

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460628

研究課題名(和文)新規潰瘍性大腸炎治療薬の探索

研究課題名(英文)Development of therapeutic agents against ulcerative colitis.

研究代表者

荒木 博陽 (ARAKI, HIROAKI)

愛媛大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50294450

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)：本研究において我々は、トロピセトロンが 7nAChR刺激作用および5-HT3R阻害作用を含む複数の抗炎症経路を有する安全な新規UC治療薬としての可能性を見出した。また、慢性DSS腸炎モデルを用いて杜仲葉エキスの腸炎抑制効果について検討を行い、杜仲葉エキスがUCの再発を抑制する可能性が示唆された。さらに、ガラントミンの慢性DSS腸炎に対する効果を検討し、ガラントミンがUCの維持療法に有効である可能性が示唆された。このように、本研究では既存薬や健康食品に着目し、UCの新規治療薬としていくつかの候補薬剤を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that tropisetron, partial agonist of 7 nicotinic acetylcholine receptors (7nAChR), has potency as a safe and beneficial new type of therapeutic agent for ulcerative colitis (UC) with dual anti-inflammatory mechanisms (stimulation of 7nAChR and suppression of 5-HT3 receptors). In addition, we examined the suppressive effect of eucommia leaf extract (ELE) with chronic dextran sodium sulfate (DSS) colitis model, and ELE showed the suppressive effect of chronic DSS colitis especially in chronic phase. This result indicates that ELE may be useful for prevention of recurrence of UC. Furthermore, galantamine also suppressed chronic DSS colitis, and showed the capability of efficacy as maintenance therapy of UC. Thus, we revealed several candidate drugs of therapeutic agent against ulcerative colitis by using drug re-profiling method of existing drugs and health food.

研究分野：応用薬理学

キーワード：潰瘍性大腸炎 ドラッグリプロファイリング 7型ニコチン性アセチルコリン受容体 トロピセトロン
杜仲葉エキス ガラントミン

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis : UC) は大腸に慢性の炎症または潰瘍を繰り返す難治性の疾患であり、特定疾患に指定されている。UC は遺伝的要因や環境的要因が複雑に絡み合い引き起こされる免疫の異常亢進が原因であると考えられているが、その根本的な原因は不明である。本邦においても食生活の欧米化などの理由から UC 患者数は年々増加しており、今後もさらなる増加が予想されることから、UC は我が国の健康を考える上で非常に大きな問題となっている。

現在の UC の薬物療法は 5-アミノサリチル酸製剤を中心として、プレドニゾロンなどのステロイド薬やアザチオプリン、タクロリムスといった免疫抑制剤を使用することが一般的である。しかしながら、現在の治療目標は寛解期への導入であり、根治には至っていないのが現状である。一方で、ステロイド薬や免疫抑制剤など現在の治療薬には様々な副作用があり、これらの副作用が患者の QOL を低下させる原因のうちの 1 つとなっている。さらに、その副作用の治療のために多くの医療費が必要であることもまた大きな問題である。これらのことから、今までとは違ったメカニズムを持つ副作用の少ない新規 UC 治療薬の開発が望まれている。

疫学的な研究から喫煙者では非喫煙者に比べ UC の発症率が低いことが分かっていた。このことから、ニコチンは UC の有効な治療薬になると考えられ、1990 年代にはニコチン注腸やニコチンパッチを用いた複数の臨床試験が行われ、ニコチンの UC に対する有効性が示された。しかしながら、ニコチン製剤は嘔気や頭痛といった副作用から臨床応用されることはなかった。近年、マクロファージに存在する α_7 型ニコチン性アセチルコリン受容体 (α_7 nAChRs) の刺激を介した新規抗炎症経路 (コリン作動性抗炎症経路) が発見された。

このことから、 α_7 nAChRs 刺激薬は UC の有効な治療薬になることが期待されているが、その詳細な検討はなされていなかった。そこで我々は、これまでに日本学術振興会の症例研究として、既存の薬剤の中で α_7 nAChRs 刺激作用のあるものを見出し、代表的な UC の実験動物モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (Dextran Sodium Sulfate : DSS) 腸炎モデルを用いてその腸炎抑制効果について検討してきた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、がん化学療法において制吐剤として使用されている 5-HT₃ 受容体阻害薬であるトロピセトロンが、 α_7 nAChRs 刺激作用を介して腸炎のスコア、好中球の浸潤、組織像といった様々な指標において DSS

腸炎を抑制することを明らかにした。また、選択的 α_7 nAChRs 刺激薬を投与することにより腸組織内の interleukin (IL)-6 および interferon (IFN)- γ を抑制すること、さらに免疫染色法を用いることにより大腸組織内においても DSS 腸炎の形成に伴って浸潤したマクロファージに α_7 nAChRs が存在していることを見出した。これらのことから α_7 nAChRs 刺激薬は有効な UC 治療薬となりうることを示唆されている。

上述の通り、UC は活動期と緩解期を繰り返す難治性疾患であり、患者数は年々増加しており、今後もさらなる患者数の増加が予想される一方で、根治のためにはこれまでと違ったメカニズムに着目した新規治療薬が望まれている。また、現在の治療薬には様々な副作用を伴うことが臨床問題となっている。そこで我々は、本研究において、トロピセトロンのより詳細な腸炎抑制効果の薬理メカニズムの検討に加え、安全性の確立された既存の医薬品や健康食品などさらに幅広い範囲から新規潰瘍性大腸炎治療薬候補となる薬剤の探索を行い、UC の実験動物モデルを用いて薬効評価を行うことにより、真に安全な新規 UC 治療薬の検討を行うことを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

本研究の目的である安全性の高い新規 UC 治療薬の候補薬剤を探索するために、我々は文献情報等を元に候補薬剤の選択を行った。このように、既存の薬剤の中から新規作用機序を見出し、他の疾患の治療薬として再開発する手法はドラッグリブライジングと呼ばれ、安全性の高い新規治療薬を開発する上で有効な手法として注目されている。

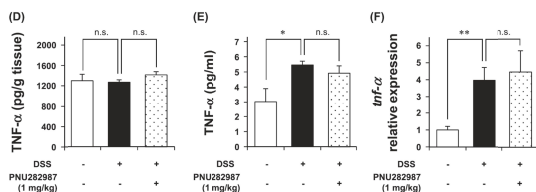
本研究において我々は、UC の代表的な実験動物モデルである DSS 腸炎モデルを用いて検討を行った。DSS 腸炎モデルはマウスに DSS を投与することにより、下痢、血便という臨床と同様の指標で病態を評価 (スコア化) でき、かつ簡便な方法であることから UC の実験動物モデルとしてよく用いられている。研究開始当初に既に我々は、マウスに DSS を 7 日間自由飲水させることにより惹起する急性 DSS 腸炎モデルとその評価系を確立していた。そこで本研究において 5%DSS、3.5%DSS および DSS を投与しない期間を組み合わせて 35 日間投与することによる慢性 DSS 腸炎モデルを作成し、急性モデルと慢性モデルにより候補薬剤の腸炎抑制効果について検討を行った。腸炎抑制効果は、下痢と血便を合わせた腸炎のスコア (Disease Activity Index)、大腸の長さ、MPO 活性および H&E 染色を用いて、その症状変化に加えて、生化学的および組織学的に評価した。また、炎症性サイトカインなどの mRNA レ

ベル (real-time RT PCR 法)、タンパクレベル (ELISA 法) での測定により免疫学的な指標からその薬理メカニズムの検討を行った。

4. 研究成果

(1) トロピセトロンによる腸炎抑制効果のメカニズムの解明

これまでに我々は、トロピセトロンが α_7 nAChRs 刺激作用を持つことに着目し、その腸炎抑制効果について検討を行っており、トロピセトロンにより大腸組織での IL-6 および IFN- γ を抑制することが分かっていた。そこで、本研究ではこれまでの知見を元に検討を行い、トロピセトロンの詳細な腸炎抑制効果のメカニズムの検討を行った。まず大腸における種々の炎症性サイトカインの発現について mRNA レベルあるいはタンパクレベルで検討を行ったところ、DSS 投与により大腸組織あるいは血中の TNF- α の発現は上昇するが、選択的 α_7 nAChRs 刺激薬である PNU282987 は TNF- α の発現に影響を与えることはなかった。このことから、 α_7 nAChRs 刺激による腸炎抑制作用は TNF- α に依存しない可能性が示唆された (図 1)。また、免疫染色法を用いて検討した結果、 α_7 nAChRs を刺激することにより大腸組織への α_7 nAChRs の発現を伴ったマクロファージの浸潤が抑制されることを見出した。以上の結果から、トロピセトロンが DSS 腸炎を抑制するメカニズムとして、1. 大腸においてマクロファージに存在する α_7 nAChRs の刺激を介して、2. マクロファージからの IL-6 産生抑制により T 細胞の活性化を阻害する。その結果、3. 大腸において T 細胞からの IFN- γ の産生が抑制され、4. さらにマクロファージの活性化を抑制することにより DSS 腸炎を抑制している可能性が考えられた。さらに、トロピセトロンは従来の 5-HT₃ 受容体阻害作用による抗炎症化を持つことも報告されており、トロピセトロンの α_7 nAChRs 刺激作用と 5-HT₃ 受容体阻害作用の 2 つの抗炎症経路を併せ持つ安全性の高い新規潰瘍性大腸炎治療薬としての可能性が示唆された。

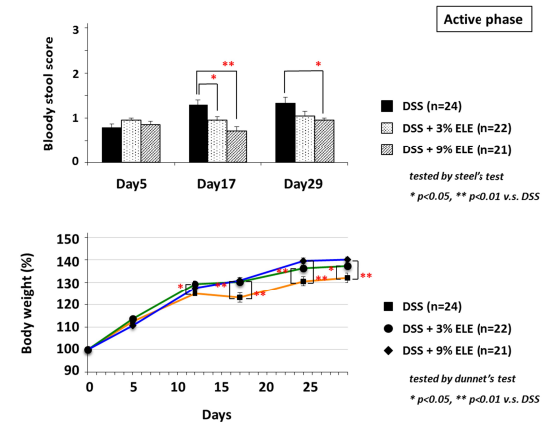


(図 1) PNU282987 による大腸組織および血中における TNF- α の発現変化

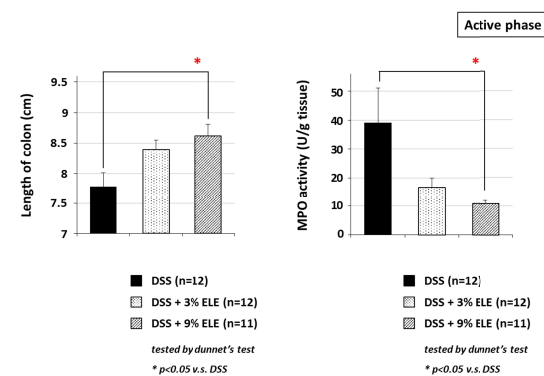
(2) 慢性 DSS 腸炎モデルを用いた杜仲葉エキスによる腸炎抑制効果の検討

杜仲葉エキス (Eucommia Leaf Extract:

ELE) は健康食品としてわが国でも広く使用されているが、抗炎症作用のほか、コレステロール低下作用や中性脂肪低下作用を持つことが報告されており、UC の治療・予防効果が期待できると考えられた。そこで、本検討においてはまず UC の代表的な実験動物モデルである 7 日間の急性 DSS 腸炎モデルを改良し、5%DSS、3.5%DSS および DSS を投与しない期間を組み合わせることで 35 日間投与することによる慢性 DSS 腸炎モデルを作成した。次に、この慢性 DSS 腸炎モデルを用いて ELE (3%、9%) を含む飼料を DSS 投与開始時より 35 日間経口投与して、ELE の腸炎抑制効果の検討を行った。その結果、ELE は慢性再発期 (day29) において DSS 投与による血便のスコアの上昇、体重増加の抑制、大腸の長さの短縮、MPO 活性の上昇を抑制した (図 2、3)。また、ELE は特に腸炎の急性症状よりも慢性期の再発症状に対して抑制効果を示したことから、ELE が UC の再発を抑制する可能性が示唆された。



(図 2) ELE が慢性 DSS 腸炎発症時の血便スコアおよび体重増加抑制に与える影響



(図 3) ELE が慢性 DSS 腸炎発症時の大腸の長さおよび MPO 活性に与える影響

(3) 慢性 DSS 腸炎モデルを用いたガラタミンによる腸炎抑制効果の検討

近年、ガラタミンはアセチルコリンエステラーゼ阻害作用によるアルツハイマー型

認知症治療薬として用いられているが、 α_7 nAChRs のアロステリックなアゴニストであることが知られており、これまでの我々の検討からも UC 治療薬としての可能性が期待された。そこで、我々が確立した慢性 DSS 腸炎モデルを用いて、ガラタミンの腸炎抑制効果について検討を行った。対照薬として代表的なステロイド薬であるメチルプレドニゾロンを用いて、ガラタミン 2mg/kg およびメチルプレドニゾロン 1mg/kg を連日 1 日 1 回腹腔内投与し、慢性 DSS 腸炎に対する効果を検討した。その結果、対照薬であるメチルプレドニゾロン 1mg/kg が腸炎の急性症状 (Disease Activity Index) を抑制したことに対して、ガラタミン 2mg/kg では慢性期の再発症状 (Disease Activity Index) に対して抑制効果を示し、ガラタミンが UC の維持療法に有効である可能性が示唆された。

以上のように、我々は本研究において既存薬や健康食品に着目し、UC の新規治療薬としていくつかの候補薬剤を見出すことができた。また、急性モデルと慢性モデルを組み合わせることにより、より臨床に近い病態モデルで評価することが可能であった。

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 1 件)

Yuichi Tasaka, Daiki Yasunaga, Takeshi Kiyoi, Mamoru Tanaka, Akihiro Tanaka, Katsuya Suemaru, Hiroaki Araki
Involvement of stimulation of α_7 nicotinic acetylcholine receptors in the suppressive effect of tropisetron on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice
Journal of Pharmacological Sciences
127, 2015, 275-283, 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

田坂祐一, 村上 聡, 田中亮裕, 荒木博陽
杜仲葉エキスのデキストラン硫酸ナトリウム腸炎および腸炎関連うつ症状に対する効果の検討
日本杜仲研究会 第 10 回 定期大会 平成 27 年 7 月 25 日 東京都国際フォーラム 東京都千代田区

田坂祐一, 安永大輝、清井武志, 田中 守, 田中亮裕, 荒木博陽
トロピセトロン の DSS 腸炎抑制効果における α_7 nACh 受容体の関与
第 35 回日本臨床薬理学会学術総会 2014.12.4 ~ 12.6 ひめぎんホール 愛媛県

松山市

〔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

荒木 博陽 (Araki, Hiroaki)
愛媛大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 50294450

(2) 研究分担者

田中 亮裕 (Tanaka, Akihiro)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 50527562

(3) 連携研究者

なし