

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15949

研究課題名(和文)腸管と脳の症状緩和に基づいた潰瘍性大腸炎の新規抗酸化剤治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new antioxidant treatment for ulcerative colitis based on intestinal and brain symptom relief

研究代表者

小山 佳久(Koyama, Yoshihisa)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40397667

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)：潰瘍性大腸炎は大腸粘膜に潰瘍やびらんができ、寛解と再燃を繰り返して慢性化する原因不明難治性疾患である。病態に伴う神経症状は再燃の主な要因であるため、腸と脳両方の症状緩和に有効な根治薬の開発が求められる。酸化ストレスが病態に関わるため、抗酸化物質が有効な治療薬となりうる。シリコン(Si)製剤は水と反応して抗酸化物質である水素を大量かつ持続的に発生する。Si製剤が水素と生体内抗酸化物質の活性硫黄による抗酸化及び抗炎症作用を介して潰瘍性大腸炎モデルマウスの下痢などの病態だけでなくストレス対処能力低下などの神経症状も緩和した。Si製剤は寛解と再燃の悪循環を断ち切る有効な治療薬になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎は潰瘍性大腸炎の患者数は国内で22万人以上に上り、世界では日本はアメリカに次いで2番目に多い国となる。原因不明、難治性疾患のため根本治療がないため、治療薬の開発は急を要する。シリコン製剤による治療は生体内を抗酸化物質で常に満たしておくことによって炎症部位も含めた全身をケアするという画期的な抗酸化治療である。また、これまでの報告で水素は副作用がないことから、シリコン製剤は高齢者や妊婦さんなどにも処方できる可能性が高い。それゆえ、シリコン製剤は老若男女全ての患者さんに対応可能な、再燃を抑え寛解を維持できる新たな治療薬候補として潰瘍性大腸炎の治療に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Ulcerative colitis (UC) is an idiopathic intractable, in which ulcers and erosions develop in the mucous membrane of the colon and become chronic with repeated remissions and relapses. Since the neurological symptoms associated with the pathology are a major factor in relapses, there is a need for the development of radical drugs that are effective in alleviating symptoms in both the gut and the brain. Since oxidative stress is involved in pathology, antioxidants can be effective therapeutic agents.

Silicon (Si)-based agent react with water to generate a large amount of hydrogen, which is an antioxidant, continuously. Through the antioxidative and anti-inflammatory effects of hydrogen and active sulfur, a bio-antioxidant, Si-based agent improved the neurological symptoms (abnormal stress coping, etc.) as well as the pathology (diarrhea, etc.) in UC mouse models. It was suggested that Si-based agent may be effective therapeutic agents to break the vicious cycle of remission and relapse.

研究分野：神経形態学

キーワード：潰瘍性大腸炎 酸化ストレス 水素 活性硫黄 神経症状

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は主として粘膜にびらんや潰瘍を形成する大腸の特発性、非特異的炎症性疾患である。下痢や血便、腹痛の症状を呈し、重症になると、発熱、体重減少、倦怠感や貧血などの全身症状が起こる。病変は直腸から連続的に上行性に広がる性質で、最大直腸から結腸まで拡大する。寛解と再燃を繰り返しながら、慢性化する。原因はいまだ不明で、免疫病理学的機序や心理学的要因の関与が考えられ、難治性疾患として国に指定されている。現在の主な治療は対症療法であり、再燃時に同じ治療薬が効かなくなることが多々あるため完治は難しい。一方、大腸の炎症が脳腸相関を介して脳機能にも影響を与えるため、大腸炎患者は増悪期にうつ病や不安障害など精神疾患を発症するリスクが高い¹。再燃には主に精神症状が関与しており、大腸炎症と精神症状の悪循環によって大腸炎の完治が難しくなる。炎症の持続によって大腸がんを発症するリスクが高くなるため、潰瘍性大腸炎は治療によって寛解をめざし、寛解を長期にわたって維持していくことが大事である。**潰瘍性大腸炎の患部である大腸だけでなく、再燃に関わる脳も治療していくことが潰瘍性大腸炎の完治に重要となる。**

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎の発症原因の一つに酸化ストレスの関与が挙げられる²。呼吸代謝の副産物である活性酸素は、DNA、脂質やタンパク質など様々な生体構成物質を酸化する。生体内には、スーパーオキシドディスムターゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素が存在しており、速やかに活性酸素を除去することができる。通常、生体内における活性酸素と抗酸化物質の作用均衡は保たれているのだが、その均衡が崩壊すると生体に悪影響を及ぼす。これを“酸化ストレス”という。酸化ストレスは神経変性疾患、虚血性疾患、炎症性疾患や代謝性疾患など様々な疾患の発症や症状悪化の原因となる。潰瘍性大腸炎の症状緩和に抗酸化物質投与が有効であり、実際にビタミンCやポリフェノール類など抗酸化能を有する食事は大腸炎の症状を緩和する^{3,4}。しかし、これらの抗酸化物質は生体に必要な活性酸素も消去するため、大量投与や長期投与は副作用をもたらす危険が高い。それゆえ、**生体に有害な活性酸素であるヒドロキシラジカルのみを特異的に中和する副作用のない抗酸化物質の投与が大腸炎治療に必要となる。**

近年、水素が特異的に有害な活性酸素(ヒドロキシラジカルなど)を無毒化することによって、炎症性疾患、代謝性疾患や神経性疾患など様々な疾患の症状を改善する報告が多くなされている⁵。水素は透過性に優れ、副作用がないことから抗酸化剤として非常に有用であるが、投与方法に多くの課題がある。主な生体内投与方法は、水素ガス吸入か水素水飲用である。しかし、前者は可燃性ガスゆえ爆発の危険性があった一般家庭での使用が難しく、後者は水素が微量(約1.6ppm)しか水に溶解できず、その優れた透過性ゆえ充填水素濃度を保持することも困難である。それゆえ、**水素の安定的かつ安全な生体内投与方法が望まれる。**

大阪大学産業科学研究所の小林光教授が開発したシリコン製剤は中性に近い水と反応することによって多量の水素を長時間発生させることができる⁶。それゆえ、製剤を経口摂取すれば、腸管内で常時大量の水素を安定して発生させることができ、細胞を酸化する有害な活性酸素ヒドロキシラジカルを中和できると考えた。実際、シリコン製剤は酸化ストレスが関与するパーキンソン病や腎不全の症状緩和に有効性を示した⁷。本研究では、シリコン製剤の潰瘍性大腸炎に対する有効性とその作用機序解明に取り組み、潰瘍性大腸炎における大腸と脳の両部位の症状を緩和する有害な活性酸素特異的な抗酸化剤治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1). 潰瘍性大腸炎モデルマウス作製、病態解析及び採材

大腸特異的に炎症を誘発するデキストラン硫酸ナトリウム5%含有飲水を7週齢のC57BL/6Jマウス(日本SLC)に与えることによって潰瘍性大腸炎モデルマウス(UCマウス)を誘発した。シリコン製剤は、潰瘍性大腸炎モデルマウス作製1週間前より、食餌(AIN93M:オリエンタル酵母)に2.5%混ぜることによって与えた(Si群)。AIN93Mだけを与えたマウスをコントロール群とし(Con群)、比較解析を行った。病態は大腸炎スコア(病態の悪化度)、磁気共鳴画像(MRI)解析(大阪大学先導的学際研究機構吉岡芳親教授との共同研究)などによって評価した。体重減少、便の硬さ及び血便について数値化し、3項目の平均値を大腸炎スコア値とした。健常は0、大腸炎最大活性時は4となる。また、採血後、4%パラホルム固定液によってかん流固定を行い、大腸や脳の採材を行った。

(2). 水素計測

腸管内発生水素量は、ガスクロマトグラフィー(東亜DKK株式会社)を用いて計測した。深麻酔下にて、大腸、小腸や胃を回収してガラスチューブに入れた。20分静置後、チューブ内の気層に含まれる水素量を計測した。

(3). 病理解析

潰瘍性大腸炎の主病変である大腸の炎症状態を調べるため、肉眼所見による大腸の長さ計測や大腸のパラフィン包埋切片を用いた、HE染色や免疫細胞のマーカー抗体の免疫組織化学法による解析を行った。

(4). 酸化ストレス解析

全身の酸化ストレスを調べるため、血中酸化代謝物を酸化還元装置REDOXLIBRA(株式会社ウイスマー)による計測などを行った。また、大腸の酸化ストレスは、過酸化脂質連鎖反応のマーカーである4-HNE抗体による免疫組織化学及び硫黄代謝物網羅的解析であるサルファーインデックス解析(筑波大学大津巖生先生との共同研究)などによって調べた。

(5). 潰瘍性大腸炎モデルマウスの神経症状解析

大腸炎に伴う内臓痛や内臓不快感は、関連神経核（孤束核、迷走神経運動路核）の活性を神経活動マーカーである c-Fos 抗体を用いた蛍光免疫染色法で解析した。また、大腸炎に伴うストレス対処能力低下は、行動試験である強制水泳試験によって検討した。

4. 研究成果

(1). シリコン製剤経口投与によって、マウス腸管内の含有水素量が増加した

ガスクロマトグラフィーによって腸管内水素量を測定したところ、Con 群と比べて、Si 群では増加傾向を示した(図 1 左図)。

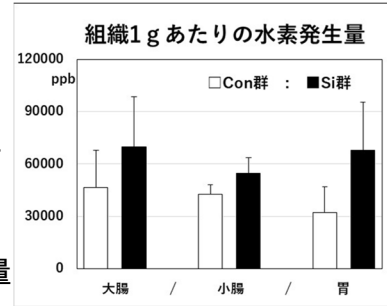
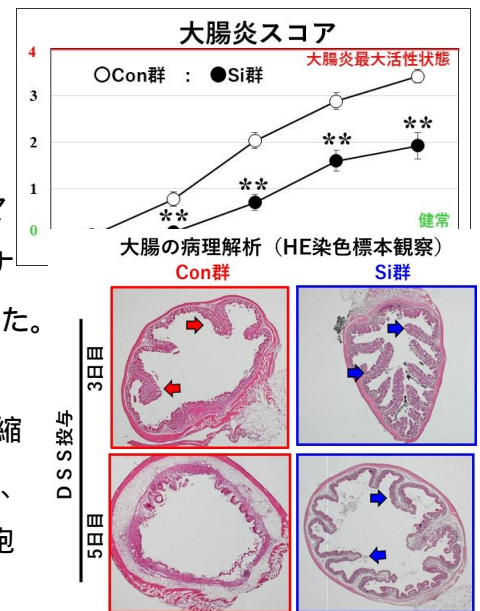


図 1
シリコン製剤投与で消化管内の水素量増加(左図)及び大腸炎の病態進行の緩和(下図)が観察された。有意差検定**P < 0.01

(2). シリコン製剤は UC マウスの病態を緩和した

大腸炎発症後潰瘍性大腸炎モデルマウスは毎日に病態が悪化していくが、Si 群は病態悪化が有意に緩和されていた(図 1 右図)。また、発症 5 日目の潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いた MRI 解析では、Con 群は炎症を示す強いシグナルが大腸に検出されたが、Si 群はシグナルが抑制されていた。



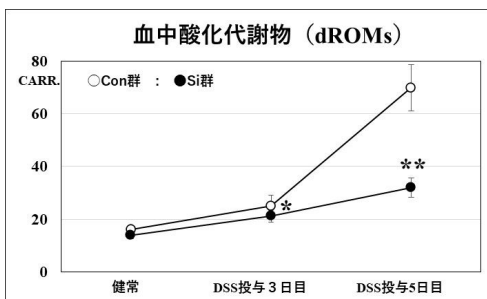
(3). シリコン製剤は UC マウスの大腸の炎症を緩和した

Con 群は炎症によって大腸が短縮するが、Si 群は有意に短縮が抑えられていた。さらに、HE 染色や免疫組織化学法より、Con 群と比べて潰瘍性大腸炎に伴う大腸構造崩壊や免疫細胞浸潤が Si 群で有意に緩和されていた(図 2)。

(4). シリコン製剤は UC マウスの酸化ストレスを緩和した

Con 群は大腸炎発症後血中酸化代謝物(dROM 値)がゆるやかに増加し、3日目から5日目にかけて急激に増加するが、Si 群は増加を有意に抑えていた(図 3)。また、大腸炎に伴う大腸上皮の脂質酸化も Si 群では抑制されていた。さらに、サルファーインデックス解析の結果、Con 群は大腸炎の進行に伴って大腸が酸化するが、Si 群は強力な生体抗酸化物質である活性硫黄の発現量を増加することで、病態に伴う大腸の酸化が抑制された(図 4)。

図 2: 結腸横断 HE 写真 シリコン製剤投与で結腸構造崩壊が抑制された。矢印: 結腸ひだ



酸化ストレス
高い
↑
低い
↓

図 3: dROMs 試験による血中酸化代謝物測定結果。

大腸炎に伴う全身の酸化ストレスをシリコン製剤は緩和した。
有意差検定: **P < 0.01, *P < 0.05

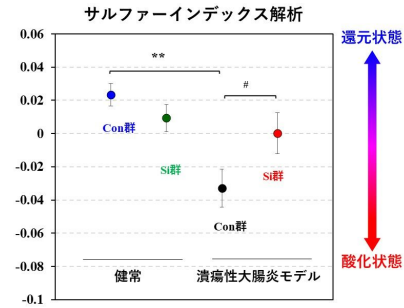
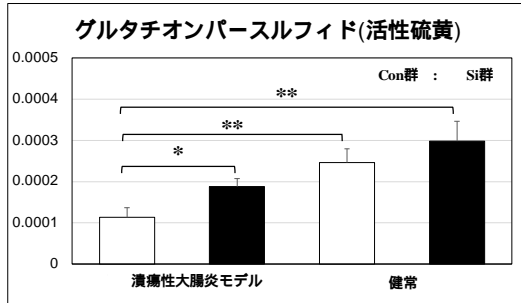


図4：サルファーインデックス解析（硫黄化合物代謝物の網羅的解析）結果。

シリコン製剤は生体内抗酸化物質である活性硫黄の発現を増加する(左図)ことで、潰瘍性大腸炎に伴う大腸の酸化を緩和した(右図)。

有意差検定：** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$

(5) シリコン製剤はUCマウスの神経症状を緩和した

大腸炎発症5日目では、孤束核や迷走神経運動路核におけるc-Fosの発現がCon群では観察されたが、Si群ではほとんど観察されなかった(図5)。また、大腸炎発症に伴いCon群ではストレス対処能力の異常、すなわち無動時間の減少が観察されたが、Si群ではそのような異常は緩和されていた。

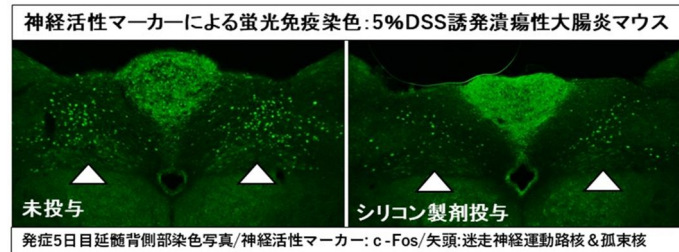


図5：神経活動マーカー、c-Fos抗体による蛍光免疫染色写真。シリコン製剤は大腸炎に伴う内臓知覚関連の神経活性を抑制し

本研究において、シリコン製剤は潰瘍性大腸炎モデルマウスの下痢、体重減少、大腸炎症などの病態だけでなく内臓不快感、内臓痛、ストレス対処能力低下などの神経症状も緩和することが証明された。また、シリコン製剤は表面から発生する水素や生体内の強力な抗酸化物質である活性硫黄の発現増強を介して抗酸化及び抗炎症作用を示すことも明らかとなった。患部である大腸だけでなく脳にも効果を発揮することから、シリコン製剤は寛解導入及び長期寛解維持が可能な潰瘍性大腸炎の新規治療薬候補として期待される。

参考文献

- 1 . PLoS One, 2022
- 2 . Nature, 2011.
- 3 . Food Chem. 2015.
- 4 . Oxid Med Cell Longev 2015.
- 5 . Nature Medicine, 2007.
- 6 . J Nanopart Res.2019.
- 7 . Sci Rep, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Koyama Yoshihisa, Kobayashi Yuki, Hirota Ikuei, Sun Yuanjie, Ohtsu Iwao, Imai Hiroe, Yoshioka Yoshichika, Yanagawa Hiroto, Sumi Takuya, Kobayashi Hikaru, Shimada Shoichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Author Correction: A new therapy against ulcerative colitis via the intestine and brain using the Si-based agent	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19609-3	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山佳久、小林悠輝、廣田郁詠、Yuanjie Sun、大津厳生、今井裕恵、吉岡芳親、柳川博斗、鷺見拓哉、小林光、島田昌一
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の新規治療薬の開発
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
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
---------	---------