

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460941

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患の病態における核内受容体PXR・CARの役割

研究課題名(英文) The role of nuclear receptors PXR/CAR in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.

研究代表者

柿崎 暁 (Kakizaki, Satoru)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80344935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、核内レセプターPXR・CARの炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)の病態における意義を明らかにすることを目的とした。マウスにDSS(dextran sulfate sodium)を投与し潰瘍性大腸炎モデルを作成した。野生型マウスとPXR及びCARのノックアウトマウスを比較し、PXR及びCARは潰瘍性大腸炎を改善させる効果を持ち、その作用機序として、炎症性サイトカイン及びアポトーシスを抑制していることを示した。つまり、PXR及びCARを活性化することが、潰瘍性大腸炎の治療に繋がる可能性があることを証明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the role of nuclear receptors PXR and CAR in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD), including ulcerative colitis and Crohn's disease. Wild-type, Pxr-null, Car-null, and Pxr/Car-double null mice were treated with a PXR/CAR agonist or vehicle in a dextran sodium sulfate (DSS)-induced IBD model. PXR and CAR ameliorate DSS-induced ulcerative colitis model via inhibiting inflammatory cytokines and apoptosis. PXR and CAR agonists are promising agents for the treatment of IBD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 核内レセプター PXR CAR DSS腸炎 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

核内レセプターPXR・CARは、肝臓・腸に高発現し、薬物・異物代謝を制御する核内レセプターとして同定された。我々は、両レセプターの肝疾患における病態を解明してきたが、本研究では、PXR・CARの症性腸疾患の病態における意義・小腸・大腸における生理的役割・生体防御機構への関与を明らかにすることを目的とした。

PXR及びCARは、肝臓だけでなく、小腸・大腸にも発現しており、小腸では薬物・異物代謝酵素、胆汁酸トランスポーターの発現調節を行っている。PXR及びCARは生体異物センサーとしての特性から、腸管粘膜のバリア機構・生体防御・自然免疫に関与していることが示唆される。一方、近年、本邦でも患者数の増加している炎症性腸疾患の病因は不明ではあるが、免疫機構の異常・粘膜バリアの破綻・素因を有する個人に数々の環境因子が作用して発症することが推測されている。

過去に、両レセプターと炎症性腸疾患の関連を示唆する報告としては、ヒトPXRの遺伝子多型と炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)との関連(*Gastroenterology*, 2006;130:341-8)、PXRのLigandによるマウス炎症性腸疾患モデルの改善(*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007;292:G1114-22)などが報告されている。また、原発性硬化性胆管炎と潰瘍性大腸炎は合併することが知られているが、PXRの遺伝子多型は、原発性硬化性胆管炎患者の生存期間に影響することが報告されている(*Gastroenterology*, 2006;131:781-7)。さらに、実際の臨床でもPXR LigandのRifaximinが炎症性腸疾患患者の治療に有用であるとの報告もある。

このように、炎症性腸疾患の疾患感受性・病態とPXR・CARが関与していることが示唆されるが、機序や病態は未だ不明な点が多い。近年、炎症性腸疾患患者は増加し、その病態や治療法の解明は急務であり、本研究課題で、核内レセプターPXR・CARの炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)の病態における意義と治療メカニズムを検討することは有意義と考えられた。

2. 研究の目的

核内レセプターPXR・CARの炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)の病態における意義・小腸・大腸における生理的役割・生体防御機構への関与を明らかにする。両レセプターは、代謝・免疫・炎症の制御にも深く関与しており、PXRと炎症性腸疾患の関連が報告されている。腸管は粘膜バリア機構など、異物代謝・生体防御に重要な役割を担っており、両レセプターの小腸・大腸における意義の解明は重要である。

3. 研究の方法

マウス腸炎モデル・培養細胞・臨床検体

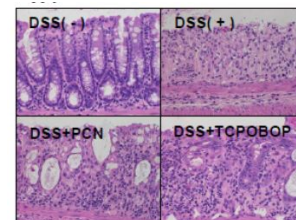
を用いた研究を合わせ、基礎及び臨床の両面から炎症性腸疾患におけるPXR・CARの病態を解明することを目標に、以下の5つの研究計画を立てた。

- (1) DSS潰瘍性大腸炎モデルでノックアウトマウス(PXR KO, CAR KO, PXR・CARダブルKO)を野生型マウス(WT)と比較解析する。
- (2) ノックアウトマウスを用いCAR・PXRの小腸・大腸での生理的役割を解明する。
- (3) PXR・CAR発現腸管上皮細胞でサイトカイン刺激によるシグナル伝達機構を解明する。
- (4) 炎症性腸疾患患者(潰瘍性大腸炎、クローン病)の腸組織におけるCAR・PXR、トランスポーターの発現、CAR・PXRの遺伝子多型と発現の関連を検討する。
- (5) 硬化性胆管炎モデルで小腸トランスポーターとCAR・PXRの関連を検討する

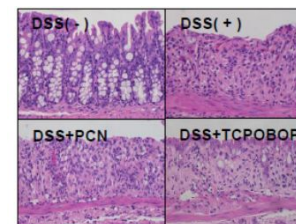
4. 研究成果

- (1) DSS(dextran sulfate sodium)腸炎による潰瘍性大腸炎モデルでの比較検討
大腸炎の比較(組織・体重・直腸出血)
CAR・PXRが野生型(WT)マウスの小腸・大腸に発現していることを確認した。次に、CAR・PXRのWT、KOマウスで炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎)モデルである2.5%のDSS飲水による腸炎モデルを作成した。

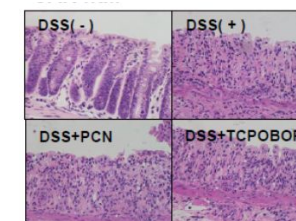
● 野生型マウスでのDSS腸炎組織像



● PXR ノックアウトマウスでのDSS腸炎組織像



● CAR ノックアウトマウスでのDSS腸炎組織像



DSS 腸炎モデルで、KO マウスは WT マウスに比較し、有意に炎症が強く、体重減少、炎症、直腸出血が高度であった。

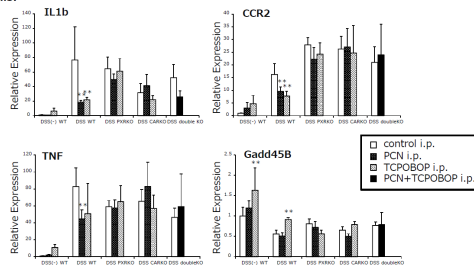
WT マウスに PXR Ligand (PCN) 及び CAR Ligand (TCPOBOP) を投与することにより、体重、炎症、直腸出血が有意に改善した。これらの現象は、CAR・PXR の KO マウスでは観察されなかった。つまり、PXR 及び CAR は、Ligand 依存性に DSS 腸炎による潰瘍性大腸炎モデルを改善させた。

炎症性サイトカイン

DSS 腸炎モデルの腸粘膜では、TNF alpha、IL-1b などの炎症性サイトカインの mRNA が上昇したが、PCN、TCPOBOP はそれらの上昇を抑制した。

つまり、PXR・CAR は炎症性サイトカインの産生を抑制することにより炎症性腸疾患を改善する可能性が示唆された。

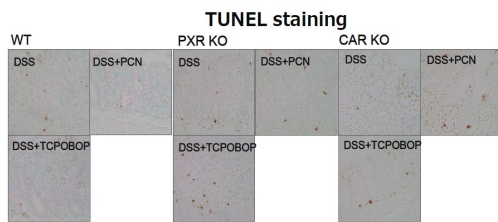
Representative mRNA expression profiles of inflammatory cytokines and apoptotic signals.



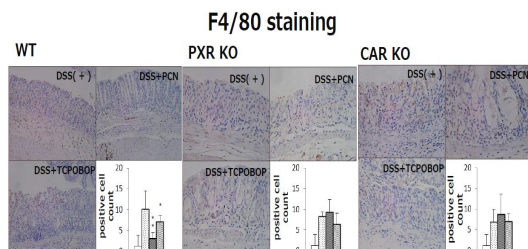
免疫染色 (F4/80 染色、TUNEL 染色)

腸粘膜組織で、F4/80 染色、TUNEL 染色を行い、PXR・CAR はマクロファージなど炎症細胞浸潤を抑制し、さらに CAR はアポトーシスを抑制することを確認した。

● TUNEL 染色



● F4/80 染色



(2) CAR・PXR の小腸・大腸での生理的役割
ノックアウトマウスの解析で、CAR・PXR は大腸の病的状態において、炎症性サイトカインの産生を抑制し、生体に防御的に働くことを示したが、生理的な状況での役割の解明に関しては、今後の課題である。

(3) PXR・CAR 発現腸管上皮細胞でサイトカイン刺激によるシグナル伝達機構

ヒト大腸癌細胞株である LS180 が PXR を発現していることを確認した。LS180 培養細胞を ligand で刺激すると、PXR 標的遺伝子である CYP3A4 及び MRP2 mRNA の発現が誘導された。さらに TNF alpha mRNA の抑制効果が認められた。また、PXR をトランスフェクションした HCT116 細胞で、ligand 投与は TNF alpha 刺激による炎症性サイトカインの発現を抑制することが示唆された。

(4) 炎症性腸疾患患者の腸組織における CAR・PXR の発現と遺伝子多型の解析及び(5) 硬化性胆管炎モデルでの解析

本研究期間では、一定の結果が得られず、今後、研究を継続したいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Sagawa T, **Kakizaki S**, Tomizawa T, et al. Faecal lactoferrin is a useful biomarker for mucosal healing in patients with ulcerative colitis during granulocyte and monocyte adsorptive apheresis therapy. *Colorectal Dis.* 2016;**18**:696-702. doi: 10.1111/codi.13258. 査読有

Sagawa T, Sato K, Tomizawa T, Mizuide M, Yasuoka H, Shimoyama Y, Kuribayashi S, **Kakizaki S**, et al. A prospective randomized controlled trial of AJG522 versus standard PEG+E as bowel preparation for colonoscopy. *Biomed Res Int.* 2015;**2015**:521756. doi: 10.1155/2015/521756. 査読有

Iida T, Okamura S, **Kakizaki S**, et al. Carbon dioxide insufflation reduces the discomfort due to colonoscopy as objectively analyzed by salivary stress markers. *Acta Gastroenterol Belg.* 2013;**76**:219-24. PMID: 23898559 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Kakizaki S, Uehara D, **Yamazaki Y**, **Horiguchi N**, Inoue Y. Development of new therapeutic agents for inflammatory bowel diseases targeting

the nuclear receptor CAR/PXR.
GUMI&AMDE 2016 (第3回群馬大学医療開
発国際シンポジウム, 第8回先端マイク
ロデバイス工学国際会議) 2016年12月
桐生市(日本)

柿崎 暁, 山崎 勇一, Masahiko Negishi.
核内レセプターからみた肝疾患「核内レ
セプターCAR(constitutive androstane
receptor)の肝疾患における役割」
第52回日本肝臓学会総会(ワークショ
ップ) 2016年5月 千葉市(日本)

Tomizawa T, **Kakizaki S**, Sagawa T, et al.
Fecal lactoferrin is a useful
biomarker for mucosal healing in cases
of ulcerative colitis during monocyte
adsorptive apheresis therapy.
APDW2015(アジア太平洋消化器病学会)
2015年12月 台北市(台湾)

Yamazaki Y, Kodama S, **Kakizaki S**, et al.
IGFBP1 mediates pregnane X
receptor-induced morphological
changes and migration of
hepatocellular carcinoma cells.
APDW2015(アジア太平洋消化器病学会)
2015年12月 台北市(台湾)

山崎 勇一, 児玉 進, **柿崎 暁**, 他 肝細胞
癌株におけるIGFBP-1を介した核内受容
体PXR活性化による形態変化、細胞遊走
第57回日本消化器病学会大会 2015年10
月 東京(日本)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿崎 暁(KAKIZAKI, Satoru)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 80344935

(2) 研究分担者

山崎 勇一(YAMAZAKI, Yuichi)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号: 00582404

研究分担者

堀口昇男(HORIGUCHI, Norio)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号: 10550022

(3) 連携研究者

吉成 浩一(YOSHINARI Kouichi)
静岡県立大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号: 60343399

(4) 研究協力者

滝澤 大地(TAKIZAWA, Daichi)
群馬大学・大学院医学系研究科・大学院生

戸島 洋貴(TOJIMA, Hiroki)
群馬大学・大学院医学系研究科・大学院生

田原 博貴(TAHARA, Hiroki)
群馬大学・大学院医学系研究科・大学院生