

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614016

研究課題名(和文) 小腸の消化吸収機能の低下を感知する新しい血液マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of new biomarkers for small intestinal malabsorption

研究代表者

岩本 淳一 (IWAMOTO, JUNICHI)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10384950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：小腸の消化吸収機能低下を感知する新しい血液バイオマーカーを探索する目的で、小腸型クローン病、潰瘍性大腸炎の血中コレステロール関連化合物を分析した。小腸型クローン病では潰瘍性大腸炎や正常対照者と比較して、胆汁酸合成マーカーの7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4)とコレステロール合成マーカーのlathosterolが有意に上昇し、胆汁酸の小腸への分泌を反映するfibroblast growth factor 19 (FGF19)とCYP3A4の活性を反映する4 $\alpha$ -hydroxycholesterol (4 $\alpha$ -HC)は有意に低下しこれらは回腸吸収障害血液マーカーになりうる。

研究成果の概要(英文)：To explore new biomarkers for small intestinal malabsorption, we determined serum concentrations of cholesterol related compounds in patients with CD or ulcerative colitis (UC). The concentrations of 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4), a marker for bile acid synthesis, and lathosterol, a marker for cholesterol biosynthesis, were significantly elevated while the levels of fibroblast growth factor 19 (FGF19), a marker for intestinal bile acid flux, and 4 $\alpha$ -hydroxycholesterol (4 $\alpha$ -HC), a known marker for CYP3A4 activity, were reduced in CD patients compared with UC patients and controls. These changes were more evident in ileal-resected CD patients. In contrast, serum plant sterols, markers for intestinal cholesterol absorption, were not significantly changed in all CD patients. These results showed that serum C4, FGF19, lathosterol and 4 $\alpha$ -HC were good biomarkers for ileal malabsorption, which can be used for differential diagnosis of ileal diseases from jejunal or colorectal diseases.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：クローン病

1. 研究開始当初の背景

消化吸収機能の評価方法としては脂肪出納試験, D-キシロース吸収試験, Vit B<sub>12</sub> 吸収試験, 乳糖負荷試験, アンチトリプシンクリアランス試験などがあるが, いずれも外来で頻繁に行えるほど容易な検査ではない。従って実際には, 血清アルブミン値やコレステロール値などの非特異的な指標を消化吸収障害のマーカーとして用いているのが実情である。従って, 肝障害で上昇するトランスアミナーゼやビリルビンのように, 負荷テストによらず, しかも高い感度・特異度で空腸と回腸の消化吸収機能低下(または傷害)を評価できる血液マーカーの開発が望まれる。これまで行ってきた消化管傷害患者の診断・治療および脂質の消化・吸収・代謝に関する基礎研究を通じ, 血液マーカーの候補物質としては, 消化・吸収機構が複雑で最も障害が起きやすい「脂質関連物質」が最良であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は小腸におけるコレステロール関連脂質の消化・吸収・代謝機能に着目し, 小腸の機能低下(または傷害)の部位と程度を, 高い感度と特異度で感知できる血液マーカーの開発を目的とした。これらマーカーの血中濃度が小腸疾患で変動するメカニズムを明らかにすると同時に, 病変部位や疾患活動度とこれらマーカー物質濃度との関係を, 代表的小腸疾患であるクローン病と非小腸疾患である潰瘍性大腸炎の血清を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 患者血清の収集

クローン病, 潰瘍性大腸炎, および正常者(健診対象者)のうち同意の得られたものから, 通常採血時の残血清を収集し, 分析まで-20℃で凍結保存した。クローン病については, 活動指数(CDAI)の評価と病変部位の検索を行い, 潰瘍性大腸炎についても重症度診断基準(厚生省調査研究班 1994)による評価と罹患範囲の検索を行った。また, 治療薬の有無(有りの場合はその内容)を記録した。

(2) 血清コレステロール関連脂質の分析

通常の臨床検査項目のほかに, 図1に示す5種類の対象物質群を定量した。コレステロール合成中間産物(Lathosterol), 植物ステロール(Sitosterol, Campesterol), オキシステロール(4-, 25-, 24S- および27-ヒドロキシコレステロール(HC))は, 血清5μLを使用し, 重水素標識された内部標準ステロールの添加, 1N KOH/エタノール中でアルカリ加水分解, ピコリン酸誘導体化を経て, HPLC-ESI-MS/MSにて同時定量した。FGF19は血清100μLを使用し, 市販のELISAキットで定量した。胆汁酸合成中間産物の7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one(C4)は血清20μLを使用し, 重水素標識さ

れた内部標準ステロールの添加, ピコリン酸誘導体化を経て, HPLC-ESI-MS/MSにて定量した。

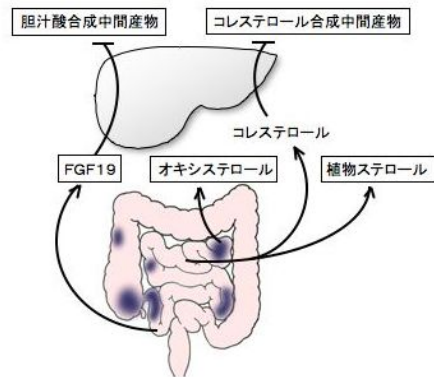


図1. 小腸の消化吸収障害によって影響を受けると考えられる血清の脂質代謝マーカー物質

4. 研究成果

(1) コレステロールの吸収と合成マーカー

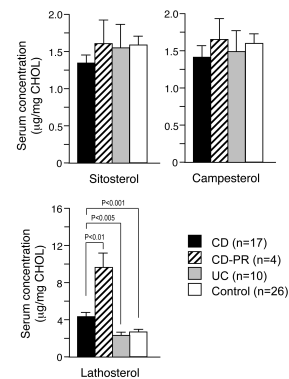


図2. クローン病と潰瘍性大腸炎患者におけるコレステロールの吸収と合成マーカー

CD, 手術歴のないクローン病; CD-PR, 遠位回腸切除後のクローン病; UC, 潰瘍性大腸炎

図2に示すようにコレステロールの吸収マーカーとされる Sitosterol と Campesterol はクローン病でも潰瘍性大腸炎でも有意な低下を示さなかった。一方, コレステロールの合成マーカーとされる Lathosterol はクローン病で有意に上昇し, 特に遠位回腸切除後の症例で顕著であった。

(2) オキシステロール

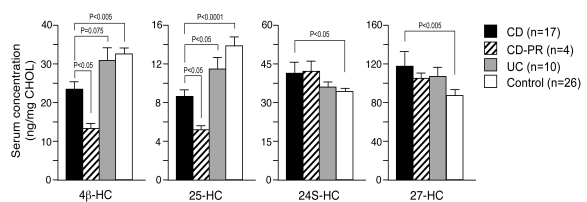


図3. クローン病と潰瘍性大腸炎患者における血中オキシステロール濃度

血中オキシステロール濃度は図3に示すように, クローン病で4-HCと25-HCの減少を認め, その減少は遠位回腸切除後の症例で顕著であった。一方, 24S-HCと27-HCはクローン病で軽度上昇傾向を認めたが, 診断的価値は低いと考えられた。

### (3)胆汁酸の合成と分泌マーカー

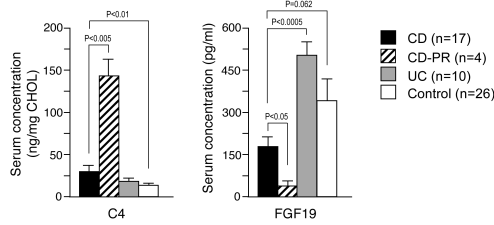


図4．クローン病と潰瘍性大腸炎患者における胆汁酸の合成と分泌マーカー

胆汁酸の合成を 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one(C4)にて、また胆汁酸の回腸への分泌を FGF19 にて評価した。図4に示すように、胆汁酸合成マーカーの C4 はクローン病で有意に上昇し、特に遠位回腸切除後の症例で顕著であった。一方、胆汁酸の回腸への到達によって血中に分泌される FGF19 はクローン病で有意に減少し、遠位回腸切除後の症例で顕著であった。

### (4) 考察

今回我々が調べた中で、小腸の消化吸収機能の低下を最も鋭敏に感知できたのは胆汁酸関連のマーカーであった。遠位回腸に消化・吸収障害を有するクローン病では、胆汁酸の再吸収が減少し、それによって肝での胆汁酸合成、ひいてはコレステロール合成も亢進していた。また、胆汁酸プールの減少を反映して、血中 FGF19 は低下していた。Lathosterol, C4, FGF19 という3つの血中物質を定量することにより、回腸の障害度を評価することができるものと考えられた。また、潰瘍性大腸炎のような大腸の障害時にはこれら3つの指標には異常を認めず、臨床的に下痢の原因が回腸性か大腸性かの鑑別に有用であると考えられた。今回空腸疾患の症例での検討ができなかったが、コレステロールの吸収は主に空腸で行われることから、空腸疾患では血中植物ステロールの低下が認められるものと推測される。今後症例が得られれば追加検討を行いたい。

当初の目的ではなかったが、今回の一連の検討により、血中 C4 濃度と 4 $\beta$ -HC または 25-HC との間に負の相関関係が認められた(図5)。4 $\beta$ -HC と 25-HC は CYP3A によって合

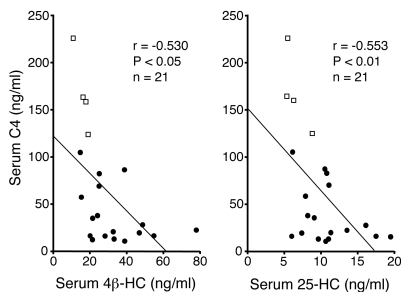


図5．血清 C4 濃度と CYP3A4 由来オキシステロール濃度との相関

手術歴のないクローン病； 遠位回腸切除後のクローン病

成されることがわかっており、腸肝循環する胆汁酸が減少すると、腸管および肝臓の CYP3A 発現が低下する可能性が示唆された。CYP3A は核内レセプター Pregnane X receptor (PXR) の標的遺伝子であり、胆汁酸が PXR のリガンド(活性化因子)であることが報告されていることから、腸管と肝臓での正常な CYP3A 発現には胆汁酸が重要であると考えられた。回腸に障害を有する患者では、CYP3A によって代謝される薬物の血中濃度が上昇しやすい可能性があり、注意が必要であることが示唆された。

### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- Iwamoto J, Honda A, Miyamoto Y, Miyazaki T, Murakami M, Saito Y, Ikegami T, Miyamoto J, Matsuzaki Y. Serum carnitine as an independent biomarker of malnutrition in patients with impaired oral intake. 査読有, J. Clin. Biochem. Nutr.2014;55:221-227 DOI:10.3164/jcfn.14-77.
- Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Kohjima M, Nakamuta M, Matsuzaki Y. Increased serum oxysterol concentrations in patients with chronic hepatitis C virus infection. 査読有 ,Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014;446:736-740. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.01.176.
- Iwamoto J, Saito Y, Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, Matsuzaki Y. Bile acid malabsorption deactivates pregnane X receptor in patients with Crohn's disease. 査読有, Inflamm. Bowel Dis. 2013;19:1278-1284. DOI:10.1097/MIB.0b013e318281f423.
- Miyazaki T, Ikegami T, Nagai Y, Saitoh E, Nguyen A, Matsuzaki Y, Kobayashi K, Ceryak S. Bicarbonate attenuates irinotecan-induced cytotoxicity through regulation of both extracellular and intracellular pHs in intestine cell line. 査読有, J. Cancer Ther. 2013;4:944-952. DOI:10.4236/jct.2013.45106.
- Honda A, Ikegami T, Nakamuta M, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Saito Y, Takikawa H, Imawari M, Matsuzaki Y. Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. 査読有, Hepatology 2013;57:1931-1941. DOI:10.1002/hep.26018.
- Shang Q, Guo GL, Honda A, Saumoy M, Salen G, Xu G. FGF15/19 protein levels

in the portal blood do not reflect changes in the ileal FGF15/19 or hepatic CYP7A1 mRNA levels. 査読有, J. Lipid Res. 2013;54:2606-2614. DOI:10.1097/MIB.0b013e318281f423. Iwamoto J, Saito Y, Honda A, Matsuzaki Y. Clinical features of gastroduodenal injury associated with long-term low-dose aspirin therapy. 査読有, World J. Gastroenterol. 2013;19:1673-682. DOI:10.3748/wjg.v19.i11.1673.

〔学会発表〕(計6件)

岩本淳一, 本多 彰, 松崎靖司. クロウン病における胆汁酸代謝異常・脂肪酸代謝異常とNASH合併との関連性についての検討. 第56回日本消化器病学会大会(ワークショップ), 神戸 10/23-26, 2014.

本多 彰, 池上 正, 宮崎照雄, 松崎靖司. 加齢と生活習慣病によるコレステロール(CHOL)代謝の変化. 第13回日本抗加齢医学会総会(シンポジウム), 横浜 6/29, 2013.

岩本淳一, 本多 彰, 齋藤吉史, 村上 昌, 門馬匡邦, 小西直樹, 屋良昭一郎, 伊藤真典, 平山 剛, 池上正, 松崎靖司. ステロール解析を用いたクローン病におけるコレステロール吸収マーカー・合成マーカーの検討. 第9回日本消化管学会学術集会, 東京 1/25, 2013.

岩本淳一, 本多 彰, 宮崎照雄, 齋藤吉史, 池上 正, 松崎 靖司. クロウン病における核内レセプターPregnane X receptorの活性低下と胆汁酸吸収障害の影響. 第49回日本肝臓学会総会, 6/6-7, 2013.

岩本淳一, 本多 彰, 松崎靖司. クロウン病における肝の薬物代謝活性低下のメカニズム. 第98回日本消化器病学会総会(ワークショップ), 東京 4/19-21, 2012.

岩本淳一, 本多 彰, 松崎靖司. クロウン病における低コレステロール血症の発症機序と栄養指標としての意義について. 第20回日本消化器関連学会週間(パネルディスカッション), 神戸 10/10, 2012.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本 淳一(IWAMOTO, Junichi)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10384950

(2)研究分担者

本多 彰(HONDA, Akira)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10468639

宮崎 照雄(MIYAZAKI, Teruo)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60532687

(3)連携研究者

なし