

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460980

研究課題名(和文)非celiacグルテン過敏性腸症の実態調査-過敏性腸症候群との関連に注目して-

研究課題名(英文)Non-celiac gluten sensitivity and celiac disease

研究代表者

渡邊 知佳子(Watanabe, Chikako)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・内科学・講師)

研究者番号：90365263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：小麦蛋白グルテンによって特異的に消化器症状が出現みられる疾患は、小麦アレルギー、自己免疫疾患のセリアック病と、その他non-celiacグルテン過敏性腸症に分類される。セリアック病とグルテン過敏性腸症は、HLAを背景とする小麦蛋白グルテンに対する自己抗体と、粘膜組織障害によって鑑別される。正確な病理診断をなくしてはnon celiac diseaseをセリアック病と誤診する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Celiac disease is precipitated, in genetically predisposed persons, by the ingestion of gluten, resulting in mucosal inflammation and villous atrophy.
“non-celiac gluten sensitivity” is a syndrome characterized by intestinal symptoms related to the ingestion of gluten-containing food, without enteropathy. Not only celiac disease but non-celiac gluten sensitivity sometimes share the similar symptoms to those in irritable bowel syndrome, being possibly misdiagnosed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：下部消化管学 粘膜免疫 セリアック病 グルテン 過敏性腸症

1. 研究開始当初の背景

小麦摂取が消化管症状の誘因となり得ることは、古くより知られている。小麦蛋白グルテンによって引き起こされる消化管疾患は、即時型的小麦アレルギー、慢性炎症のセリアック病とグルテン過敏性腸症に大別される。小麦アレルギーは、小麦蛋白 5 グリアジンに対する IgE 依存性即時型免疫応答により、消化管症状のほか蕁麻疹・アナフィラキシーなど全身症状を伴う疾患で、IgE-RAST により診断される。慢性炎症のセリアック病とグルテン過敏性腸症は、小麦蛋白グルテンに対する自己抗体と、腸粘膜組織障害の有無によって区分される。セリアック病は、小麦蛋白 3 グリアジンと遺伝的素因 HLA-DQ2 が関与する免疫疾患で、特異的なグルテン分解酵素に対する血清抗体 (tissue trans glutaminase: tTG IgA) と、特徴的な組織所見 (十二指腸絨毛の短縮) により診断され、欧米の罹患率は約 1% である。そして、血清陽性で組織障害の乏しい群を、non-ceeliac グルテン過敏性腸症 (non-ceeliac gluten sensitivity (NCGS)) とよび、有病率は約 5% と推定される。

non-ceeliac グルテン過敏性腸症は、腹痛・便通異常の症状が共通する過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) と診断された中に混在している可能性が指摘されている。欧米では IBS の 15-30% に混在しているという報告もある (Gut 2007; 56: 1326-27)。本邦でも、有病率約 15% とされる IBS の中に、non-ceeliac グルテン過敏性腸症が混在している可能性につき実態調査を計画した。

non-ceeliac グルテン過敏性腸症は「non-ceeliac」という negative selection による新しい疾患概念で、診断の gold standard である double-blind placebo control test (二重盲検法) は煩雑なため非実用的で、病態を反映するバイオマーカーの開発が急務とされる。

腸管炎症は、有害な腸管内の食事や微生物抗原を、消化管の免疫機構が排除しようとする際の過剰な生体反応であると考えられ、多数の免疫担当細胞が侵襲を受けた局所へ遊走・集積する現象として観察される。この有害な外的抗原を排除する免疫システムが効率よく働くために、腸管では、炎症時にだけ、腸管腔内の外来抗原を、腸上皮細胞より効率よく取り込むシステムが報告されている。セリアック病においてはトランスフェリン受容体が報告され、新規治療のターゲット候補となった。

今回、我々は、大腸の生理的状态ではほとんど発現していないが、炎症時に上皮細胞 (腸管腔側) に著明に発現するペプチド輸送体に注目した。腸炎惹起動物モデルを用いて、ペプチド輸送体が腸管腔内ペプチド輸送と、引き続き炎症の本態である免疫担当細胞の

リクルートメントへ如何に関与するのか、我々が確立した生体顕微鏡を用いる観察システムを用いて、検討した。

2. 研究の目的

非 celiac グルテン過敏性腸症の実態調査を当院に通院する過敏性腸症候群患者を対象として、同意を得たのちに、血清・内視鏡・病理組織検査を行い、セリアック病・non-ceeliac グルテン過敏性腸症と考えられる例がどの程度に存在するのか検討する。

またグルテン関連消化器疾患の病態を踏まえたバイオマーカーの開発を念頭に、基礎的検討を加える。

3. 研究の方法

(1) non-ceeliac グルテン過敏性腸症の実態調査

「慢性的な便通異常と腹部不快感」という消化管症状を主訴に当科を受診した 16 歳以上の方を対象とした。小麦と消化管症状の関連について問診した。セリアック病と小麦アレルギー除外のため、グルテン関連血清抗体 (tTG IgA, AGA IgG, DGP IgG)、小麦 IgE を測定した。欧米で提唱されているアルゴリズムに則って、セリアック病に特異的な血清抗体陽性者には上部消化管内視鏡検査・病理組織検査・HLA 検査を行った。

さらに大腸内視鏡検査・病理組織検査によりセリアック病や他の器質的疾患も鑑別され、non-ceeliac グルテン過敏性腸症が疑われる患者のうち、同意が得られた場合に、グルテン制限食を食事指導し、食事日記をもとに、グルテン摂取量と消化器症状の関連について再度検討した。

本研究につき、防衛医科大学校倫理委員会の承認を得た (平成 25 年 11 月 11 日承認、承認番号 1197、平成 28 年 3 月 17 日承認、承認番号 2457)。

(2) グルテン過敏性腸症の基礎的検討

マウス (C57BL/6) に LPS (20 μ g) を腹腔投与し 48 時間後に、大腸粘膜を採集した。ペプチド輸送体の発現を western blot で検討した。

上記 LPS 投与マウスの大腸の腸管ループを作成し、細菌由来ペプチド (MDP) を 4 時間 還流した後に腸粘膜を採集した。サイトカイン産生 (TNF \cdot IL-1) について RT-PCR、好中球遊走について MPO 活性を測定した。ペプチド輸送体を competitive blocking し、変化を比較検討した。

上記腸管ループを用いてペプチドを還流した後、蛍光標識した好中球を頸静脈的に投与し、生体顕微鏡を用いて、腸粘膜へ好中球がリクルートメントする様子を観察

した。ペプチド輸送体を competitive blocking し、変化を比較検討した。

本研究につき、防衛医科大学校倫理委員会、動物実験倫理審査の承認を得た（平成27年12月22日承認、承認番号15098、平成28年2月17日承認、承認番号2421）

4. 研究成果

(1) non-celiac グルテン過敏性腸症の実態調査

今回の検討では、200名のセリアック病以外の器質的疾患の否定される機能性消化管障害の患者を対象とした。

血清抗体陽性者は存在した(1%)が、血清抗体検査と十二指腸組織検査の両方の基準に照らし合わせ、HLA検査結果を考慮すると、セリアック病の診断基準を満たす症例は存在しなかった。

一方、non-celiac グルテン過敏性腸症の可能性が考えられる患者は存在すると考えられた。しかし、non-celiac グルテン過敏性腸症の診断基準は、現時点では、まだ確立されていないため、'診断'には至らなかった。

本研究においてセリアック病に特異的な血清抗体陽性者がみられたことは、血清抗体検査のみ行って、内視鏡・病理(・HLA)診断を行わないと、多くの non-celiac disease をセリアック病と誤診してしまう可能性を示唆し、また、この症例の多くはグルテン過敏性腸症の可能性が高いと考えられた。今回の結果を踏まえ、我々は、本邦における下記の診断アルゴリズムを作成した。今後ひきつづきグルテン関連消化管疾患の実態の把握をすること、さらにグルテン制限食の治療効果や予後についての特徴を明らかにすることは急務と考えている。

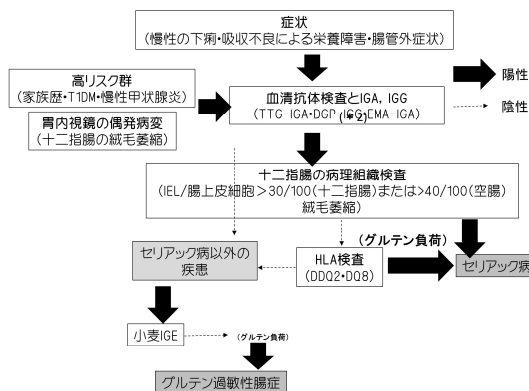


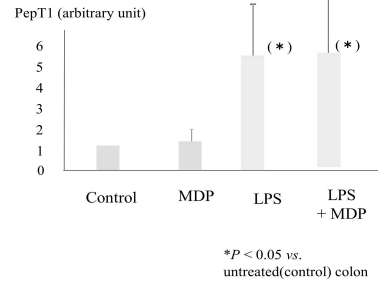
図1 セリアック病と non-celiac グルテン過敏性腸症 診断アルゴリズムの提唱

(2) グルテン過敏性腸症の基礎的検討

マウスに LPS を腹腔投与すると、大腸

粘膜におけるペプチド輸送体の発現が有意

Expression ratio of PEPT1 proteins over β -actin



に亢進した。

図2 炎症惹起大腸粘膜におけるペプチド輸送体の発現

LPS 投与によって炎症を惹起された腸粘膜において、サイトカイン(IL-1 \cdot TNF \cdot)産生は亢進する傾向がみられたが、有意ではなかった。LPSにより炎症を惹起された大腸の腸管ループに細菌由来ペプチド MDP を還流することによりサイトカイン産生・MPO 活性は、MDP 濃度依存的に上昇した。ペプチド輸送体を competitive blocking することにより、この変化は有意に抑制された。なお、LPS 非投与腸粘膜に MDP を還流しても、サイトカイン産生・MPO 活性は変化しなかった。

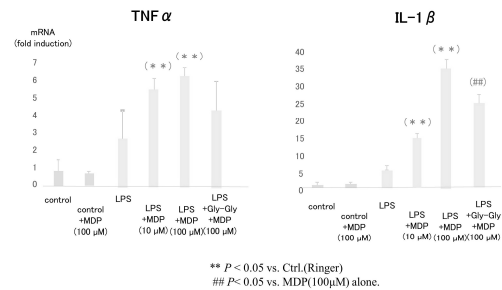


図3 ペプチド輸送体阻害による炎症性サイトカイン産生の変化

腸粘膜微小血管へ蛍光標識した好中球がリクルートメントの様子を、生体顕微鏡を用いて in vivo 観察した。LPSにより炎症を惹起すると、LPS 非投与群に比べて大腸粘膜微小血管へリクルートメントする好中球が増加した(AおよびB)。炎症惹起大腸の腸管ループに細菌由来ペプチド MDP を還流(C)すると、非灌流群(B)に比べ、大腸粘膜微小血管への好中球の接着が有意に増加した。ペプチド輸送体を competitive blocking することにより、この変化は抑制された(D)。

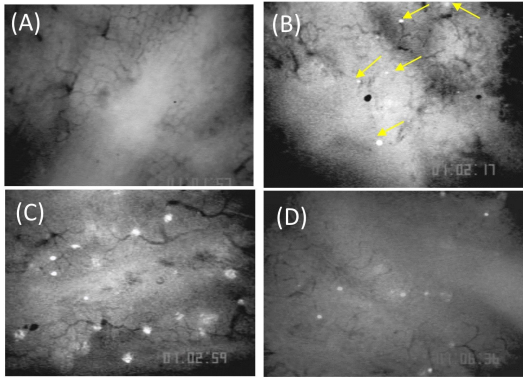


図 4 ペプチド輸送体阻害による好中球リクルートメントの変化

以上より、腸炎惹起動物の大腸粘膜においてペプチド輸送体が異常に発現亢進し、病原ペプチドを細胞内輸送して腸炎の病態の本態である異常免疫担当リクルートメントに関与している可能性が示唆された。

今後、その発現メカニズム・発現の局在を明らかにする。そして、食物由来ペプチドを用いて、同様の検討を行い、グルテン過敏性腸症など食物不耐性腸症の病態との関連について検討を進める予定である。

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 10 件)

(1) Endoscopic and clinical evaluation of treatment and prognosis of Cronkhite-Canada syndrome: a Japanese nationwide survey. Watanabe C, Komoto S, Tomita K, et al. J Gastroenterol. 査読有 51(4):327-36. 2016

(2) Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling.

Yoshikawa K, Kurihara C, Furuhashi H, et al. (以下 13 人中 7 番目) J Gastroenterol. 査読有 In press

(3) Platelet interaction with lymphatics aggravates intestinal inflammation by suppressing lymphangiogenesis. Sato H, Higashiyama M, Hozumi H, et al. (以下 15 人中 10 人目) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有 311(2):G276-85. 2016

(4) Toll-like receptor (TLR) 2 agonists ameliorate indomethacin-induced murine ileitis by suppressing the TLR4 signaling. Narimatsu K, Higashiyama M, Kurihara C et al (以下 11 人中 6 番目) J Gastroenterol Hepatol. 査読有 30(11):1610-7. 2015

(5) Magnetic resonance enterocolonography in detecting erosion and redness in intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. Sato H, Tamura C, Narimatsu K, (以下 16 人中 10 番目) J Gastroenterol Hepatol. 査読有 30(4):667-73. 2015

(6) Prevalence of serum celiac antibody in patients with IBD in Japan. Watanabe C, Komoto S, Hokari R, et al J Gastroenterol. 査読有 49(5):825-34. 2014

(7) Issues associated with the emergence of coeliac disease in the Asia-Pacific region: a working party report of the World Gastroenterology Organization and the Asian Pacific Association of Gastroenterology. Makharia GK, Mulder CJ, Goh KL, et al (以下 12 人中 11 番目) J Gastroenterol Hepatol. 査読有 29(4):666-77. 2014

(8) Chronic antibiotic-refractory diversion pouchitis successfully treated with leukocyteapheresis. Watanabe C, Hokari R, Miura S. Ther Apher Dial. 査読有 18(6):644-5. 2014

(9) Issues associated with the emergence of coeliac disease in the Asia-Pacific region: a working party report of the World Gastroenterology Organization and the Asian Pacific Association of Gastroenterology. Makharia GK, Mulder CJ, Goh KL, et al (以下 12 人中 11 番目) J Gastroenterol Hepatol. 査読有 29(4):666-77. 2014

(10) Prevalence of serum celiac antibody in patients with IBD in Japan. Watanabe C et al. J Gastroenterol. 査読有 49(5):825-34. 2014

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 渡辺 知佳子, 穂苅 量太, 三浦 総一郎 消化管ポリポーシス疾患 クロンカイト・カナダ症候群における 消化管腫瘍・小腸病変について 第 54 回 小腸研究会 2016 年 11 月 12 日 (大宮・埼玉県)

(2) 渡辺 知佳子, 穂苅 量太, 三浦 総一郎 Celiac 病の実態の臨床調査 第 47 回 日本消化吸収学会総会 2016 年 11 月 24 日 神戸国際会議場 (神戸・兵庫県)

(3) 渡辺知佳子 三浦総一郎 穂苅量太 消化管ポリポーシス疾患、とくにクロンカイト・カナダ症候群における消化管腫瘍・小腸病変について 第 53 回 小腸研究会 アイーナいわて県民情報交流センター 2015 年 11 月 7 日 (盛岡・岩手県)

(4) 渡辺知佳子 三浦総一郎 穂苅量太 クロンカイト・カナダ症候群の治療における栄養療法 第 12 回日本在宅静脈経腸栄養研究会 学術集会 2015 年 10 月 3 日 名古屋国際会議場 (名古屋・愛知県)

(5) 渡辺知佳子・高本俊介・富田謙吾・穂苅

量太・三浦総一郎 炎症性腸疾患と小麦蛋白
グルテン制限食の意義 第 11 回日本在宅静
脈経腸栄養研究会学術集会 2014 年 10 月 4
日 お茶の水のソラシティカンファレンス
センター(東京)

(6) 渡辺知佳子・穂苅量太・三浦総一郎
Cronkhite-Canada 症候群の臨床経過—本邦
での全国実態調査より— JDDW2014 2014 年
10 月 24 日 神戸国際会議場 (神戸・兵庫
県)

(7) Watanabe C et al. Upregulation of PEPT1
and muramyl dipeptide transport may
stimulates neutrophil trafficking
in LPS-induced colonic inflammation 2017
年 5 月 6 日 (Chicago, USA)

(8) Watanabe C, Miura S, Hokari R et al
Neutrophil trafficking to microvessels is
largely enhanced by PepT1 mediated
bacterial peptide transport in
TNF-alpha-challenged murine colonic
mucosa in vivo. APDW Aisa Pacific
Digestive Disease Week 2016 2016 年 11 月
3 日 (Kobe, Japan)

(9) Watanabe C et al. Neutrophil
trafficking to microvessels is largely
enhanced by PepT1 mediated bacterial
peptide transport in TNF-alpha-challenged
murine colonic mucosa in vivo. 2016 年 5
月 24 日 (San Diego, USA)

(10) Watanabe C et al. Clinical response to
medical treatment and prognosis of
Cronkhite-Canada syndrome - A Japanese
nationwide survey 2014 年 5 月 1 日 (Chicago,
USA)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 渡辺知佳子, 穂苅量太, 三浦総一郎
消化器研修医ノート改定第 2 版 診断と治療
社 2016 年 全体 664 (担当 413-416)

(2) 渡辺知佳子, 穂苅量太, 三浦総一郎 日
本臨床社 別冊日本臨床 新領域別症候群
シリーズ No 34 免疫症候群 2015 年
全体 931 (担当 396-400)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺知佳子 (WATANABE, Chikako)

防衛医科大学校 医学教育部医学科専門
課程・講師

研究者番号 : 90365263