

令和元年6月28日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450424

研究課題名(和文)腸粘膜組織セロトニン量とトリプトファン可用性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 of serotonin in intestinal mucosa and tryptophan availability in relation to 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸脳相関でも有名なセロトニン(5-HT)は腸の運動や分泌機能を調節する重要な消化管ホルモンである。我々は以前、腸炎の犬では腸粘膜の5-HT産生細胞数が多いことや、5-HT産生酵素や除去機構に関わる遺伝子転写量が健常犬群と異なる症例があることを発見した。

本研究では、5-HTの材料であるトリプトファンおよびその代謝経路に着目して犬の腸炎との関連を調べた。得られた結果の中で最も重要なことは、トリプトファン代謝酵素IDO1(間接的に抗炎症の方向へ作用することが示唆されている)の腸組織中の遺伝子転写量が高い群が腸炎の犬の3割以上を占めており、低蛋白血症や病理組織学的な重症度と相関していたことであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腸炎は犬で最も多い消化器疾患の一つであり、病理組織学的な検索のほか炎症細胞や炎症性サイトカイン、腸内細菌叢との関連など多方向から病態解析が行われている。一方、医学では難治性の腸炎である炎症性腸疾患およびより罹患者数が多い過敏性腸症候群が互いにオーバーラップする部分であるセロトニン機構の異常や、炎症を沈静化する機構と考えられているIDO1経路の変化も腸炎の重要な病態として近年注目されている。本研究は初めてこれらの観点に立った犬の腸炎の基礎的研究であり、得られた知見は犬の慢性腸炎の理解をさらに深める糸口となるほか、一部はトランスレーショナルリサーチとして医学への情報提供にもなる。

研究成果の概要(英文)：Changes in intestinal serotonin (5-HT) system is an important character involving in both Irritable bowel syndrome and Inflammatory bowel disease (IBD) in humans. Authors previously found that serotonin-producing cells in intestinal tissue was increased in IBD dogs, and that transcription levels of genes coding enzyme to produce 5-HT and genes coding factor associated with 5-HT elimination showed different pattern in canine IBD cases.

This study was focused on tryptophan, a precursor to the 5-HT, and its metabolic pathway, and their relations with canine IBD pathophysiology was analyzed. Most important result was that in more than a third of IBD cases, mRNA level of IDO1, an enzyme which metabolize tryptophan and which is known to indirectly act towards anti-inflammatory, was high, which is consistent observation with humans. Moreover, correlations of IDO1 mRNA level with severity of hypoalbuminemia and high histopathologic score was observed.

研究分野：獣医内科学

キーワード：セロトニン トリプトファン 犬炎症性腸疾患 IDO1

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)は医学において、過敏性腸症候群(irritable bowel syndrome; IBS)、炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)、大腸癌、その他多くの消化器疾患との関連が盛んに研究されている。

セロトニンは全身に存在するうちの9割以上が消化管(特に小腸)に存在し(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(図1, 2)。消化管におけるセロトニンの作用で比較的古くから知られているものには、例えば「緊張やストレスを感じると腹痛や下痢が起こる」現象のしくみである「脳腸相関(brain-gut interaction)」を担う中心的な神経伝達物質であることや、消化管運動への作用がある。加えて近年では、消化管粘膜における炎症反応および免疫担当細胞の制御にも関与が示唆されており、IBSやIBDの病態解析における新しい切り口として注目されている(Coates, et al., Gastroenterology, 2004, Wang et al., Gut, 2007, 他)。

ヒトにおいて従来の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が誘発される消化管の機能障害と定義され、器質的な異常は見られないとされてきた。しかし近年では、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ケースが認識されており、これにセロトニンが関与している可能性も報告されている(Barbara, et al., Gastroenterology, 2004, Atkinson, et al., Gastroenterology, 2006, 他)。一方のIBDは特発性に消化管の炎症が惹起される疾患であるが、一部の患者においてEC細胞の数やセロトニン含有量に異常が認められる(Coates, et al., Gastroenterology, 2004, 他)ほか、長期寛解が得られるIBD患者のおよそ半数にIBS様の症状も見られることが知られている(Simren, et al., Am J Gastroenterol, 2002)。つまり近年では、IBDとIBSの病態にオーバーラップがあると考えられ、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。

小動物臨床において犬のIBDは、発生の多い消化器疾患である一方、原因や病態に依然不明な点が多い。重症度もさることながら、標準的な抗炎症療法に対する治療反応性が症例ごとに様々であることから、本疾患は病態の異なる複数のサブタイプが混在するヘテロな集団であると考えられる。浸潤リンパ球のタイピングほか、腸内細菌叢や宿主側の消化管粘膜バリアなど多方面から病態が研究される中、申請者は平成22-23年度の科学

研究費助成事業(若手B)で行った研究で、ある腸管粘膜防御機構が犬IBDで低下していることならびに臨床的重症度との関係等を明らかにした。続いて平成24-25年度の科学研究費助成事業(若手B)の研究では、それまで犬のIBDとの関連が検討されてこなかった消化管粘膜組織における“セロトニン環境”に着目し、IBD症例犬における抗セロトニン抗体陽性細胞(EC細胞に相当)の数が健常犬よりも多いこと、そしてセロトニン産生に必要なトリプトファンヒドロキシラーゼ(TPH1)をコードする遺伝子のmRNA発現量が健常犬群に比べて症例犬群では有意に低下していること、セロトニンが組織中から除去される際に必要なセロトニントランスポーター(SERT)とTPH1をコードする各遺伝子のmRNA発現パターンが、症例犬群において健常犬群から逸脱する2パターン存在することを発見した(第34回動物臨床医学会年次大会, 2013年)。これにより犬IBDにおいても消化管で“セロトニン環境”が変化しているという新たな病態の糸口が示されたことから、本研究でこれを更に追求するに至った。

2. 研究の目的

(1) 犬の血中および消化管粘膜組織中のセロトニン濃度を把握し、健常群とIBD群を比較すること。

(2) セロトニンの前駆体であるトリプトファンおよびその代謝経路(キヌレニン経路)と犬の腸炎との関係を解析すること。

3. 研究の方法

(1) 犬の血中および消化管粘膜組織中のセロトニン濃度の解析: 健常犬およびIBD症例犬から、十二指腸(健常犬は結腸も)粘膜組織を内視鏡下生検によって採取した。血清は、空腹時に採血した血液から分離した。どちらについても犬のセロトニンを測定可能な市販のELISAキットを用いて、5-HT濃度を定量した。

(2) 健常犬とIBD症例犬の十二指腸粘膜組織におけるキヌレニン代謝経路のトリプトファン代謝酵素IDO1とその他セロトニン関連因子(先述のTPH1, SERT)遺伝子の転写量、各種臨床的指標との関連の解析: 健常犬およびIBD症例犬から内視鏡下粘膜生検で採取した十二指腸粘膜組織よりtotal RNAを抽出、これを逆転写し、IDO1, TPH1, SERT各遺伝子の転写量を、リアルタイムPCR法を用いて定量した。健常犬群とIBD症例群との比較に加えて、症例群内では腸炎の臨床スコア(CCECAI, CIBDAIスコア)、炎症マーカー(C反応性蛋白)、血中アルブミン濃度などとの相関性について解析した。

4. 研究成果

(1) 犬の血中および消化管粘膜組織中に含まれるセロトニン量の解析: 空腹時血清中のセロトニン濃度は、IBD症例群の中央値が健常群の中央値の約半分と低い傾向がみとめられたものの、統計学的な有意差は検出されなかった(図1)。腸粘膜組織中のセロトニン

濃度は、健常犬において十二指腸と結腸で比較したところ、両者に差は認められなかったものの、両者の間には正の相関が認められた。

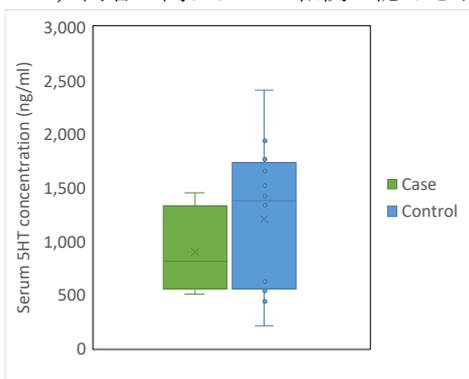


図1 健常群 (Control) と IBD 症例群 (Case) の空腹時血清中のセロトニン濃度

(2) 健常犬と IBD 症例犬の十二指腸粘膜組織におけるキヌレニン代謝経路のトリプトファン代謝酵素 IDO1 とその他セロトニン関連因子 (先述の TPH1, SERT) 遺伝子の転写量、各種臨床的指標との関連の解析：当初の予定に反し、上述の通り、トリプトファン過剰状態がリンパ球へ与える影響を直接的に検討することが困難であったため、ヒトの腸炎で発現が増し、局所のトリプトファンを代謝 (除去) することで炎症抑制性に作用すると言われていたキヌレニン代謝経路の主要な酵素 IDO1 に着目し、その遺伝子転写量を犬の消化管で初めて解析した。その結果、IBD 群と健常犬群で中央値に有意な差は認められなかったものの、*IDO1* 遺伝子転写量が著しく高い個体が IBD 群の 3 割以上を占めていた (図 2)。これらの症例は、臨床的に特に治療抵抗性であり、すべて雄であった。さらに、一方、治療前の臨床スコア (CCECAI) や炎症マーカー (C 反応性蛋白) との相関は検出されなかった。一方、症例群における消化管粘膜組織中 *IDO1* 遺伝子転写量は、血漿アルブミン濃度と負の相関を示し (図 3)、腸炎の病理組織学的重症度の指標である WSAVA スコア (Washabau *et al.*, J Vet Intern Med 2010) と正の相関を示した (図 4)。

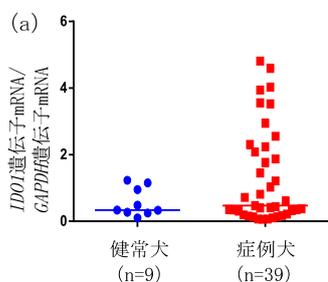


図2 健常群と IBD 症例群における消化管粘膜組織中 *IDO1* 遺伝子 mRNA 転写量

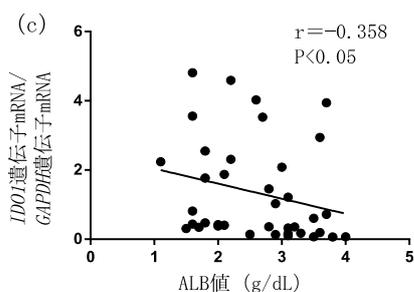


図3 症例群における消化管組織中 *IDO1* 遺伝子転写量と血漿中アルブミン濃度との相関関係

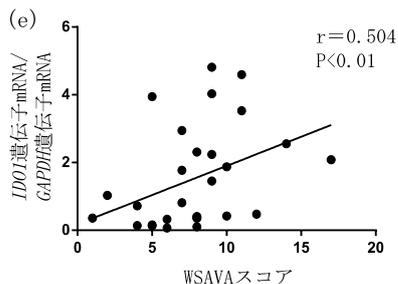


図4 症例群における消化管組織中 *IDO1* 遺伝子転写量と WSAVA スコアとの相関関係

以上の結果より IBD の犬の中には、消化管組織中で *IDO1* 遺伝子の転写が亢進しているグループが存在すること、また臨床的に腸炎が重度であると蛋白喪失性腸症を呈している症例が多いが、消化管粘膜組織中 *IDO1* 遺伝子転写量が高い症例ほど低アルブミン血症が重度である傾向であることや組織学的病変のスコアが高いことが明らかとなった。*IDO1* は近年では特に腫瘍が免疫学的な攻撃から逃れるための免疫寛容の機構として注目されているが、樹状細胞を介して炎症を沈静化する方向へ作用する機構が腸炎モデルマウスなどで明らかになりつつある。本研究によって、犬の腸炎においても宿主自身が炎症に拮抗するシステムとして *IDO1* の発現が刺激されている可能性および特に炎症が重度なほどそれが強く生じている可能性が示唆された。

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 林亜樹子, 西藤公司, 井手香織, セロトニンに対する犬のリンパ球の反応—*in vitro*での基礎的研究—, 第 36 回動物臨床医学会年次大会, 2015 年 11 月 21 日, 大阪

〔図書〕 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat-amc.org/contents/dep-naika-ide.php>

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