

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670593

研究課題名(和文) 回腸嚢炎はナトリウム環境の変化により発症する

研究課題名(英文) Pouchitis develops due to change of sodium concentration

研究代表者

福島 浩平 (Kouhei, Fukushima)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：20271900

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)：潰瘍性大腸炎の手術では、肛門を残すことに加え小腸で便を貯める袋(回腸嚢)を作製する。術後のトラブルで一番問題となるのが、小腸で作った袋に炎症(回腸嚢炎)が生じることであるが、その原因は不明であり根本的な治療もまだ見つかっていない。本研究では、当初マウスを使った病気モデルの解析を試みようとしたがうまくいかなかった。そこで、便の中の細菌を詳しく調べることにした。現在のところ回腸嚢炎の治療薬として抗菌剤が用いられているが、抗菌剤を用いると薬の効きにくい遺伝子をもつ菌の割合が増えることが明らかになった。このことが、回腸嚢炎が治りにくくなる理由の一つであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A pouch using the small intestine (ileal pouch) is constructed in surgical treatment of ulcerative colitis to preserve the anus. Development of pouchitis, inflammation of the pouch, is the most frequent troublesome after surgery. Its pathogenesis and radical therapeutics still remains unknown. We initially tried to analyze an animal model of this disease but failed. We successively investigated bacterial composition in stool from the pouch. Antibacterial drugs are now most frequently used for the medical treatment of pouchitis. We successfully demonstrated that the ratio of bacteria with genetic mutations, which guarantee resistance to ciprofloxacin, an antibacterial drug, increases after the therapy. This may be the reason why pouchitis is sometimes resistant to the ciprofloxacin therapy, and behaves as a chronic and intractable disease.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸全摘 回腸嚢炎

1. 研究開始当初の背景

大腸全摘回腸肛門(管)吻合術は潰瘍性大腸炎の標準術式であるが、術後の半数に回腸囊炎が発症し、全手術例の約5%は有効な治療法がない難治例に至る。その病因は、潰瘍性大腸炎と同様にまったく不明であるが、厚生労働省の難病研究班による治療指針ではシプロフロキサシンやメトロニダゾールなどの抗菌薬が第一選択とされている。

大腸全摘ラットを用い検討すると、術後には大腸欠損に対する代償機構としてレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系が賦活化され、遺伝子発現に基づく機能分子の誘導により残存小腸上皮のナトリウム吸収機構が活性化される。その変化は、回腸末端部ほど大きい。

我々の検討では、大腸便中のナトリウム濃度は50mM程度であるのに対し、大腸全摘術後の便中では140mMから経時的に減少し、2週で110mM、8週で70mMに低下する。

一方、小腸抗菌タンパク活性およびスペクトラムはナトリウム濃度依存性である。たとえば、Paneth細胞分泌抗菌タンパクであるDefensinやHIP/PAPの抗菌活性は、菌種およびナトリウム濃度に依存性である。ナトリウム濃度の腸内菌に対する直接的影響に加え、各々の菌種に対する抗菌活性の変化により腸内細菌叢は大きく変わるはずである。実際に、ヒト回腸囊便はナトリウム濃度の低い大腸便の腸内菌叢に類似してくる。

IL-17A産生CD4⁺T細胞(Th17細胞)は、粘膜固有層に存在し腸内細菌により分化誘導される。本細胞は自己免疫疾患発症や炎症性腸疾患増悪に関与するが、高ナトリウム存在下で培養するとTNF- α 、CCR6を発現するpathogenic Th17細胞分画が増加する。上皮で吸収されたナトリウムはNa/K ATPaseによって間質へ輸送され、回腸末端部粘膜組織は術前に比し高ナトリウム状態にあると考えられる。すなわち、培養系と同様の機序により誘導されたpathogenic Th17細胞が、回腸囊炎の発症・難治化に関与する可能性がある。一方でserum/glucocorticoid-regulated kinase 1(SGK1)は、アルドステロンにより誘導されナトリウム吸収を促進する。驚いたことに、SGK1はIL-23受容体シグナル伝達でも活性化されTh17細胞の安定化と多発性硬化症モデルマウスの症状増悪に関与する。

実際の臨床に目を転じてみると、前述のように回腸囊炎に対する治療は、シプロフロキサシンやメトロニダゾールなどの抗菌薬が第一選択である。近年、とくに再燃例や抗菌

薬依存症例の増加が認められ、治療の結果として耐性菌の増加が危惧されている。腸内細菌の抗菌薬耐性化が難治化にかかわるといふ証拠はないが、少なくとも耐性菌の増加は感染症のリスクを増大させる。しかし、耐性化がどのように起こっているのかということですらまったく解明されていない。

2. 研究の目的

当初の研究目的は、

- 1) アルドステロン上昇による管腔内Na濃度の低下により腸内細菌叢がどう変化するか
- 2) RAASの賦活化および粘膜内Na濃度上昇によりpathogenic Th17細胞が誘導され小腸炎発症に至るか、を明らかにする。そして、最後に
- 3) ヒト回腸囊炎に対するプロジェクトを立案することであった。その後の研究の進展状況により、3)に関連し以下の項目4)を追加した。
- 4) 回腸囊内腸内細菌において、シプロフロキサシン耐性機構をつかさどるとされるgyrAおよびparC遺伝子の遺伝子量、および遺伝子変異の有無と抗菌剤治療との関係について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

当初、in vivoでの実験として

1. 対照群：無処置
2. アルドステロン持続投与群：皮下埋め込み浸透圧ポンプを用いD-aldosterone 80 μ g/100g/dayで14日間投与
3. DSS投与群：2.5-5%DSS(分子量5,000)を4-10日間投与(DSS濃度、投与期間は予備実験による)
4. アルドステロン持続投与+DSS投与群：D-aldosteroneにあわせてDSSを投与の4群を設定し、アルドステロン持続投与+DSS投与群における条件設定、4群間の小腸炎・大腸炎の評価{体重、組織重量、消化管長、組織学的評価(スコア化)}、DNAを用いた生菌腸内細菌叢の解析、小腸・大腸上皮における抗菌タンパクmRNAの発現、消化管および脾リンパ球におけるTh17細胞の解析：フローサイトメトリーとmRNA発現、を検討した。

また、アルドステロン持続投与における小腸の上皮細胞遺伝子の発現変化を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

また、NaCl濃度の調節可能なLB培地を用いて、0、35、70、140mMと通常のLB培地で用いられる171mMにおいて、糞便より腸内細菌

菌液を調整し、37度で振とう培養した。細菌の増殖を600nmの吸光度測定により経時的に検討した。さらに、腸内環境のシミュレーションで用いられるMollyらの培養液調整法に準じて、ナトリウム濃度を任意に調整する培地の作製を試みた。

腸内細菌叢の安定する回腸嚢機能後約1年以上を経過した症例のうち、回腸嚢炎によりCFX投与歴を有する群15例と投与歴の無い群32例より糞便を採取しDNAを抽出、大腸菌gyrAとparCの遺伝子量をリアルタイムPCRにより定量した。また、PCR産物をクローニングしシーケンスによりアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の概要を調べた後、それをもとに制限酵素Hinf I、Tth111I、HaeII、XmnIを用いた遺伝子変異を定量的に評価するシステムを構築し検討した。このシステムでは、変異のなければ制限酵素によりPCR増幅産物が切断されるのに対し、変異があれば切断されないことから電気泳動で区別できることを利用した。おのおの、バンドの濃淡をDensitometryにより画像解析し定量化した。

4. 研究成果

本研究は、大腸全摘術後のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の賦活化と回腸ナトリウム環境の変化が、回腸嚢炎の発症・難治化の原因であるという仮説を証明するために、26年度はマウスを用いたin vivo実験によって、アルドステロン上昇による管腔内ナトリウム濃度の低下により腸内細菌叢がどう変化するかを検討する予定であった。しかし、予定していた大学院生が事情により退学してしまったという研究室環境の変化が影響し実行不可能な状況に陥った。

そこで、in vitroのシステムにおいて検討を行った。NaCl濃度の調節可能なLB培地を用いて、0、35、70、140mMと通常のLB培地で用いられる171mMにおいて、糞便より腸内細菌菌液を調整し培養すると、培養開始3および6時間では各群間で差を認めないが、24時間においてNaCl濃度0、35mMでは有意に増殖が不良であった。DNAを抽出し培養後の菌構成について検討したが、明らかな差異を見出せなかった。

In vitroの実験をさらに進展させる目的で、Mollyらの方法に準じつつ、ナトリウム濃度の調整を試みたがうまくいかなかった。

ラットアルドステロン持続投与モデル(80μg/100g/day、4週皮下持続投与)の腸管上皮遺伝子発現を改めて解析したところ、小腸上皮ではアルドステロンによる遺伝子誘

導が23遺伝子、抑制が35遺伝子に認められたのに対し大腸上皮では誘導が200遺伝子、抑制が23遺伝子と、大腸上皮において多数の遺伝子が誘導された。これらの中に、Regやdefensinなどの生体防御関連遺伝子の発現変化は、少なくともマイクロアレイでは抽出されなかった。

次に、回腸嚢便中のシプロフロキサシン耐性に関するgyrAとparCの遺伝子について検討した。gyrAとparCの遺伝子に点変異が起こりアミノ酸置換が生じると、シプロキサシン耐性が1000倍以上になることが知られている。そこで、大腸菌gyrAおよびparC遺伝子に特異的なプライマーを設定し遺伝子量を定量すると、細菌DNAμgあたりでも、また、Eubacteria rDNA遺伝子量あたりでも、gyrAおよびparC遺伝子量とともに、シプロフロキサシンの投与歴のある無しで違いを認めなかった。

gyrAおよびparCの遺伝子変異についてPCR産物由来の62クローンを調べたところ、耐性化に重要な各遺伝子それぞれ2箇所の配列のうち、gyrAではTCG(Ser)TTG(Leu)が61%に、GAC(Asp)AAC(Asn)が6%に、parCではAGT(Ser)ATT(C)(Ile)が45%に、GAA(Glu)GTA(Val)が21%に認められた。

gyrAおよびparCの遺伝子変異率について定量システムを構築しえたgyrA遺伝子2箇所、parC遺伝子1箇所の変異遺伝子率をみると、CFX投与歴のある群ではそれぞれ70%、79%、50%、無い群では12%、11%、5%でありいずれも著明な有意差が認められた。また、CFX投与前後で検体を採取しえた3例では、CFX投与によりすべての症例で遺伝子量の減少と変異率の上昇が顕著であった。

以上より、gyrAおよびparC遺伝子の変異遺伝子率の上昇は、CFXをはじめとする抗菌剤抵抗性である「難治」に関与すると可能性があり、その際には生物学的製剤を含めた別の治療選択肢を積極的に考慮する必要があると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Kazuhiro Watanabe, Iwao Sasaki, Kouhei Fukushima, Kitaro Futami, Hiroki Ikeuchi, Akira Sugita, Riichiro Nezu, Tsunekazu Mizushima, Shingo Kameoka, Masato Kusunoki, Kazuhiro Yoshioka, Yuji Funayama, Toshiaki Watanabe, Hisao Fujii, Mamoru Watanabe. Long-term incidence and

characteristics of intestinal failure in Crohn's disease: A multicenter study. J Gastroenterol. 49: 231-238, 2014 (査読あり) DOI 10.1007/s00535-013-0797-y

2. 福島 浩平、渡辺和弘、神山篤史、長尾宗紀、舟山裕士、高橋賢一、佐々木健吾、齋藤 喬. ここまで来た炎症性腸疾患の新展開 炎症性腸疾患 (IBD) 回腸囊炎 成人病と生活習慣病 44: 335-339, 2014 (査読なし)
3. 渡辺和宏、長尾宗紀、羽根田祥、舟山裕士、高橋賢一、内藤剛、海野倫明、福島 浩平 デイバート 炎症性腸疾患の外科治療 切除吻合法 (手縫い吻合 VS 機械吻合) 外科 76: 261-266, 2014 (査読なし)

〔学会発表〕(計4件)

1. 福島浩平 回腸囊炎難治例の治療と抗菌剤治療の問題点 第101回日本消化器病学会 2015/4/23 仙台国際センター(仙台)
2. 丁 大 勇 、 福島 浩 平 Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein (HIP/PAP)の抗菌活性: In vitro アッセイ系の問題点第101回日本消化器病学会 2015/4/24 仙台国際センター(仙台)
3. 福島浩平、神山篤史、齋藤喬 抗菌剤投与による遺伝子変異から見たヒト腸内細菌叢の変化第19回腸内細菌学会 2015/6/19 北里大学コンベンションホール(東京)
4. 小山文一、藤井久男、杉田昭、池内浩基、福島浩平、二見喜太郎、中村信治、植田剛、錦織直人、井上 隆、川崎敬次郎、中本貴透、尾原伸作、吉川周作、山岡健太郎、稲次直樹、中島祥介 潰瘍性大腸炎に合併する肛門病変の臨床像とその対応-内科・外科間の治療連携の必要性 第70回日本大腸肛門病学会 2015/11/14 名古屋観光ホテル(名古屋)

〔その他〕

ホームページ等

www.fukushimalab.med.tohoku.ac.jp

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 浩平 (FUKUSHIMA, KOUHEI)
東北大学・大学院医工学研究科・教授