucidated the cellular alterations caused by nickel particles and have also revealed that nickel particles exacerbate intestinal inflammation in mutant mice of the Crohn's disease susceptibility gene A20/TNFAIP3.

研究分野：消化器内科

キーワード：クローン病 A20 腸炎 ユビキチン ニッケル

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病・潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は本邦で急増している原因不明の消化管難病である。その要因として遺伝的背景・腸内細菌叢の他、環境因子が重要である事が知られている。申請者はこれまで同疾患の遺伝的背景に着目し、その機能と直結するオートファジー・細胞死等に関する研究を通じ炎症性腸疾患の病態解明研究を行ってきた(*Nature* 2009; *Nat Immunol* 2011, 2015; *Autophagy* 2015, 2016, 2018)。同研究を追求する中で新たに環境因子に着目した。ヒト生体には鉄(Fe)・亜鉛(Zn)・マンガン(Mn)・クロム(Cr)など多様な「生命金属」が内在している。これら生命金属は食物等を介して摂取されており、腸管は生命金属に常に曝露される場となっている。食生活の欧米化により腸管が生命金属に曝露される機会・量は既に増加し、近年は化粧品・調理器具・歯科治療金属等にも多くの生命金属が含まれており、多彩な「生命金属」に曝露される機会・量はいずれも増加の一途である。そこで申請者らは炎症性腸疾患の病因となる環境因子として全く解析されていなかった生命金属について検討した。

## 2. 研究の目的

従来、食品等から採り込まれた生命金属は必要量のみが吸収され、余剰分は速やかに体外に排除・排泄されるため、消化管疾患発症の要因とは考えられていなかった。しかしながら生活習慣等の変化により多彩な生命金属に曝露する機会や総曝露量が増加したことにより、従来の考え方を転換する必要性が高まっている。このように、「腸内環境における生命金属の役割」の解明と新たな角度からの病態理解が本研究の核心的な問いである。そこで、本研究では、(1)生命金属蓄積パターンの解明、(2)ニッケルによる細胞機能制御の解明、(3)ニッケルによる腸内細菌叢制御の解析、(4)腸炎惹起機構におけるニッケルの役割、の4点を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)生命金属蓄積パターンの解明、

放射光蛍光 X 線分析法(SR-XRF 法)及び X 線吸収微細構造法(XAFS 法)を用いてヒト腸組織を解析する。同検討により蓄積している生命金属の局在・量・金属種に加えイオン化・酸化の状態も識別した蓄積パターン・プロファイルを取得する。クローン病・潰瘍性大腸炎・大腸がんなどの消化管疾患から得られた腸組織を対象とし疾患特異的な生命金属蓄積パターンの同定を試みた。

### (2)ニッケルによる細胞機能制御の解明、

同定済みのニッケル粒子について、如何なる機構で腸上皮細胞または免疫細胞の機能を制御するのかオートファジー、サイトカイン産生、細胞死などを検討した。

### (3)ニッケルによる腸内細菌叢制御の解析、

ニッケル粒子をマウスに混餌することでマウス腸内細菌叢への作用を次世代型シーケンサー(NGS)による 16S rRNA 遺伝子解析にて検討した。

### (4)腸炎惹起機構におけるニッケルの役割

腸炎モデルマウスを用いてニッケル混餌により病態への作用を明らかにする。各種遺伝子操作マウスを用いてメカニズムを明らかにするとともに、クローン病感受性遺伝子である A20(TNFAIP3)欠損マウスでも解析した。A20 変異のある患者由来細胞の準備を行い、さらに A20 と分子構造の近い ZRANB1 (Trabid) における解析も行った。

## 4. 研究成果

### (1)生命金属蓄積パターンの解明

腸管における金属の蓄積を同定するために、クローン病手術標本を中心に放射光蛍光 X 線分析法(SR-XRF 法)を行った。ヘマトキシリン・エオジン染色により粘膜の炎症が確認できている組織において、亜鉛や鉄の沈着は観察されなかった。驚いたことに、クローン病に罹患した組織の粘膜下層には、高濃度のニッケル粒子が観察された(図 1A)。各元素の化学状態を推定するために X 線吸収微細構造法(XAFS 法)を行ったところ、金属と水溶液の XAFS スペクトルを比較した結果、組織で観察されたニッケルの痕跡は、より金属のそれに近く、ニッケルの局在がイオンではなく粒子の状態であることが示された(図 1B)。驚くべきことに、ニッケルと一緒に検出された他の金属元素はなく、ニッケルは合金の形ではなかったことが示された。より詳細な分布画像を微小粒子誘起 X 線発光(PIXE)によって得た。ニッケル部位の直径は 10~100 nm であった(図 1C)。特筆すべきことに、現在までの解析では大腸がんの非がん部分では、ニッケル粒子は観察されなかった。これらのデータを総合すると、クローン病組織でニッケル粒子が確認された。さらに、他の生命金属の特異的沈着は潰瘍性大腸炎の手術検体におけるクロムのみを認められた。

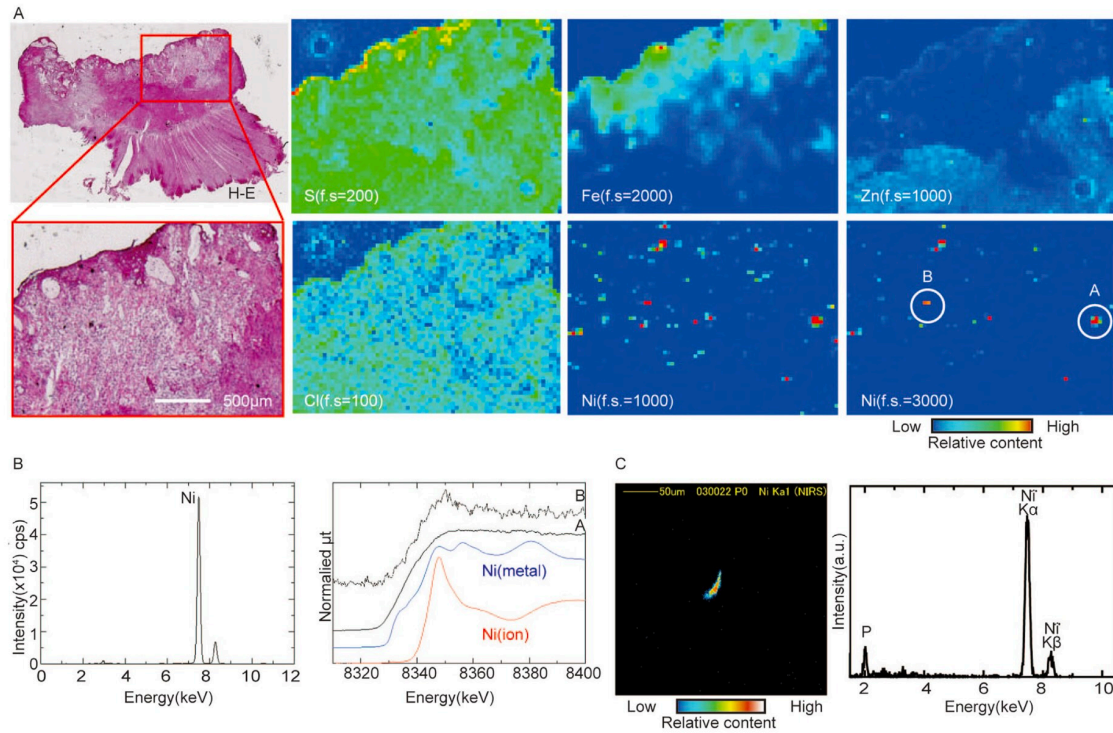


図1 クローン病腸管組織におけるニッケル粒子の沈着

### (2)ニッケルによる細胞機能制御の解明

腸管局所に蓄積したニッケル粒子がイオンを介して作用している可能性も考え、NiCl<sub>2</sub>にてヒト由来細胞株を刺激すると lysosomes の蓄積を認めたとともに LC3 puncta や p62/SQSTM1 puncta が増加していた。一方で、ニッケル粒子は直接、マクロファージなどではエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる可能性があった。そこでマクロファージに分化できるヒト THP1 細胞株を用いて、膜障害を Ga13 を用いて検討したところ、ニッケル粒子を囲うように観察され、膜が障害されている可能性が考えられた。次に、THP-1 細胞を電子顕微鏡で分析した。THP-1 細胞はフィロポディア形成を示し、刺激後 1 時間以内にニッケル粒子が貪食されたことを示した (図 2)。またニッケル粒子と脂質体がオートファゴゾーム内でも観察された。さらに、ウェスタンブロットにて、ニッケル粒子は THP-1 細胞で LC3-II (微小管関連タンパク質軽鎖) を誘導した。沈殿実験から、ニッケル粒子は時間依存的に p62/SQSTM1、LC3-II、ユビキチンと結合することが明らかになった。これらのデータから、ニッケル粒子はオートファジーによって捕捉されることが示された。

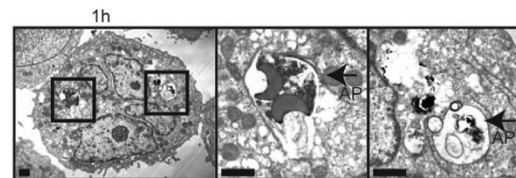


図2 ニッケル粒子刺激の電子顕微鏡写真 (THP1 細胞)

### (3)ニッケルによる腸内細菌叢制御の解析

C57BL/6J マウスを用いた検討を行うにあたり、まずニッケル粒子を混餌して2ヶ月程度飼育しても肉眼的には異常を認めない濃度として0.5%を設定した。次にC57BL/6J マウスにニッケル粒子を1週間混餌 (0.5%) し、便中腸内細菌を次世代型シーケンサー (NGS) による16S rRNA 遺伝子解析を行った。便中の Firmicutes 門フィーカリバクテリウム属 (Faecalibacterium) が減少することを見出した。肉眼的に腸管に変化は認めていないが、Faecalibacterium prausnitzii は炎症性腸疾患で変化することが報告されており詳細に検討していく必要がある。

### (4)腸炎惹起機構におけるニッケルの役割

腸管炎症におけるニッケル粒子の作用を検討するにあたり、マウスに対して2%DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) を5日間自由飲水にて腸炎を惹起させる腸炎モデルを用いた。DSS の自由飲水終了後にニッケル粒子を混餌 (0.5%) して腸炎への作用を検討した。C57BL/6J 及び腸管上皮特異的 Atg5 欠損マウス (Atg5 flox/flox villin<sup>cre</sup> マウス) を用いた検討では、ニッケル粒子を混餌しても、腸炎の増悪は認められなかった。一方で、マクロファージ特異的 Atg5 欠損マウス (Atg5 flox/flox LysM<sup>cre</sup> マウス) に対し、ニッケル粒子を経口投与すると DSS 腸炎モデルで腸炎が増悪することが確認された。つまり、マクロファージにおけるオートファジー機能破綻がニ

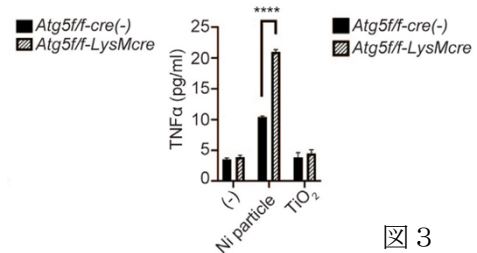


図3



ニッケル粒子による腸炎増悪に関わることが示唆された。次に腹腔内マクロファージ(PEC)を用いてニッケルの作用を検討した。野生型マウス由来 PEC においてニッケルイオン、ニッケル粒子 100nm 刺激では閾値を超えると濃度依存的に細胞死が誘導されることが確認されたが、この作用は ATG5 には依存していなかった。ニッケル粒子刺激による TNF $\alpha$  産生が ATG5 欠損 PEC において上昇していることを見出した (図 3)。

我々は、クローン病感受性遺伝子として TNFAIP3 (A20) を同定し、報告してきた(*Nat Immunol* 2011)。そこでクローン病の病態とニッケルを明らかにするためにクローン病感受性遺伝子 A20 の操作マウスを用いて検討した。マクロファージ特異的欠損マウス (A20 flox/flox LysM-cre マウス) に対する DSS 腸炎にニッケル粒子を混餌すると DSS 腸炎モデルが増悪することが判明した (図 4)。A20 欠損 PEC を用いて検討すると、A20 欠損 PEC はニッケル粒子の刺激により TNF $\alpha$  の上昇を認めた。さらに反応性フリーラジカルである Nos2 の発現も増加していることを確認した。このことから、A20 欠損マウスにおいては、ニッケル粒子はマクロファージにおけるサイトカイン産生や Nos などの変調を誘導し炎症を増悪させている可能性が示唆された。

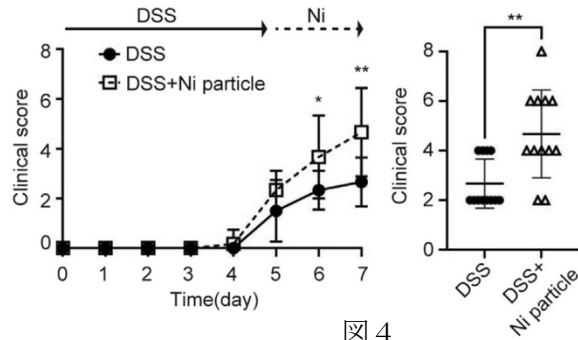


図 4

マクロファージ特異的欠損マウス (A20 flox/flox LysM-cre マウス) を用いた病理学的に検討を行なっているが現在のところ肉芽腫の形成は認められない。そこで、マクロファージ特異的欠損マウス (A20 flox/flox LysM-cre マウス) を用いた慢性腸管炎症モデルにニッケル粒子の混餌を行った。この慢性モデルでは腸管に肉芽腫様な変化を認めており、今後詳細に検討していく。次に、A20 と似た分子ドメインを有する脱ユビキチン化酵素の ZRANB1 (Trabid) についても検討を行った。ZRANB1 (Trabid) は脱ユビキチン化酵素であり、443 番目アミノ酸のシステイン (C) をセリン (S) に変異すると脱ユビキチン化機能が損なわれることが知られている。本研究では CRISPR/Cas9 を用いて Zranb1 C443S 変異ノックインマウス (Zranb1C443S/C443S) を樹立し、腸管における ZRANB1 の機能を検討した。大腸粘液の主要構成成分である MUC2 は腸の恒常性維持に重要な役割を果たしている。Zranb1C443S/C443S マウスの大腸では、Muc2 の mRNA 発現およびタンパク発現が減少し、内粘液層の厚さが菲薄化していた。さらに、杯細胞分化誘導条件における Zranb1C443S/C443S マウス由来大腸オルガノイドにおいて、Muc2 の mRNA 発現が低下した。これらの結果から、ZRANB1 が大腸上皮において Muc2 の制御因子であることを初めて明らかにした。次に in vivo における機能を明らかにするために、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎を惹起したところ、Zranb1C443S/C443S マウスでは腸炎が増悪することが明らかとなった (図 5)。ニッケル粒子を投与して腸炎への作用を明らかにしていく。

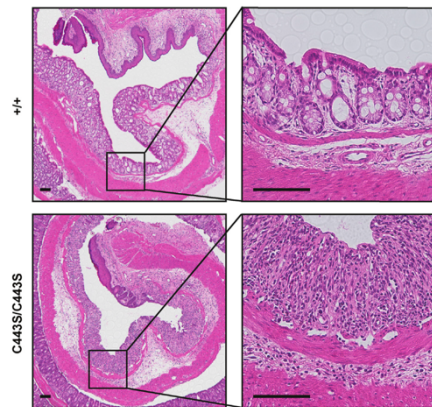


図 5

さらに詳細に検討するため、既に A20 変異 (c. 677del, p. Pro226LeufsTer2) のある患者由来の腸管上皮オルガノイドを既に樹立済みである (図 6)。ヒト初代細胞にてニッケル誘導性の細胞変調の解析を行う。継代においては形態的には変異のないヒト腸管上皮オルガノイドと同じ増殖を認めている。A20 変異のある患者由来オルガノイドにおいてニッケル刺激による電子顕微鏡による膜動態やオートファジーの観察、サイトカイン産生、細胞死などを解析していく。

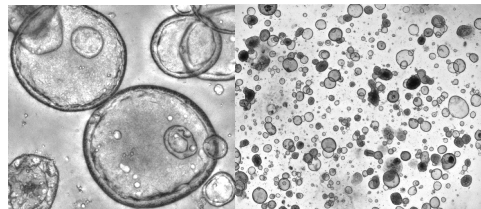


図 6

これらの研究成果から、健康人では遺伝的背景のなく多彩な金属に暴露が増加しても必要量は吸収し余剰分は排泄できるが、クローン病では遺伝的背景があり (A20/TNFAIP3 変異など) 何らかの理由でニッケル粒子が腸管に蓄積し炎症に関与するという仮説を考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tamura Akiko, Ito Go, Matsuda Hiroki, Nibe-Shirakihara Yoichi, Hiraoka Yuichi, Kitagawa Sayuki, Hiraguri Yui, Nagata Sayaka, Aonuma Emi, Otsubo Kana, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi, Oshima Shigeru	4. 巻 628
2. 論文標題 Zranb1-mutant mice display abnormal colonic mucus production and exacerbation of DSS-induced colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 147 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.046	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 Yamada D, Kojima Y, Hosoya A, Suzuki M, Watabe T, Inoue T, Tsugawa N, Asakawa T, Yonemoto Y, Onizawa M, Nemoto Y, Oshima S, Shimonaka M, Kuba K, Ishida J, Fukamizu A, Penninger J M., Watanabe M, Okamoto R, Nagaishi T	4. 巻 647
2. 論文標題 Apelin expression is downregulated in T cells in a murine model of chronic colitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 72 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.01.068	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 該当する

1. 著者名 Matsuda Hiroki, Nibe-Shirakihara Yoichi, Tamura Akiko, Aonuma Emi, Arakawa Satoko, Otsubo Kana, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiiichiro, Shimizu Shigeomi, Ma Averil, Watanabe Mamoru, Uo Motohiro, Okamoto Ryuichi, Oshima Shigeru	4. 巻 592
2. 論文標題 Nickel particles are present in Crohn's disease tissue and exacerbate intestinal inflammation in IBD susceptible mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.111	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 該当する

1. 著者名 Minamidate Ai, Onizawa Michio, Saito Chikako, Hikichi Rie, Mochimaru Tomoaki, Murakami Mai, Sakuma Chiharu, Asakawa Takehito, Hiraoka Yuichi, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Ohira Hiromasa, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 27
2. 論文標題 A potent endocytosis inhibitor Ikarugamycin up-regulates TNF production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101065 ~ 101065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101065	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 Asakawa Takehito, Onizawa Michio, Saito Chikako, Hikichi Rie, Yamada Daiki, Minamidate Ai, Mochimaru Tomoaki, Asahara Shun-ichiro, Kido Yoshiaki, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Ohira Hiromasa, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 56
2. 論文標題 Oral administration of d-serine prevents the onset and progression of colitis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 732 ~ 745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01792-1	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 Morikawa Ryo, Nemoto Yasuhiro, Yonemoto Yuki, Tanaka Shohei, Takei Yuria, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Nozaki Kengo, Mizutani Tomohiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Intraepithelial Lymphocytes Suppress Intestinal Tumor Growth by Cell-to-Cell Contact via CD103/E-Cadherin Signal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.01.014	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 Yonemoto Yuki, Nemoto Yasuhiro, Morikawa Ryo, Shibayama Nana, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Mizutani Tomohiro, Ito Go, Fujii Satoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Single cell analysis revealed that two distinct, unique CD4+ T cell subsets were increased in the small intestinal intraepithelial lymphocytes of aged mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1340048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2024.1340048	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 Himuro Miwa, Wakabayashi Yuka, Taguchi Tomomi, Katahira Takehiro, Suzuki Luka, Iida Hitoshi, Ogiwara Takeshi, Nishida Yuya, Sasaki Shugo, Lynn Francis C., Hiraoka Yuichi, Oshima Shigeru, Okamoto Ryuichi, Fujitani Yoshio, Watada Hirotaka, Miyatsuka Takeshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Novel time-resolved reporter mouse reveals spatial and transcriptional heterogeneity during alpha cell differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 156 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-023-06028-w	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大島 茂、松田浩紀、青沼映美、田村皓子、仁部洋一、渡辺守、宇尾基弘、岡本隆一
2. 発表標題 腸管炎症惹起機構における生命金属の役割
3. 学会等名 第94回日本生化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田浩紀、青沼映美、田村皓子、仁部洋一、渡辺守、岡本隆一、宇尾基弘、大島 茂。
2. 発表標題 生命金属による腸管炎症・惹起機構の解析
3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島 茂、松田浩紀、水谷知裕
2. 発表標題 ゲノム解析によるmonogenic IBDの同定から個別化医療への展開
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:101名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 598
3. 書名 創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術	

〔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	宇尾 基弘  (Uo Motohiro)  (20242042)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	
研究 分担者	岡本 隆一  (Okamoto Ryuichi)  (50451935)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------