様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：２６４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ１１６８０

研究課題名（和文）破骨細胞様細胞を標的とした炎症性腸疾患の新規栄養療法の開発

研究課題名（英文）A development of the novel nutritional approach for inflammatory bowel disease targeting osteoclast-like cells in intestinal tract

研究代表者
竹井　悠一郎（Takei, Yuichiro）

高知県立大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号：１０７１１３７７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：　従来、炎症性腸疾患（IBD）は欧米諸国の疾患とされていたが、近年、日本を含めたアジア諸国、アフリカ、中南米諸国で罹患者数が増加している。IBDの代表疾患である潰瘍性大腸炎（UC)とクローン病は、日本の指定難病に登録されており、発症機序は明らかにされていない。
　本研究では、IBD患者ならびにIBDモデルマウスの病巣部に破骨細胞様細胞（OCLCs）が存在することを発見した。また、UCマウスに破骨細胞の活性を抑制するゾレドロン酸を投与すると、腸管でのOCLCsの発現が減少し、UCの重症度が軽減された。
　以上のことから、IBDの発症・重症化に腸管OCLCsの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　IBDの罹患者数は世界的に増加している。特にUCは、日本の指定難病のなかで日本人の罹患者数トップに位置する疾患である。IBDに関する研究は国内外で多数実施されているが、その根治には至っていない。
　本研究により、骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネートの1つであるゾレドロン酸がIBD治療に役立つことが示された。また、IBD患者の腸管に発現するOCLCsがIBDの発症・重症化に関与することが示唆された。本研究は、腸管OCLCsを標的としたIBD治療の可能性を見出した。今後、副作用の危険性の少ない食事・栄養管理による効果的なIBD発症の防止や病態の寛解を確立するために貢献できるものと期待する。

研究成果の概要（英文）：In the past, inflammatory bowel disease(IBD) had been considered as a typical disease in Europe and US. However, the patients with IBD has been increased in Asia including Japan, Africa and Latin America, recently. Ulcer colitis(UC) and Crohn's disease which are major diseases of IBD, are designated as intractable disease, and their pathological mechanisms are still unclear.
In this study, we discovered that osteoclast-like cells(OCLCs) existed in the lesion sites of intestinal tract from both IBD patients and IBD-model mice. Furthermore, a treatment of zoledronic acid which is a third generation of bisphosphonate to inhibit osteoclastic activity, suppressed the expression of intestinal OCLCs in UC mice, and reduced a severity of the disorder in UC mice. Taken together, these results suggested that intestinal OCLCs has been associated with the pathogenesis and exacerbation of IBD.

研究分野：臨床栄養

キーワード：炎症性腸疾患　破骨細胞

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

従来、炎症性腸疾患（以下、IBD）は欧米諸国の疾患とされていたが、近年、アジアやアフリカ、南米諸国で罹患者数が増加している。とりわけ、日本では、この 30 年あまりで日本人の罹患者数が急激に増加しており、その代表的な疾患である潰瘍性大腸炎（UC）とクローン病（CD）は、日本の指定難病に登録されている。厚生労働省の平成 30 年度衛生行政報告例では、UC の認定件数は 124,961 件、CD の認定件数は 42,548 件と報告されている（研究期間中も増加し続けており、令和 4 年度時点で UC は 141,387 件、CD は 50,184 件）。特に、UC は日本の指定難病のなかで最も認定件数が多い。また、難病指定はされていないが、大腸憩室症・大腸憩室炎も、食の欧米化とともに増加している疾患であり、日本人 6 万人（平均年齢 52 歳）を対象とした疫学調査では、大腸憩室症の罹患率は 18.8％（11,771 人）とされている（PLoS One. 2015;10(4):e0123688.）。IBD の発症機序は十分に理解されていないため、これら疾患に対する治療の主な目的は、炎症抑制と再燃予防であり、抗炎症薬の処方や栄養管理による寛解が主な治療となり、根治には至っていない。しかし、UC や CD は若い頃から好発するため、長期的な治療が強いられ、UC・CD 患者の QOL の低下が懸念されている。

単球/マクロファージ系を前駆細胞とする破骨細胞は、種々の分解酵素や酸を多量に分泌し、硬組織である骨を破壊する。従来、破骨細胞は骨組織にしか発現しないと考えられていたが、研究代表者らは、破骨細胞に極めて類似した細胞（以下、OCLCs とする）が骨外軟組織である動脈に発現し、OCLCs が血管組織を破壊し、動脈瘤を発症させ、動脈の解離および破裂に深く関与することを明らかにした（Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36(9):1962-1971.）。そのため、マクロファージを多数保有する腸管粘膜においても OCLCs が発現し得ると考えた。特に、炎症は破骨細胞分化を促す因子であるため、IBD 患者の腸管には OCLCs が発現し、疾患の発症・重症化に深く関わっているのではないかと予想立てた。

２．研究の目的

本研究の目的は、OCLCs の IBD 発症・重症化への関与を明らかにすることであり、また、OCLCs を標的とした IBD 治療法、また、積極的な栄養療法を確立することを目指している。

３．研究の方法

１）IBD 患者の腸検体の解析

研究協力者である稲田涼医師はじめ、高知医療センターの医師から、摘出術によって得られた検体を、随時、凍結切片を作製し、破骨細胞に特異的に発現する酵素 tartrate-resistant acid phosphatase（TRAP）を染める（通称，TRAP 染色）ことにより、腸管組織における OCLCs の発現を確認した。

２）IBD モデルマウスの解析

IBD モデルとして最も汎用性の高い DSS 誘導性 UC モデルマウス（以下、UC マウス）、ならびに TNBS 誘導性 CD モデルマウス（CD マウス）を作製し、ヒト腸検体同様に解析を行った。UC マウスの作製には ddy 雄性マウスを用い、デキストラン硫酸ナトリウム塩（DSS）を水道水に 3%の濃度になるように溶解させ、自由飲水により投与した。投与後、3 日頃から血便を呈した。CD マウスの作製には BALB/c 雄性マウスを用い、イソフルランによる吸引麻酔下で TNBS を直腸から 18 ゲージのゾンデを 4cm 挿入し、0.1ml の 50%エタノールに TNBS を 2mg 溶かし結腸に投与した。TNBS 投与後 6 日に解剖し、検体を入手した。実験当初、CD モデルマウスの作製に ddy 雄性マウスを用い試みたが、直腸からの TNBS の投与に難航し、他の先行研究で使用されている BALB/c 雄性マウスを用いたところ、作製に成功した。

３）IBD における腸管 OCLCs の役割についての解析

UC マウスに骨粗鬆症治療薬であり、破骨細胞を死滅させるビスホスホネート製剤であるゾレドロン酸をマウスの眼窩から 200mg/kg 投与し、UC の病態に与える影響を検討した。DSS およびゾレドロン酸を投与しない C 群、3%DSS のみを導入した U 群、3%DSS 導入前にゾレドロン酸を投与した UZ 群に分けた。C 群と U 群にはゾレドロン酸の溶媒の PBS を同容量投与した。3%DSS 導入後 4 日後に解剖を行った。

４）腸管における OCLCs の発現機構の解析

破骨細胞の鍵因子である RANKL は、骨芽細胞および骨細胞で産生されるため、骨組織においてのみ破骨細胞形成が誘導されると考えられている。長年、骨免疫学を牽引している東京大学の高柳広らは、近年、腸管上皮層直下のパイエル板に RANKL を発現する間葉系幹細胞（Microfold 細胞誘導細胞）を同定した（Nature Immunol. 2017;18(6):675-682.）。しかしながら、腸管 OCLCs の報告はまだない。RANKL 中和抗体であるデノスマブを 250mg/mouce の用量（対象群には抗トリニトロフェノール抗体を使用）で、3%D SS 導入 1 日前、1 日後、3 日後に計 3 回腹腔内投与し、3%D SS 導入 4 日後に解剖を行った。DSS およびデノスマブを投与しない C 群、3%DSS のみを導入した U 群、3%DSS およびデノスマブを投与した UD 群に分けた。

５）食成分による IBD の病態抑制効果の検討

破骨細胞を抑制させる食成分を IBD モデルマウスに投与し、IBD の病態に対する影響を検討する（未実施）。

４．研究成果

１）IBD 患者の腸検体における OCLCs の発現

研究期間までに研究協力機関から得られた腸検体（UC1 検体、大腸憩室炎 11 件、虫垂炎 4 検体）であった。研究期間内に CD 患者の外科手術を実施例がなく、CD 検体は得られなかった。凍結切片を作製し、TRAP 染色を行った結果、UC1 検体で陽性反応が、大腸憩室炎 6 検体と虫垂炎 2 検体でも陽性反応が確認された（図 1）。

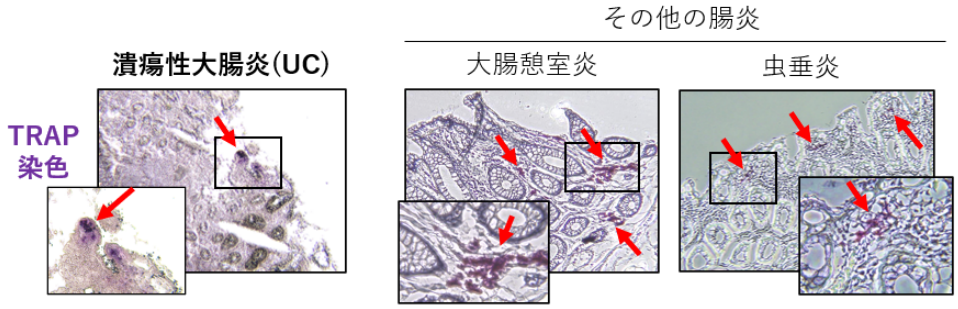

図1 ヒトIBD腸検体におけるOCLC発現

手術により摘出された腸検体を用い、TRAP染色を行った結果、腸管OCLCが確認された（上図、矢印）。OCの検出数を右の表に示した。

疾患	陽性数/入手した検体数
潰瘍性大腸炎	1検体/1検体
クローン病	未入手
大腸憩室炎	6検体/11検体
虫垂炎	2 検体/4検体

２）IBD モデルマウス大腸における OCLCs の発現

DSS 誘導性 UC モデルマウス（以下、UC マウス）、および TNBS 誘導性 CD モデルマウス（以下、CD マウス）の大腸検体で、TRAP 陽性反応を示す OCLCs が確認された（図 2）。

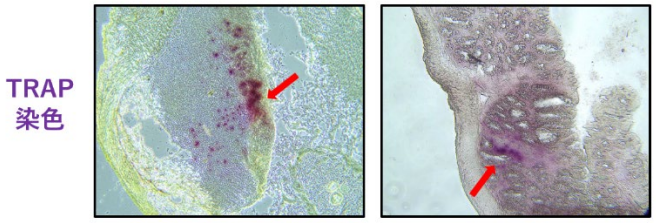

図2 マウスIBD大腸検体におけるOCLC発現

3%DSS水投与後3日のUCマウスの大腸検体、およびTNBS投与後6日のCDマウスの大腸検体を用い、TRAP染色を行った結果、OCLCsが確認された（両図、矢印）。

３）ビスホスホネート製剤による UC 重症度の減少

UC 重症度の判定には、臨床的に用いられる DAI スコアを参考に評価した（図 3）。その結果、DAI スコアの 3 項目（体重減少、便形状、出血の程度）のうち、便形状と出血の程度で、U 群と比較し、UZ 群で有意に重症度が低下した。また、データには示さないが、腸管における OCLCs の発現も UZ 群で低下していた。

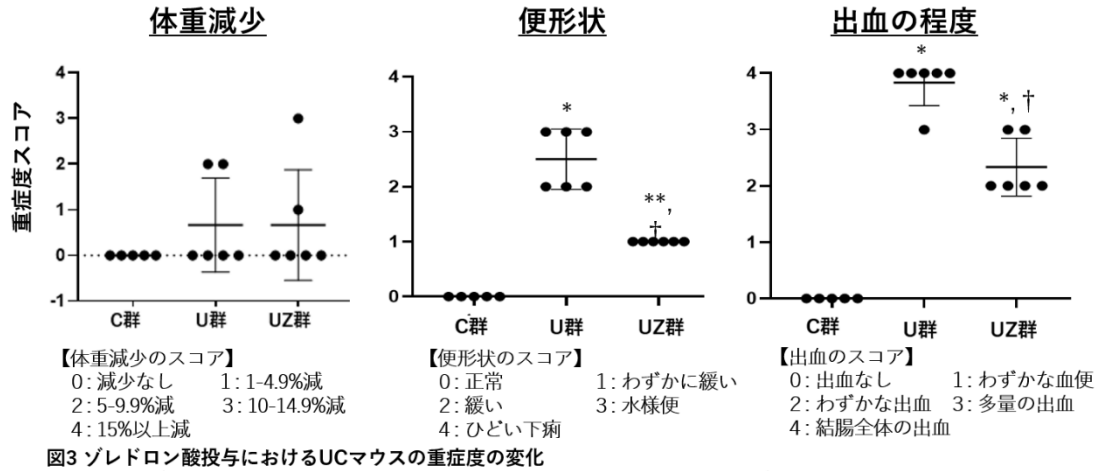

図3 ゾレドロン酸投与におけるUCマウスの重症度の変化

DSSおよびゾレドロン酸を投与しないC群、3%DSSのみを導入したU群、3%DSS導入前にゾレドロン酸を投与したUZ群に分け、DSS導入後4日後に解析を行った。*P< 0.01 vs C群、†P< 0.01 vs U群。

4）腸管 OCLCs の発現機構の解析

RANKL 中和抗体デノスマブの UC 重症度に与える影響を検討した結果、DAI スコアの 3 項目のいずれも、U 群と UD 群で有意な差はみられなかった（図 4）。また、腸管 OCLCs の発現に対しても影響はみられなかった。

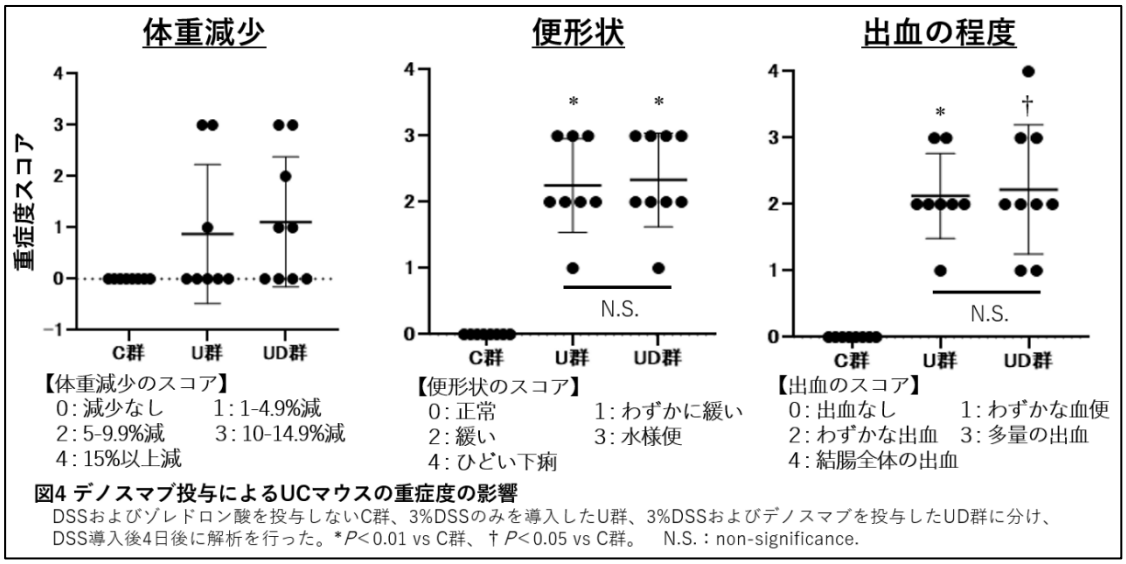

図4 デノスマブ投与によるUCマウスの重症度の影響

DSSおよびゾレドロン酸を投与しないC群、3%DSSのみを導入したU群、3%DSSおよびデノスマブを投与したUD群に分け、DSS導入後4日後に解析を行った。*P< 0.01 vs C群、†P< 0.05 vs C群。　N.S.：non-significance.

研究代表者らの先行研究では、血管 OCLCs の発現には、炎症性サイトカイン TNFa と Ca 沈着（血管石灰化）が重要であり、RANKL 非存在下でも OCLC への分化が認めることを明らかにしている。腸管は食物から Ca を吸収する臓器であるため、腸管自体が石灰化しないために石灰化阻害因子である MGP（Matric Gla Protein）を高発現している。実際に UC マウス大腸検体を von kossa 染色にて石灰化部を染色したところ、腸管での石灰化は認められなかった（データは示さない）。

以上のことから、腸管 OCLCs の発現機構は、RANKL 非依存的機序が関わっているのもと思われる。しかしながら、腸管では石灰化がみられないため、血管 OCLCs の発現機構とは異なる系が存在することが示唆された。

5）食成分による IBD の病態抑制効果の検討について

IBD モデルマウスの検討が想定以上に時間を要したこと、また、腸管 OCLCs の発現機構の解明が完遂していないことから、期間内に食成分の効果の検討を実施できなかった。しかし、候補となる食成分は既に決定しており、今後、その効果を検討することや、食成分の導入形態の検討を行っていく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 竹井悠一郎、中城仁暉、隅田有公子
２．発表標題 腸管TRAP陽性細胞が潰瘍性大腸炎の発症・重症化に関与する
３．学会等名 第42回日本個追代謝学会学術集会
４．発表年 2024年

１．発表者名 遠藤愛月、竹井悠一郎、隅田有公子、別役由香、松本あすか、村上尚.
２．発表標題 潰瘍性大腸炎の発症・重症化における腸管破骨細胞の影響について
３．学会等名 第56回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会
４．発表年 2023年

１．発表者名 竹井悠一郎
２．発表標題 骨外軟組織に発現する破骨細胞様細胞の臓器障害への関与
３．学会等名 第2回日本医学会連合 Rising Star リトリート
４．発表年 2023年

１．発表者名 掛水花音、加島陽菜、新垣翼、隅田有公子、稲田涼、十萬敬子、澁谷祐一、福井康雄、竹井悠一郎
２．発表標題 炎症性腸疾患の新規治療法開発を目指して　～ヒト検体の解析～
３．学会等名 第54回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会／第7回日本栄養改善学会四国支部学術総会合同大会
４．発表年 2021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	隅田　有公子 (Sumida Yukiko) (70781897)	高知県立大学・健康栄養学部・講師 (26401)	
研究分担者	田中　守 (Tanaka Mamoru) (00612350)	中部大学・応用生物学部・准教授 (33910)	

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