

NewsLetter Vol.24 No.3

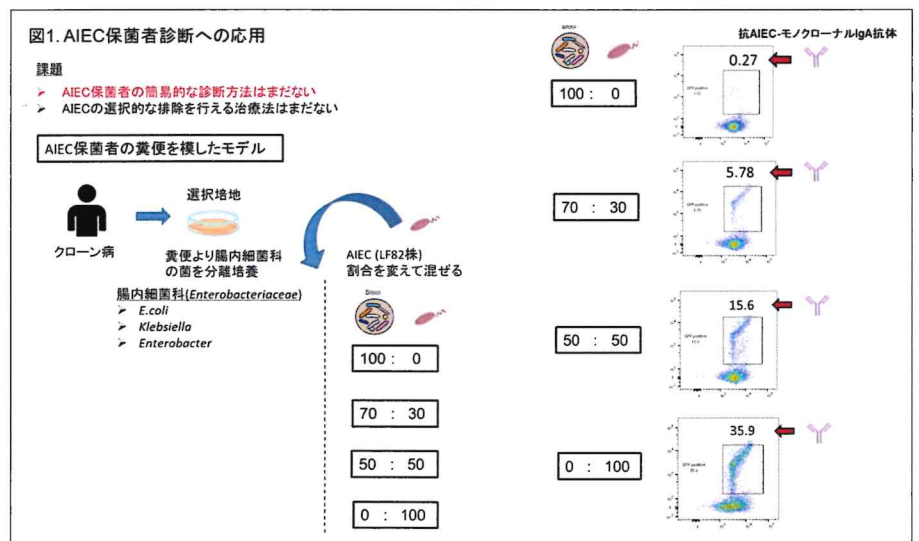
奨励賞受賞 | 第60回日本消化器免疫学会総会 (2023年10月5日, 6日 ホテルイースト21東京)

クローン病の病原性共生菌に対するIgA抗体の誘導と保菌者診断への応用

今井 仁^{1,2} 田中 理佳³ 津川 仁³ 鈴木 秀和² 西崎 泰弘¹ 穂積 勝人³

¹東海大学医学部 総合診療学系 健康管理学, ²東海大学医学部 内科学系 消化器内科学,
³東海大学医学部 基礎医学系 生体防御学

背景：クローン病(CD)は現在でも発症原因は不明であり根本治療がなく、再燃と寛解を繰り返す難病である。CD発症の因子の一つとして、腸内細菌叢のバランスの破綻がある。米国ミシガン大学の研究では、無菌マウスへ炎症性腸疾患(IBD)患者由来の腸内細菌を定着させると、腸管内で炎症惹起性遺伝子が過剰発現することを明らかとし、IBDの病態に強く関与する腸内細菌叢の存在を示した(*Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016)。中でも、我々はCDにおいて炎症の好発部位である回腸末端から約40%の割合で分離されるAIECに注目し(*Gastroenterology*, 2014), *in vivo*においてAIECを定着させることで宿主の腸管に慢性炎症が持続し、著明な腸管線維化が誘導されることを報告している(*Mucosal Immunol*, 2019)。そして、今年に入りCD狭窄の術後検体からAIEC保菌者の有無を判断することで、保菌者の方が明確に術後再狭窄を起こすことが報告された(*Gut*, 2023)。ところが、頻度は少ないがAIECは健康人の腸管でも分離され(約6%)、常時病原性を持つ細菌ではないが、病原性と関連した性状を有するものの共生菌として振る舞う“病原性共生菌(Pathobiont)”と考えられている。Pathobiontは、宿主への感染・定着のみでは病原性は発揮せず、周囲の腸内細菌叢組成変化や宿主免疫応答の低下などの要因により共生状態から攻撃的な病原細菌へと変化する腸管内共生細菌である。そこで我々は、CDにおけるAIECと宿主免疫応答の関係を明らかにし、新たな病態解明とともに新規治療法の開発を目指している。中でも、下記の報告を参考に我々はIgAとの関与について注目した。CD患者由来のIgA結合細菌群をSPFマウスに投与すると実験的慢性腸炎を悪化させ、全く病態に影響を与えないIgA非結合細菌群と性状が大きく異なることが示されて



いる(*Cell*, 2014)。すなわち、IgA結合細菌は宿主にとって病原性を有すると判断されており、これを指標に、IgA応答の基礎研究を開始した。

方法・結果：アンピシリンとストレプトマイシンの抗菌薬の前処置を行うことでSPFマウスにAIECの代表株であるLF82株を長期に維持する実験系の構築に成功し、さらに、同マウスの糞便中のAIEC LF82株に結合するIgAが2~3週目以降に急激に誘導され維持されることを見出した。一方、病原性を持たない一般大腸菌(HS株)は、マウスに同様に定着はするもののIgA応答を誘導しないこと、さらには、AIEC感染で誘導されるIgAは一般大腸菌には反応せず、AIECに高い親和性があることを見出した。これらの知見から、この抗AIEC-IgA抗体は、AIEC依存的なCDの病態治療に貢献し得る可能性があるかと仮説した。そこで次に、AIEC LF82感染マウスの腸管粘膜組織より分離したB細胞から抗AIEC-モノクローナルIgA抗体を産生するハイブリドーマの作製に着手し、成功し

ている。さらに、AIECの各病原性抗原の欠損変異株に対する同モノクローナルIgA抗体の交差反応性変化を網羅的に解析した結果、抗AIEC-モノクローナルIgA抗体はAIECが上皮細胞に接着侵入する際に使用するOmpAやFimHを抗原として認識している可能性を示した。この抗体の特徴を活かし、*in vitro*にてAIECの上皮細胞への接着阻害能を有することを示し、抗AIEC治療への可能性を示唆した。さらに、現在、実際のCD患者の糞便サンプルにLF82株を割合を変えて混入したAIEC保菌者モデルのサンプルを作成し、同モノクローナルIgA抗体を用いて診断技術への応用を試みている。図1に示すように、フローサイトメトリー法にて明確に混入割合に応じて応答を確認しており、現在さらなる研究を進めている。

考察・結論：我々は、CD特有の腸内細菌AIECが線維化の誘導に寄与すること(*Mucosal Immunol*, 2019)、さらに、菌周病モデルマウスの口腔内・腸管内で共通してEnterobacteriaceaeが検出されTh1 /

Th17タイプの炎症が惹起されることを報告した(*Cell*, 2020)。このような明らかな病原性が証明される腸内細菌がどのように宿主の獲得免疫と共存し、共生菌として認識されているのかを解明しようとする研究が国内外で行われている。本研究を通してCDの病態に関連したpathobiontへの特異抗体が作製できれば、細菌叢全体へ影響を与えずにpathobiontのみを選択的に排除可能となることが期待される。CDの約35%に合併する腸管線維性狭窄は内科的治療に難渋し、約半数が外科手術を余儀なくされ、もしpathobiontの存在が関与しているとすれば、pathobiontの存在診断が将来の予測因子となること、さらには、pathobiontに対する単細菌治療が新たな腸管狭

窄の治療へつながると考えられる。近年注目すべき報告として、接着侵入能を有する大腸菌に対し、fimHという特有抗原のアンタゴニストが細菌の接着能を阻害することがわかり(*Nature*, 2017)、現在小化合物製剤として開発につながっており、実現可能性が高いものと考えられる。このように特定のpathobiontをターゲットする方法は広がっていく可能性が高い。一方で、どのCD患者がAIECを含む病原性共生菌を保有しているのかの診断は、古典的な分子生物学的手法でしかなく、どの患者にこのような薬剤を投与したら効果的かという判断はできない。本研究にて創出したモノクローナル抗体は同じ菌種でも高い親和性で病原性の有無を明確に識別する能力を有してお

り、糞便中の保菌診断に応用できれば、患者層別化の課題解決が期待でき、個別化診療につながると考える。

この度は第60回日本消化器免疫学会総会において奨励賞を承り誠にありがとうございます。私自身、なぜ? どうしてなのか? という小さな疑問から深掘りし、時に試行錯誤しながら、気が付けば少しずつ研究が進んでいくという中で、今回の受賞はとても励みになりました。総会のテーマであった「格致日新」を今後も継続していき、精進致しますのでご指導ご鞭撻のほどよろしく申し上げます。(今井 仁)



奨励賞受賞 | 第60回日本消化器免疫学会総会 (2023年10月5日, 6日 ホテルイースト21東京)

腸管の恒常性維持に対するオステオポンチンの多面的な影響

平野 雄大¹ 我妻 康平¹ 山川 司¹ 横山 佳浩¹ 林 優希¹ 平山 大輔¹
石上 敬介¹ 永石 欽和² 仲瀬 裕志¹

¹札幌医科大学 医学部 消化器内科学講座, ²札幌医科大学 医学部 解剖学第二講座

背景と目的: 炎症性腸疾患(IBD)は、潰瘍性大腸炎(UC)とクローン病(CD)を含む腸管の慢性炎症性疾患である。UCとCDの病因は不明であるが、IBDの病態は腸内細菌叢の多様性低下(dysbiosis)と関連していることが知られている(Lloyd-Price et al., 2019)。

オステオポンチン(OPN)は細胞外タンパク質であり(Franzén and Heinegard, 1985)、腸管上皮やマクロファージ、樹状細胞、Tリンパ球などの免疫細胞を含む様々な組織や細胞に発現している(Brown et al., 1992)。OPNは、免疫調節、炎症、腫瘍の進行・転移など、様々な生理学および病理学的プロセスに関連することが報告されている(Wang and Denhardt, 2008; Ramaiah and Rittling, 2008; Rittling and Chambers, 2004)。また、OPNは腸管粘膜のタイトジャンクションの維持に寄与しており、腸管においても役割を有する。活動性の炎症性腸疾患患者ではOPNの発現が腸粘膜と血清で増加しており、腸管炎症との関連が示唆されている(Sato et al., 2005; Mishima et al., 2007)。デキストラン硫酸ナトリウムを用いたマウスモデルでも、急性・慢性腸炎双方でOPNが病態に関与することが示されている(Zhong et al., 2006; Heilmann et al., 2009)。これらの所見は、OPNがIBDの病態生理に寄与している可能性を示唆している。しかし、OPNが腸内細菌叢に及ぼす影響については不明な点が多い。本研究では、腸内細菌叢とその代謝産物の観点から、大腸の恒常性維持にお

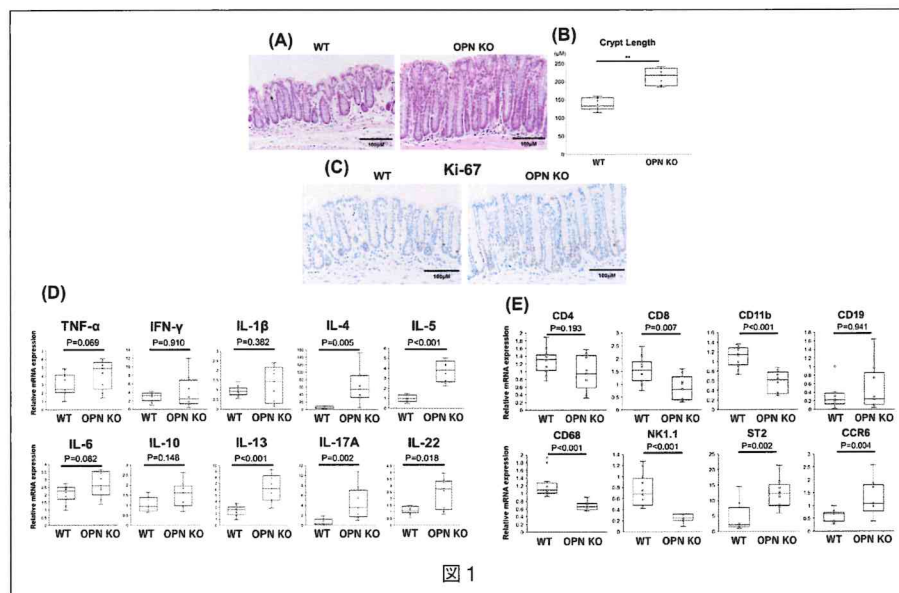


図 1

けるOPNの役割をマウスモデルにより評価することを目的とした。

方法: Wild Type (WT)マウス(n=12)とOPN knockout (KO)マウス(n=9)をSPF環境で飼育した。生後16週齢でマウスから結腸を摘出し、組織学的差異を比較検討した。遠位結腸からmRNAを抽出し、炎症性サイトカインの遺伝子発現をRT-qPCR法により比較検討した。また、両群で生後4・8・16週齢において糞便を採取し、糞便中の細菌叢について16s rRNA遺伝子解析を行った。大腸組織については、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)法によるメタボローム解析も行った。

結果: WT, OPN KOマウスとも下痢・

血便など自然腸炎を示唆する症候は認めなかった。組織学的には、OPN KOマウスで腺管長が有意に延長しており(図1A, B)、腺底部のKi-67陽性細胞が増加しており(図1C)、過形成性変化を示した。炎症サイトカインの発現を検討すると、生後16週齢のOPN KOマウスの結腸では、IL-4・IL-5・IL-13・IL-17A・IL-22のmRNA発現がWTマウスと比較し有意に上昇していた(図1D)。これらの所見は、OPN KOマウスの大腸が潜在的に炎症性環境にあることを示唆している。OPNは自然リンパ球(ILC)を含む腸管上皮リンパ球の恒常性維持に関与していることがすでに報告されている(Nazmi et al., 2020)。今回の我々の

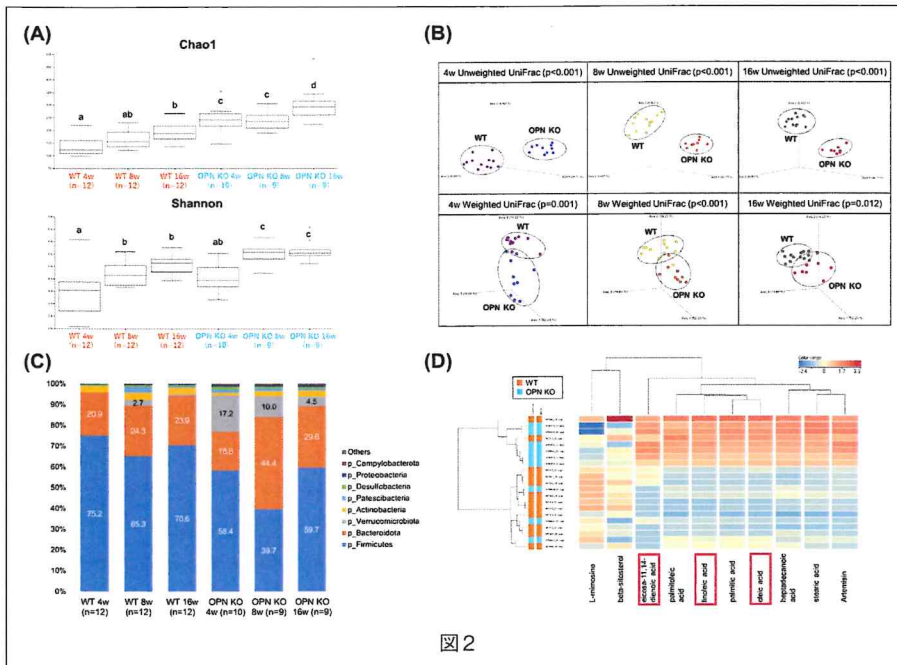


図2

検討では、OPN KOマウスでILC2 (ST2) およびILC3 (CCR6)の表面マーカーの遺伝子発現が上昇しており(図1E)、発現上昇していた炎症性サイトカインは、ILC2 (IL-5, IL-13)およびILC3 (IL-17A, IL-22)のパターンと一致していた。ILC2由来のIL-13は杯細胞の過形成を促進し(Gerbe et al., 2016)、ILC3由来のIL-22は上皮バリア機能を維持するジャンクションタンパク質の発現を誘導し、腸管の恒常性維持に寄与している(Saez et al., 2021)という報告から、OPN KOマウスではILCの活性化が恒常性維持に寄与している可能性があると考えた。

続いて腸内細菌叢の多様性を検討すると、OPN KOマウスでは、WTマウスよりChao1 Index, Shannon Indexともに高く、 α 多様性が向上していた(図2A)。 β 多様性については、Unweighted UniFrac distance, Weighted UniFrac distanceとも各週齢で異なるクラスタリングとなっていた(図2B)。腸内細菌叢の組成に着目すると、門レベルではOPN KOマウスにおいて *Proteobacteria* および *Campylobacterota* の

組成が多いほか、特に若い週齢において *Verrucomicrobiota*の構成比が多いという傾向が得られた(図2C)。IBD患者では、腸内細菌叢の多様性が低下しており(Lloyd-Price et al., 2019)、腸内細菌叢の異常症がIBDの病態に関連していることが示唆される。しかし、OPNの欠損によって炎症性の環境が誘発されているながら、腸内細菌叢の多様性はむしろ上昇していた。また、*Verrucomicrobiota*は免疫系において制御的役割を果たすことが報告されている(Lindenberg et al., 2019)。*Verrucomicrobiota*のうち、*Akkermansia muciniphila*の構成比の多さは患者の長期寛解と正の相関を示すことが報告されており(Rajilic-Stojanovic et al., 2013)、*Verrucomicrobiota*が腸管の炎症に有益な効果を有することが示唆されている。これらの文献的報告も考えると、OPN KOマウスの腸内細菌叢は大腸の恒常性維持に有益な役割を果たしている可能性がある。

最後に、大腸組織を用いたメタボローム解析により、代謝産物の構成比についてもWTマウスとOPN KOマウスとの間で

異なることが明らかになった。我々は、エイコサジエン酸、リノール酸の属する ω -6多価不飽和脂肪酸(PUFA)がOPN KOマウスの大腸組織に豊富に存在することを明らかにした(図2D)。 ω -6 PUFAの存在量と、UC患者の大腸粘膜における炎症の重症度との間には正の相関があることが報告されている(Pearl et al., 2014)。OPN KOマウスの代謝産物は、腸管炎症を促進する組成である可能性がある。

このように、OPN KOマウスの腸管では潜在的に炎症性の環境にあることが示唆され、代謝産物も炎症促進的な組成であった。一方、腸内細菌叢の多様性は向上し、腸管に有益な作用を有する腸内細菌叢が多く存在した。OPN KOマウスで症候性の腸炎が防がれていたのは、腸内細菌叢の代償的な変化に起因する可能性があると考えている。

結論：OPNは、腸内細菌叢と代謝産物のプロファイルを変化させるだけでなく、炎症性サイトカインの発現にも影響を与えた。我々のデータは、OPNが大腸の恒常性維持において多面的な役割を果たしていることを示した。OPNの欠乏は、潜在的な炎症性環境を通して、ヒトにおいてもIBDの発症に寄与している可能性がある。今後、ヒトサンプルを用いたさらなる研究により、IBDの病態生理におけるOPNの役割について、新たな知見がもたらされると考えられる。

この度は第60回日本消化器免疫学会にて奨励賞を賜り、誠に光栄に存じます。仲瀬 裕志 教授をはじめ、日頃より研究についてご指導を頂いている先生方に、この場を借りて深く感謝申し上げます。実験が思うように成果に繋がらないことも多々あるなか、今回の受賞は非常に励みとなりました。腸内細菌叢と消化器免疫との相関について、さらに研究に邁進してまいりたいと考えております。今後ともご指導・ご鞭撻の程よろしくお願ひ申し上げます。(平野雄大)



奨励賞受賞 | 第60回日本消化器免疫学会総会 (2023年10月5日, 6日 ホテルイースト21 東京)

マウスモデルからみたNUDT15遺伝子多型とチオプリン製剤投与が雄性生殖機能に及ぼす影響

今井 隆行¹ 河原 真大² 横田 佳大¹ 大槻 晋士¹ 大野 将司¹ 西田 淳史¹ 角田 洋一³ 安藤 朗¹

¹滋賀医科大学 消化器内科, ²滋賀医科大学 血液内科, ³東北大学 消化器内科

背景・目的：チオプリン製剤は炎症性腸疾患の寛解維持療法に広く使用されているが、副作用として骨髄抑制、脱毛、肝障害、瘰癧などが報告されている。アジア人は欧米人と比較して低容量でも白血球減少をき

たすことが知られており、チオプリン製剤の減量や中止が必要になる症例がある。ゲノムワイド相関解析により、チオプリンの代謝酵素であるNUDT15の遺伝子多型が重篤な骨髄抑制と関連することが明らかと

なった。我々は日本人最多のアレル頻度(約10%)を持つ *Nudt15*^{R139C}に対応する *Nudt15*^{R138C}を保有するノックインマウスを確立し、*Nudt15*^{R138C}ホモ型マウスの造血幹細胞がチオプリンにより障害されるこ

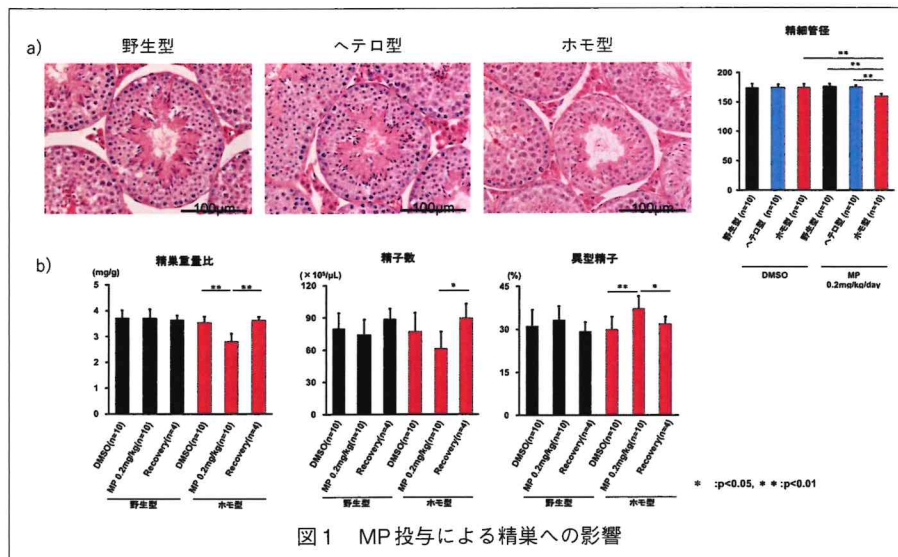


図1 MP投与による精巣への影響

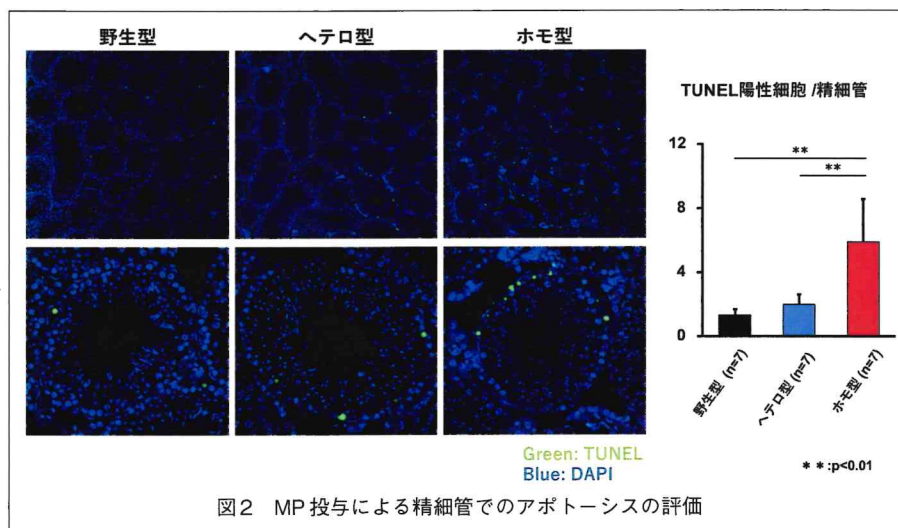


図2 MP投与による精細管でのアポトーシスの評価

とを報告してきた。また、*Nudt15^{R138C}* ノックインマウスを用いて妊娠中のチオプリン製剤投与の胎仔への影響を検討し、マウスモデルでの検討であるが、妊娠中のチオプリン投与の胎仔へのリスクを明らかにした。しかし、チオプリン製剤投与による *NUDT15* 遺伝子多型を有する精巣特に造精機能への影響については未だ報告されていない。今回、我々は *Nudt15^{R138C}* ノックインマウスを用いて、チオプリン製剤が造精機能へ及ぼす影響を検討した。

方法：オスの *Nudt15^{R138C}* ホモ型マウス、ヘテロ型マウス、野生型マウスにメルカプトプリン (MP) (0.2mg/kg/day 12週間または0.5g/kg/day 4週間) を経口飲水により投与し、精巣を摘出して精巣重量、精細管形態を評価した。また精巣上体より精子を採取して精子数、精子形態を評価した。TUNEL法により精細管の造精細胞のアポトーシスについても評価した。MP投与後のマウスと野生型マウスを交配させて、妊娠率と出生マウス数の評価を行うことにより、妊娠能を検討した。

結果：ホモ型の耐用可能量である MP

(0.2mg/kg/day) を12週投与した場合、ホモ型ではヘテロ型及び野生型と比較して体重あたりの精巣重量が減少した (p<0.01)。精巣の組織学的評価を HE 染色で実施したところ、精細管は萎縮しており、精細管径を測定したところ、ホモ型で有意に精細管径の減少を認めた (p<0.01) (図1a)。次に精巣の萎縮が精子に影響を及ぼしているか評価するために、精巣上体にある精子を評価した。精子数については、ホモ型で有意な減少は認めなかったが、一方で精子の奇形率はホモ型で有意な増加を認めた (p<0.05)。これらの変化が妊娠にどのような影響を及ぼすか検討する目的で、MP投与後のマウスと野生型マウスを交配して、野生型マウスの妊娠率及び出生仔マウス数を評価した。野生型とホモ型では、妊娠率及び仔マウスの出生数に有意な差は認めなかった。またチオプリン製剤が精細管や精子に与えた影響が可逆的かどうか評価する目的で、MP (0.2mg/kg/day) を12週投与した後に、MP投与を中止して12週間後に精巣の評価を行った。MP投与で減少した精巣重量比、精子数はMP中止で改善した。

またMP投与で増加した異型精子の割合は低下を認めた。これらのことからホモ型でも投与可能なチオプリン投与量であったとしても、造精機能を抑制され、その変化はチオプリン投与中止で改善し、可逆性を認めることが示された。

精細管萎縮の機序を検討するために、ヘテロ型で耐用可能量であるMP (0.5mg/kg/day) を4週投与したところ、ホモ型で高度な精巣重量、精細管径の減少を認めた (p<0.01) (図1b)。野生型とヘテロ型では、有意な差は認めなかった。また、ホモ型では精細管の基底膜近傍の細胞にTUNEL陽性細胞の増加を認めた (p<0.01) (図2)。これらのことからチオプリン投与により造精機能が障害される機序として、精細管の基底膜近傍に存在する精粗細胞が障害され、精巣萎縮に至った可能性が示唆された。

結論：*NUDT15* 遺伝子多型を考慮したチオプリン製剤の精巣機能への影響を検討した報告はなく、マウスモデルを用いた検討ではあるが、今回初めての検討である。MP (0.5mg/kg/day) の4週間の投与では、ホモ型のマウスで、精細管の基底膜近傍の細胞にTUNEL陽性細胞の増加を認めた。*Nudt15^{R138C}* ノックインマウスでは、*NUDT15* 活性低下を認めるが、活性低下によりチオプリンの代謝産物である6TGTPや6TdGTPを増加させて精原細胞に障害を与えたと考えられる。これらのことは、これまでチオプリンが障害することが報告されていた骨髄や毛包と同様に細胞増殖が盛んな細胞である精原細胞にも障害を与えたと考えられた。

チオプリン製剤は、造精機能や精子の機能には影響を与えず、子にも影響がないことがこれまで報告されているが、これらの検討は、*NUDT15* 遺伝子などのチオプリン代謝に関連した遺伝背景を考慮した検討ではない。*NUDT15* 遺伝子多型アレルを持つ場合、チオプリン投与により造精細胞のアポトーシスが誘導されて精細管萎縮を来すことが示唆されたが、マウスを用いた検討であり、チオプリン代謝の遺伝的な背景を加味したヒトでの検討が今後必要である。

この度は第60回日本消化器免疫学会総会において奨励賞の栄誉を賜り誠に光栄に存じます。日頃よりご指導頂いている安藤教授、西田先生をはじめ研究室のグループの方々へ厚く感謝申し上げます。今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。(今井隆行)

