

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780306

研究課題名(和文)セロトニン環境に着目した犬の炎症性腸疾患の病態解析

研究課題名(英文) Analysis on serotonin-related environment of gastrointestinal tissue in canine inflammatory bowel disease.

研究代表者

井手 香織 (Ide, Kaori)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40550281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの過敏性腸症候群(IBS)や炎症性腸疾患(IBD)の病態には腸管クロム親和性細胞(EC細胞)が産生するセロトニン(5-HT)が深く関与している。本研究ではこれに着目した犬IBDの病態解析を行った。まず免疫組織化学染色によって犬十二指腸粘膜組織中に特徴的な5-HT陽性細胞を確認し、犬のEC細胞であると考えた。そしてこの細胞は健康犬群と犬IBD群で数に差が認められた。さらに5-HT産生に関わる酵素TPH1、組織中の5-HT除去機構であるSERTの遺伝子mRNA量を両群で解析し明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

症状と腸粘膜生検の結果より臨床的に犬のいわゆる炎症性腸疾患(IBD)と診断される症例の中には、特徴が似るものの実際には異なる要因のものが混在していると考えられており、未知の病態を明らかにすることは、各症例に応じたより適切な治療法の開発につなげるために必要である。本研究では、ヒトの過敏性腸症候群との関連で知られる消化管ホルモン・セロトニンに着目してIBD犬群の病態解析を行った。その結果、IBD犬群では健康群に比べて腸粘膜組織中のセロトニン産生細胞の数が有意に多く、セロトニン再取り込み機構の遺伝子転写量が低かった。犬IBDにおいても腸のセロトニン機構の異常が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Serotonin (5-HT), a gut hormone produced by enterochromaffin cell (EC cell), is essential key factor responsible for pathophysiology of inflammatory bowel disease (IBD) and irritable bowel syndrome (IBS) in humans. This current study focused on intestinal 5-HT environment and analyzed its differences between healthy dogs and dogs with IBD.

Immunohistochemistry with canine duodenum mucosal tissue revealed characteristic cells positively stained with anti-5-HT antibody, which was suspected as canine EC cells. The number of these cells were significantly different between canine IBD group and healthy controls. Realtime RT-PCR analysis for TPH1 and SERT gene mRNA using total RNA from duodenal mucosal tissue were also analyzed and compared in the two groups.

These results correspond to the characteristics seen in human IBS patients and some human IBD patients.

研究分野：獣医学

キーワード：セロトニン 犬 慢性腸症 炎症性腸疾患 過敏性腸症候群 腸管クロム親和性細胞

1. 研究開始当初の背景

消化管の正常な運動や分泌機能を調節するしくみの一つに消化管ホルモンがある。中でもセロトニン (5-hydroxytryptamine; 5-HT) は、医学分野において、過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome; IBS) をはじめ炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD)、セリアック病、腸感染症、大腸癌といった多くの消化器疾患との関連が盛んに研究されている。

セロトニンはその 95%が消化管 (特に小腸) に存在することが知られており (Cetin, *et al.*, PNAS, 1994)、消化管粘膜上皮に散在する腸管クロム親和細胞 (enterochromaffin cell; EC 細胞) から産生・分泌され、周囲へ拡散することによって作用する。消化管の平滑筋、神経線維、腸細胞にはセロトニン受容体が存在する。7 種類あるサブタイプの中では特に 5-HT₃ と 5-HT₄ 受容体が消化管の運動や分泌といった重要な生理機能に深く関与している。一方、分泌されたセロトニンは周囲の消化管上皮細胞に存在するセロトニントランスポーター (serotonin reuptake transporter; SERT) によって組織中から除去され、最終的にモノアミン酸化酵素によって分解される (図 1)。

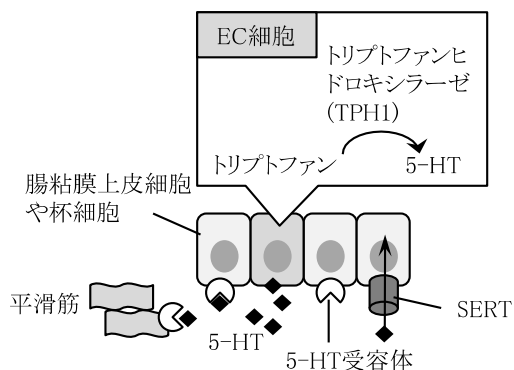


図 1: 消化管におけるセロトニンと関連因子

ヒトの消化器疾患のうちセロトニンとの関係が最も有名なものは IBS であるものの、近年では IBD においてもセロトニンの関与が示されつつある。IBS は、感情的要素や食事など様々な因子によって下痢や便秘などの消化器症状が誘発される消化管の機能障害と定義され、これまでは器質的な異常は見られないとされてきた。しかし近年、IBD のように消化管粘膜に組織学的な炎症像を伴うケースや、腸内細菌に対する免疫学的な応答異常が存在する場合は認識されており (Barbara, *et al.*, Gastroenterology, 2004, 他)、これにセロトニンの異常が関与している可能性を示唆する研究結果が報告されている (Atkinson, *et al.*, Gastroenterology, 2006)。腸炎のマウスを用いた研究では、腸に浸潤した T 細胞から放出された Th2 サイトカインが EC 細胞の増加を促し、Th1 および Th2 サイトカインが

SERT を抑制したことによって、病変部においてセロトニンの過剰状態が生じていたことが明らかとなった (Wang *et al.*, Gut, 2007, 他)。セロトニンが多く存在すると、消化管内への粘液分泌や消化管運動が過剰な状態となるため下痢や腹痛といった症状に繋がる。さらに、5-HT が樹状細胞や T 細胞などの免疫担当細胞に作用し炎症性サイトカインの放出を刺激することも明らかとなった (Li, *et al.*, Am J Pathol, 2011, Leon-Ponte, *et al.*, Blood, 2007)。なお、ヒトの IBD 患者では、EC 細胞の数や 5-HT 含有量に異常が認められたという報告がある (Coates, *et al.*, Gastroenterology, 2004, 他) ほかに、長期寛解が得られる IBD 患者のおよそ半数に IBS 様の症状が見られることも知られている (Simren, *et al.*, Am J Gastroenterol, 2002)。このように近年では、IBD と IBS の病態にオーバーラップする部分があると考えられ、その鍵をセロトニンおよび関連因子が握っている可能性が示唆されているのである。

	ヒト IBS/IBD	犬 IBD
5-HT 産生	亢進, EC 細胞増加	? (本研究で解析)
SERT (5-HT 除去)	抑制, 発現低下	? (本研究で解析)

小動物臨床における IBD は、発生頻度が高い割に原因や病態に依然として不明な点が多い疾患である。確定診断は、他の消化器疾患を出来る限り除外し、腸粘膜生検の病理組織学診断をもとにおこなうしかなく、IBD が“診断のゴミ箱”になりがちな現状がある。標準の治療に対する反応が症例によって様々であることから、犬 IBD の中には他にも病態の異なるサブタイプが複数存在していると考えており、その一つとして、犬 IBD においても上記のようなセロトニンとその関連因子に変化がある可能性は十分に考えられた。これまで犬の炎症性消化器疾患でセロトニンと関連づけた検討はされておらず、本研究では初めて明らかにし、犬 IBD の病態を新しい方向から検討した。

2. 研究の目的

(1) 犬の十二指腸粘膜組織中の EC 細胞の特定、そして健常犬群と犬 IBD 群における十二指腸組織中 EC 細胞数の比較

(2) 犬の十二指腸粘膜組織を用いた、SERT および TPH1 遺伝子 mRNA 定量、健常犬群と犬 IBD 群との比較

3. 研究の方法

(1) 犬の十二指腸粘膜組織における 5-HT 陽性 EC 細胞の分布および数の解析: 消化管内視鏡下粘膜生検によって全身麻酔下の犬から十二指腸粘膜組織を採材した。組織切片を作成し、5-HT に対する免疫組織化学染色を行い、5-HT 陽性細胞 (EC 細胞に相当) の特徴および分布や数を検討した。

(2) 犬の十二指腸粘膜組織中の *SERT* および *TPHI* 遺伝子 mRNA 定量解析：上記同様、消化管粘膜生検により採取した犬の十二指腸粘膜組織から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、*SERT* および *TPHI* 遺伝子 mRNA 量を定量し、健常犬群と犬 IBD 群の結果を比較した。

4. 研究成果

(1) 犬の 5-HT 陽性細胞：これまで犬の消化管において 5-HT 免疫組織化学染色をもちいて EC 細胞を特定した報告はなく、また抗犬 5-HT 抗体がない状況であったため、交叉反応する抗体を用いた予備実験にて条件を検討した。その結果、ヒトやマウスで報告のある免疫組織化学染色所見と同等の結果、つまり基底膜側を底辺とした三角形に近い形をした、細胞質内に 5-HT 陽性顆粒を含んだ細胞が上皮細胞の列に散在していることが明らかとなった (図 2)。これが犬の EC 細胞である可能性が高いと考えられた。

次に、健常犬群と犬 IBD 群で十二指腸粘膜組織中の 5-HT 陽性細胞数を比較した。すると、犬 IBD 群の方が健常犬群に比べてその細胞数が有意に多いことが明らかとなった (図 3)。

このことから IBD 罹患犬では十二指腸において EC 細胞が健常犬よりも増加している可能性が示唆された。

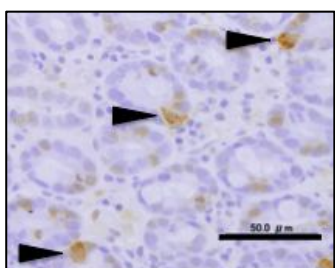


図 2: 犬十二指腸粘膜組織で確認された 5-HT 陽性細胞。
(bar = 50μm)

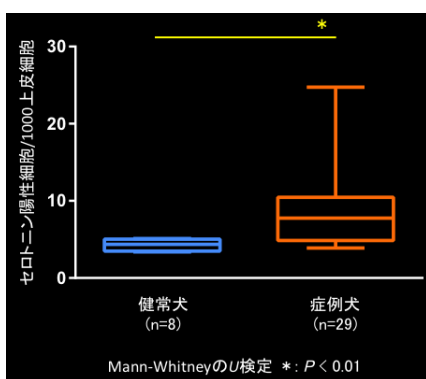


図 3：健常犬群と犬 IBD 症例犬群における十二指腸組織中 5-HT 陽性細胞数の比較

(2) *SERT* および *TPHI* 遺伝子 mRNA 定量解析：両遺伝子 mRNA を特異的に検出するプライマーを予備実験において設計したうえで用いた。まず、十二指腸粘膜組織中の *SERT* 遺伝子 mRNA 量は、犬 IBD 群全体の結果は健常犬群に比べて有意に低いことが明らかとなった。一方の *TPHI* 遺伝子 mRNA 量は、両群

に有意差は認められなかった (図 4)。さらに、犬 IBD 群の中には *SERT* 遺伝子 mRNA 量が特に低い亜群と *TPHI* 遺伝子 mRNA 量が特に低い亜群の 2 群に分かれた。後者は数が少なかった (マイノリティー) ため、疾患群全体としては *TPHI* 遺伝子 mRNA 量に健常犬群との差が認められなかったものの、それらの値は健常群の値を大きく逸脱していた。

以上のことから、犬 IBD では十二指腸組織中における 5-HT 除去機構である *SERT* の発現が健常犬よりも低下している可能性が示唆された。また、5-HT 産生に必要な *TPHI* は全体として両群で変化はないことが示唆された。

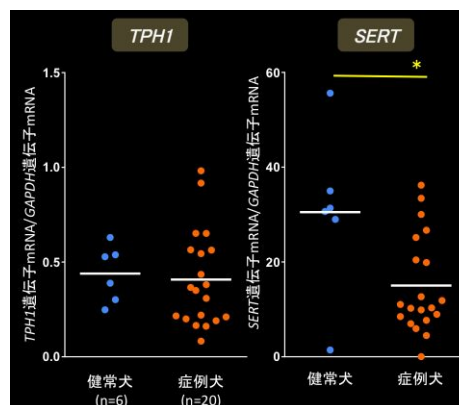


図 4: 健常犬群と犬 IBD 群の十二指腸組織における *SERT* および *TPHI* 遺伝子 mRNA 量の比較 (* $P < 0.05$)

本研究全体の考察として、IBD 罹患犬の十二指腸においては、5-HT を産生する EC 細胞が増数しており *SERT* の発現が低下している可能性が考えられた。これはヒトの IBD 患者の一部や IBS 患者で報告されている特徴と合致しており、EC 細胞や *SERT* の機能的な面から考察すると、犬 IBD の十二指腸組織では 5-HT 過剰状態である可能性が推察された。また、EC 細胞の増数と裏腹にこの細胞が持つと言われる *TPHI* の発現に変化がないことから、EC 細胞 1 個あたりの *TPHI* 発現が低下している可能性も推察された。本研究は、犬 IBD において 5-HT 環境が正常から明らかに逸脱していることを初めて明らかにしたものであり、このことは本症候群の隠れた病態の 1 つである可能性が十分に考えられた。今後、本研究結果を足がかりとしたより詳細な解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件) 執筆中

〔学会発表〕 (計 1 件)

①大井剛, 西藤公司, 井手香織, 健常犬と慢性腸症の犬におけるセロトニンに関する検

討, 第 34 回動物臨床医学会年次大会, 2013
年 11 月 16 日, 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat-amc.org/laboratory/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 香織 (IDE KAORI)

東京農工大学大学院農学研究院・講師

研究者番号 : 40550281

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :