

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14821

研究課題名（和文）炎症性腸疾患の病態制御を目指した成分栄養療法の炎症制御メカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of inflammation control by ED therapy for the pathological control of inflammatory bowel disease.

研究代表者

窪田 篤人（Kubota, Atsuhito）

北海道医療大学・薬学部・助教

研究者番号：70879931

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）：炎症性腸疾患（IBD）の病態には、炎症を抑制する制御性T細胞（Treg）が関与することが報告されている。Tregは芳香族炭化水素受容体（AhR）によって誘導されるが、成分栄養（ED）に含まれる複数の化合物やその代謝物についてレポーター細胞株を用いてAhR活性を測定した。その結果、EDに豊富に含まれるトリプトファンの代謝物がAhRの強力なアゴニストになる事を見出した。その活性は、IBD治療のキードラッグである5-ASAの2～4倍であり、Tregを誘導し、IBDモデル動物の炎症を抑制する事が明らかとなった。以上の結果は、EDが保存的治療のみならず炎症制御機能を有する事を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成分栄養療法（ED）は、IBDにおける消化管の保存的治療や栄養補充として経験的に用いられてきた。一方、近年の臨床論文ではEDに炎症制御作用を示唆するものが複数散見される。本研究では、EDに含まれるトリプトファンが生体内で代謝されAhRを介しTregを誘導する事を見出した。これは、EDがIBDの炎症を抑制し治療に貢献し得る事を示す基礎的エビデンスとなる。EDによる炎症制御機構が明らかになったことから、今後のIBD治療における成分栄養療法の立ち位置を変え、新たな薬物-栄養相互作用など発展的な研究の基礎となると予想する。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) has been reported to involve regulatory T cells (Treg) that suppress inflammation. Treg are induced by aromatic hydrocarbon receptors (AhR), and AhR activity was measured for several compounds and their metabolites in elemental diet (ED) using reporter cell lines. We found that metabolites of tryptophan, which are abundant in EDs, are potent agonists of the AhR. Its activity was 2-4 times higher than that of 5-ASA, a key drug in the treatment of IBD, and it was found to induce Tregs and suppress inflammation in animal models of IBD. These results suggest that EDs have an inflammation-regulating function as well as a conservative treatment.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症性腸疾患 芳香族炭化水素受容体 成分栄養療法 制御性T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

IBD は消化管の原因不明の慢性炎症を特徴とした再燃と寛解を繰り返す疾患である。近年の臨床研究では、成分栄養剤による周術期管理が再燃や合併症を抑制することが示された (Brennan GT. et al. 2018)。加えて成分栄養療法は、腸管の保存的治療として経験的に使用されてきた経緯があるが、抗 TNF 抗体製剤と併用することで治療効果の向上や二次無効率が低下することが報告されている。以上の事から成分栄養剤が何らかの炎症制御機能を有する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

IBD 患者における成分栄養剤の処方率は不明であり、また成分栄養剤に含まれる有効成分についてもエビデンスが乏しい。従って本研究では、成分栄養剤がどのように、どのような経路を辿って IBD の病態を制御し炎症を抑制するか明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

成分栄養剤による腸管内環境の変動解析

- 腸内細菌叢の変化：メタ 16S シークエンス解析を行った。
- 有効成分の推定：IBD モデルとして汎用される DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを用い、炎症を制御する有効成分並びにその代謝産物を LC/MSMS やレポーターアッセイを用いて解析した。また有効成分の作用機序を推定する目的で、in silico ドッキングシミュレーションを用いた解析を行った。
- 制御性 T 細胞誘導能の解析：炎症制御に関与する制御性 T 細胞 (Treg) の解析をフローサイトメトリーを用いて行った。
- 輸送機構の推定：有効成分を輸送することが予想される輸送担体について、リアルタイム PCR 法を用いて解析した。

改変成分栄養療法の有効性解析

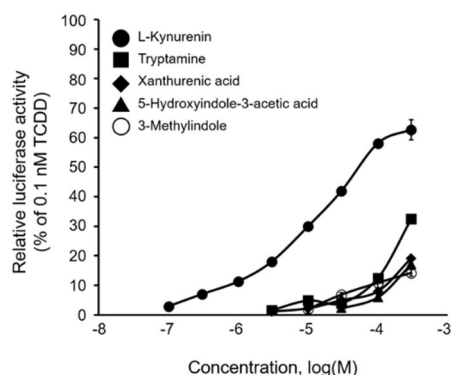
で見出された有効成分を強化した成分栄養剤を用いて、IBD モデル動物並びに通常マウスの Treg 誘導能を解析した。

成分栄養療法の実態調査

成分栄養療法の実施状況について、完全匿名化されたレセプトデータベースである JMDC Claims Database から最新の IBD 患者データを購入手、44,328 名の患者について成分栄養療法の実施率を解析した。

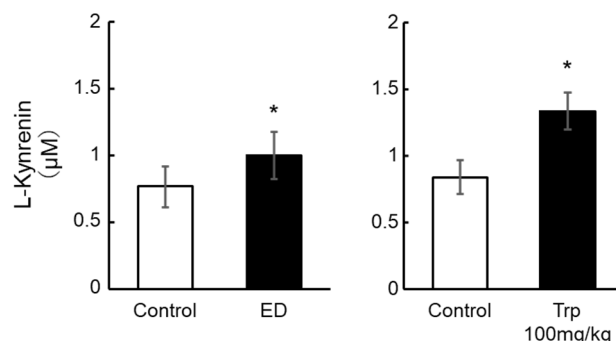
4. 研究成果

(1) IBD のキードラッグである 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) は、AhR を介して Treg を誘導することが示唆されていた。そこで本研究では、in silico ドッキングシミュレーションを用いて 5-ASA 並びに成分栄養剤 (ED) に含まれる成分及びその代謝産物について AhR との結合能を推定した。その結果、5-ASA 並びにトリプトファン (Trp)、Trp 代謝産物の一部が AhR と結合する可能性が示された。以上の結果から、高感度 AhR レポーター細胞株である DR-EcoScreen 細胞を用いて、AhR リガンド活性化能を調べたところ 5-ASA、L-Kynurenin、Tryptamine、Xanthurenic acid、5-Hydroxyindole-3-acetic acid、3-Methylindole に AhR 活性化能がある事を見出した (Kubota A. et al. *Pharmacology*. 2022, IF=3.1. Kubota A. et al. *Int Mol Sci*. 2024, IF=6.2)。



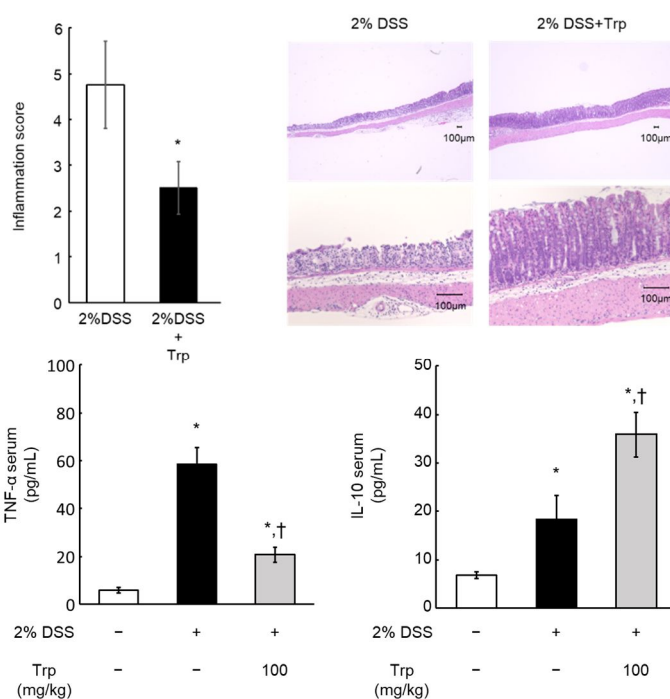
(2) 炎症制御に深く関与する Treg は AhR やヒストンジアセチル化酵素の阻害によって誘導されることが知られている。従って筆者らは、ED 及び Trp が Treg 誘導能を有するか in vivo 並びに ex vivo 脾臓初代培養系を用いて検討を行った。その結果、ED 及び Trp の経口投与は

マウス Treg を誘導することが明らかとなった。
 加えて、初代培養系においても Treg が誘導されることが分かった。Treg 誘導に
 関与する有効成分を推定するためにマウス血清中の Trp や代謝産物を LC/MSMS
 で測定した結果、レポーターアッセイでリガンド活性を示す濃度と同程度に L-
 Kynurenin(L-Kyn) が上昇することが分かった。



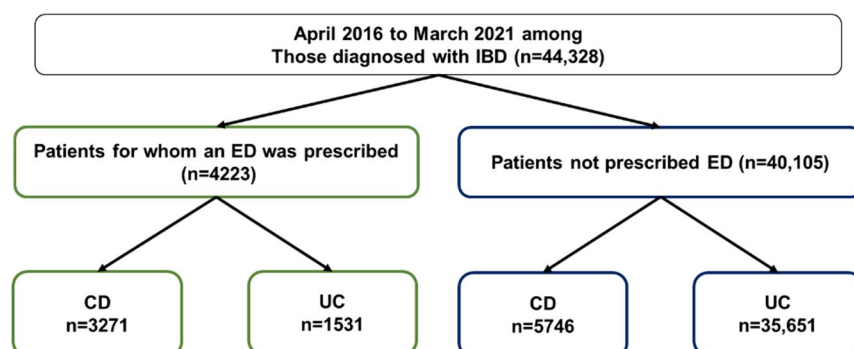
L-Kyn はレポーターアッセイにおいて、0.1, 0.3 μM において殆ど AhR 活性を示さなかった一方で、1 μM では AhR の定型的なア
 ゴニストである TCDD の 1 割程度にリガンド活性を示す。従って、成分栄養剤における炎症制
 御機構に Trp 並びに代謝産物である L-Kyn が関与している可能性が示された。

(3) さらに IBD モデルである DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを用いた
 検討では、Trp の投与が炎症を抑制する事を見出した。この炎症制御機構
 を明らかにすべく、血清中のサイトカインを測定したところ炎症時に上
 昇する腫瘍壊死因子 (TNF) が有意に減少し、炎症を抑制するインター
 ロイキン (IL)-10 が有意に上昇する事も見出した。



IL-10 は Treg によって分泌されることが知られており (Robtsov YP, et al. Immunity. 2008) TNF- の分泌も抑制することから ED 並びに Trp によく炎症制御機構は AhR を活性化することで Treg が誘導され、IL-10 分泌が上昇し、炎症誘導性のサイトカインを抑制することで起こることが示唆された。なお、これらの有効成分の輸送に関しては、遺伝子の網羅解析並びにリアルタイム PCR 解析から候補となる輸送担体を推定済みであり、現在論文を執筆中である。

(4) 成分栄養剤は、経験的に腸管の保存的治療に用いられるほか、ハーフ ED 療法としてクローン病患者に用いられることが知られている。一方、本邦における処方実態を解析した報告は無く、大規模レセプトデータベースを用いて解析を行った。2016年から2021年にIBDと診断され



た患者 44,328 名解析した結果、約 1 割である 4223 名の患者に ED が処方されていることが分かった。その内訳はクローン病 (CD) 3271 名、潰瘍性大腸炎 (UC) 1531 名であり、CD のみならず多くの UC 患者にも使用されていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubota Atsuhito, Imai Shungo, Aoyagi Ryoichi, Murase Wataru, Terasaki Masaru, Sugawara Mitsuru, Takekuma Yoh, Kojima Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Immunoregulatory Effects of Elemental Diet and Its Ingredient, Tryptophan, via Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3448 ~ 3448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25063448	査読の有無 無
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 Kubota Atsuhito, Terasaki Masaru, Takai Rie, Kobayashi Masaki, Muromoto Ryuta, Kojima Hiroyuki	4. 巻 107
2. 論文標題 5-Aminosalicylic Acid, A Weak Agonist for Aryl Hydrocarbon Receptor That Induces Splenic Regulatory T Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology	6. 最初と最後の頁 28 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520404	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 Kubota Atsuhito, Terasaki Masaru, Sakuragi Yuuta, Muromoto Ryuta, Ikeda-Araki Atsuko, Takada Hideshige, Kojima Hiroyuki	4. 巻 238
2. 論文標題 Effects of benzotriazole UV stabilizers, UV-PS and UV-P, on the differentiation of splenic regulatory T cells via aryl hydrocarbon receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 113549 ~ 113549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2022.113549	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳亮一、窪田篤人、今井俊吾、八木澤啓司、沖洋充、山崎浩二郎、小島弘幸、菅原満、武隈洋
2. 発表標題 大規模レセプトデータベースを活用した炎症性腸疾患患者における HBV スクリーニング検査と核酸アナログ製剤の医療経済学的検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田篤人
2. 発表標題 5-ASAによる脾臓Treg誘導と機序の解明
3. 学会等名 第12回日本炎症性腸疾患学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田篤人
2. 発表標題 炎症性腸疾患の病態制御に対する免疫学的アプローチ
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2022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

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