

NewsLetter Vol.25 No.3

奨励賞受賞 | 第61回日本消化器免疫学会総会 (2024年12月5日, 6日 出島メッセ長崎)

MEFV遺伝子変異が日本人の炎症性腸疾患の臨床像に与える影響

我妻 康平¹ 中村 友哉¹ 林 優希¹ 齋藤 大祐² 井戸川 雅史³ 松浦 稔² 久松 理一² 仲瀬 裕志¹

¹札幌医科大学医学部 消化器内科学講座, ²杏林大学医学部附属病院 消化器内科, ³札幌医科大学フロンティア研ゲノム医科学

背景と目的: Mediterranean fever gene (*MEFV*) 遺伝子は家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever: FMF) の原因遺伝子である。分類不能腸炎 (unclassifiable inflammatory bowel disease: IBD-U) の中に、*MEFV* 遺伝子変異を伴う症例が存在することが報告されている (Arasawa S, et al. The Lancet 2012, Yokoyama Y, et al. Clin J Gastroenterol 2021 Shibata Y, et al. Clin J Gastroenterol 2021)。本邦の報告では、*MEFV* 遺伝子変異を伴う IBD-U 症例において、FMF の治療薬であるコルヒチンの治療効果を認める症例が 84.6% であったと報告されており (Nakase H, et al. EBioMedicine 2024), IBD-U の病態に *MEFV* 遺伝子変異が関与している可能性が示唆されている。*MEFV* 遺伝子変異は、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) やクローン病 (Crohn's Disease: CD) と診断された症例においても報告されており、*MEFV* 遺伝子変異が炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) の病態に関与していることが示唆されている (Urganci N, et al. Turk J Gastroenterol 2021, Papadopoulos VP, et al. JGLD 2022)。しかし、UC や CD 症例における *MEFV* 遺伝子変異は、トルコなどの地中海沿岸からの報告が多く、本邦からの報告は少ないのが現状である。また、*MEFV* 遺伝子変異の頻度と部位は地域や人種によって異なることが報告されている (Kishida D, et al. Arthritis Res Ther 2014)。

本研究の目的は、日本人 IBD 患者における *MEFV* 遺伝子変異の頻度および臨床像への影響を検討することである。

方法: 対象患者は、2021年4月から2023年3月までの間に、札幌医科大学附属病院または杏林大学病院 消化器内科を受診し、UC または CD と確定診断された症例とした。年齢や性別による除外基準は設けなかった。対象患者の全血を用いて、*MEFV* 遺伝子の全エクソン領域を解析した。日本人集団における遺伝子の変異確率と比較するため、日本人 38,000 人のゲノムデータベースを参照した。また、臨床データ

(腸管外合併症の有無、治療内容、ステロイド依存性および耐性、CRP, SAA など) を後ろ向きに収集した。主要評価項目は、*MEFV* 遺伝子変異と IBD の臨床的特徴との関連性とした。

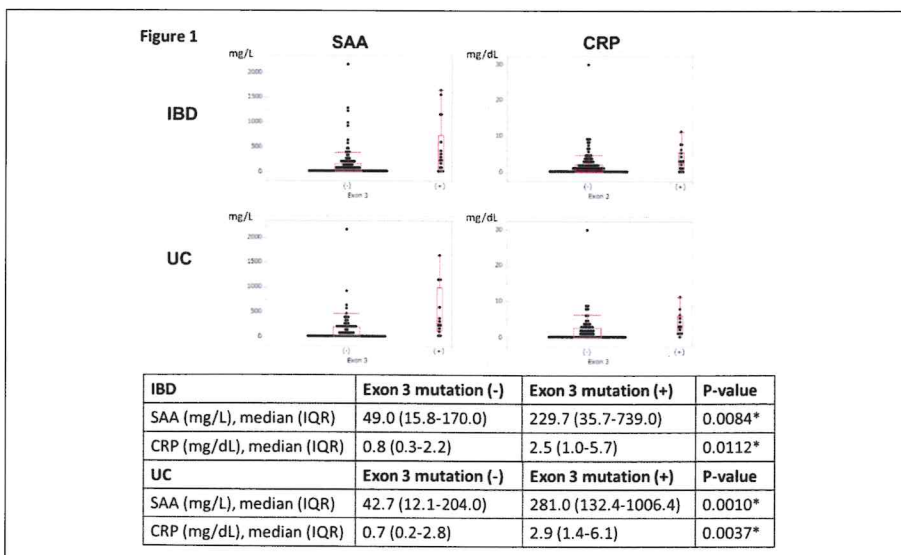
結果: 400 人の IBD (UC, CD) 患者が登録された。9 人の患者は血液検体不足のため *MEFV* 遺伝子を解析できず、最終的に 391 人の患者について *MEFV* 遺伝子解析と臨床情報の収集を行った。まず、391 人の IBD 患者の患者背景を示す。疾患の内訳は UC が 66.5%, CD が 33.5%, 罹病期間は UC が 9.3 年, CD が 12.0 年, 病型は UC では全大腸炎型が 62.8% と最も多く、CD は小腸大腸型が 60.0% と最も多かった。腸管外合併症は UC の 9.6%, CD の 13.0% に認められた。腸管外合併症の内訳としては、関節症状、皮膚症状、眼症状、原発性

硬化性胆管炎 (PSC)、自己免疫性脾炎 (AIP)、血栓症を認めた。治療関連では、ステロイド依存性を UC の 15.0%, CD の 14.5% に認め、ステロイド抵抗性を UC の 33.1%, CD の 8.4% に認めた。分子標的薬を 1 剤以上使用した症例は、UC の 45.8%, CD の 83.2% であった。次に *MEFV* 遺伝子の変異について示す。IBD 全体では、地中海沿岸に多い exon 10 の変異は少なく、exon 2, exon 3 の変異を多く認めた。データベースから得られた日本人の *MEFV* 遺伝子の各変異割合と比較すると、本研究の IBD 患者では、すべての *MEFV* 遺伝子変異において変異の頻度が高かった。続いて UC と CD に分けて検討した。UC では IBD 全体と同じ傾向を認めた。CD では exon 3 の変異が UC よりは低いものの、それ以外では同じ傾向を認めた。また、1 人の患者

Table 1. Number of *MEFV* mutations in ulcerative colitis and Crohn's disease

	Number of mutations					
	total	positive	mono	two	three	four
IBD	391	232 (59.3%)	138 (35.3%)	69 (17.6%)	20 (5.1%)	3 (0.8%)
CD	131	74 (56.5%)	48 (36.6%)	22 (16.8%)	3 (2.3%)	0 (0%)
UC	260	158 (60.8%)	90 (34.6%)	47 (18.1%)	17 (6.5%)	3 (1.5%)

CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis.



が持つMEFV遺伝子変異の数についても検討した。頻度が50%を超える変異(P221R, D424E, G436R)を除いた場合、IBD患者の59.3%に1つ以上のMEFV遺伝子変異を認め、2つ以上の変異を有する症例は24.0%であった(Table 1)。

次に、exon変異と、臨床像との関連を調べた。exon 2の変異を有するIBD症例は、腸管外合併症を有する症例やカルシニューリン阻害薬の使用例が多い結果であった。exon 3変異を有するIBD症例は、血栓症を有する症例が多く、またSAAやCRPがより高値であった(Figure 1)。UCでも同様の傾向であった(Figure 1)。続いて、遺伝子レベルで同様の検討をした。G250RはIBD全体では、腸管外合併症全体、皮膚症状、PSC、AIP、血栓症と関連しており、カルシニューリン阻害薬の使用例が多かった。UCでも概ね同様の傾向であった。P373Qは、IBD全体では、腸管外合併症全体、PSC、AIPと関連しており、カルシニューリン阻害薬の使用例が多く、SAA

やCRPが高値であった。UCでも概ね同様の傾向であった。

考察：MEFV遺伝子変異は、IL-1 β の過剰活性化を招き、全身性炎症を引き起こす(Charles A, et al. New England J Med 2009)。これまでの検討では、IBD患者においてMEFV遺伝子変異が腸管外合併症や炎症反応上昇に関連するという報告があるものの、地中海沿岸におけるexon 2やexon 10の報告が多いのが現状である(Papadopoulos VP, JGLD 2022)。今回の検討では、exon 2やexon 10の他に、exon 1, exon 3, exon 5にも変異を有する症例が確認され、本邦における地域特異性を示唆する結果となった。

次に、本検討ではMEFV遺伝子変異と腸管外合併症に関連を認めた。本研究におけるCRPやSAAの高値を伴うMEFV遺伝子変異例では、重篤な腸管炎症が腸管外合併症の発症に関与している可能性がある。また、ぶどう膜炎(Fabiani C, et al. Clin Rheumatol 2017)や、壊疽性膿皮症(Ben

Abdallah H, et al. Dermatology 2022)に対するIL-1 β 阻害薬の治療効果を示した報告があり、腸管外合併症の発症にIL-1 β が直接関与している可能性もある。

結語：日本人のIBD患者のMEFV遺伝子変異を有する頻度は健常者よりも高く、MEFV遺伝子変異がIBDの臨床像に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

このたび、第61回日本消化器免疫学会において奨励賞を受賞できましたことを、大変光栄に思います。発表当日は大変緊張しておりましたが、貴重なご意見を頂戴し、本研究を評価していただき、深く感謝申し上げます。本賞を励みに、今後も消化器免疫の研究の発展に貢献できるよう尽力してまいります。最後に、ご指導・ご支援を賜りました先生方、共同研究者の皆様に、心より御礼申し上げます。(我妻康平)



奨励賞受賞 | 第61回日本消化器免疫学会総会(2024年12月5日, 6日 出島メッセ長崎)

抗インテグリン α V β 6自己抗体を用いた潰瘍性大腸炎の原因となる腸内細菌の探索

和田 一成^{1,2} 森田 直樹¹ 高橋 慧崇¹ 古谷 弦太¹ 中西 梨沙³ 栗田 威³ 塩川 雅広³ 新藏 礼子¹

¹東京大学 定量生命科学研究科 免疫・感染制御研究分野, ²東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻,

³京都大学大学院医学研究科 消化器内科学講座

背景・目的：潰瘍性大腸炎(UC)は血便、下痢、腹痛などの症状が寛解と再燃を繰り返す慢性的な炎症性疾患である。発症の原因として、腸内細菌の関与や免疫反応の異常などが挙げられている。特に、免疫反応の異常として、UC患者の血清中で抗インテグリン α V β 6 IgG自己抗体が特異的に検出されることが明らかになっている(Kuwada et al., 2021)。インテグリン α V β 6は細胞外マトリックス分子に存在するRGD配列を認識し、結合することで上皮細胞と細胞外マトリックスとの接着に関与する分子である。この結合部位に抗インテグリン α V β 6自己抗体が結合することで、大腸上皮細胞の基底膜からの剥離が誘導され、潰瘍が形成されるのではないかと考えられている。

UCの発症における自己抗体や腸内細菌の関与は間接的に証明されているものの、発症機序の解明や治療法の確立には至っていない。このことから、UCの原因を明らかにするためには腸内細菌と自己免疫の両方に着目した研究を行うべきであると考えた。そこで本研究では、1つの仮説としてUC患者ではある種の腸内細菌に対して産生された抗体が交差反応して、インテグリン α V β 6に対する自己抗体としてはたらくしていると考えた。この仮説を基に、抗インテグリン α V β 6自己抗体が強く結合する腸内細菌を探索することで、その細菌がUCを惹起するかどうかを証明することを目的とした。

方法・結果：便サンプル内には多くのヒト抗体が存在しているため、抗ヒトインテグリン α V β 6自己抗体と便サンプル中の腸内細菌の結合を確認するためには、便サンプル内の内在性ヒト抗体と実験に用いる抗体を区別する必要がある。そこで、UC患者血清由来のモノクローナル抗ヒトインテグリン α V β 6 IgG自己抗体の定常部をマウスIgGおよびマウスIgAに組み替えたリコンビナント抗ヒトインテグリン α V β 6マウスキメラ抗体を作製した。作製したマウスキメラ抗体が腸内細菌に結合するのかをFACSで確認した結果、定常部をマウスIgAに組み替えた抗体(rmIgA2, rmIgA4)で腸内細菌との強い結合が確認できた(図1A)。さらに、マウスIgAキメラ抗体が健常人と比較して、UC患者の腸内細菌に強く結合することも明らかになった(図1B)。次に抗体結合菌と非結合菌をセルソーターで分離し、解析を行うことで、各細菌科に対するマウスIgAキメラ抗体の反応性を評価した。今回、反応性の評価に用いたIgA indexはその数値が0より高ければ抗体が強く結合した菌であることを示す。IgA indexの結果からUC患者のペイロネラ科、フソバクテリウム科、バクテロイデス科、ラクノスピラ科の細菌にマウスIgAキメラ抗体が強く結合することが明らかになった(図1C)ので、これら4種の細菌科が全菌叢に占める割合を健常人とUC患者で比較したところ、ペイロネラ科の細菌がUC患者に有意に多く存在した一

方で、他3種の細菌の相対存在量はUC患者と健常人の間で有意差が見られなかった(図1D)。このことから、ペイロネラ科の細菌がUCに関連がある細菌だと考え、種レベルでさらに詳細に調べた結果、すべてのUC患者に共通して存在する細菌として、*Veillonella dispar*を同定した。そこで、*Veillonella dispar*をUCの原因候補菌とし、この細菌に実際にマウスIgAキメラ抗体が結合するのかをFACSで確認した結果、*Veillonella dispar*に対するマウスIgAキメラ抗体の強い結合が確認できた(図1E)。以上の結果から、抗インテグリン α V β 6自己抗体が*Veillonella dispar*に交差反応性を示すことが明らかになった。

次に、*Veillonella dispar*がUCの発症または重症化に関与するのかを明らかにするため、マウスへの*Veillonella dispar*投与実験を行った(図2A)。まず、*Veillonella dispar*投与によってDSS誘導性大腸炎の症状が変化したのかを確認するため、糞便中の抗体濃度および炎症マーカーであるリポカリン-2濃度を測定した結果、*Veillonella dispar*投与群で42日目以降に抗体濃度、リポカリン-2濃度がともに上昇していることが明らかになった(図2B, C)。さらに大腸組織のHE染色像を比較したところ、*Veillonella dispar*投与群でより重度な大腸炎の症状が観察できた(図2D)。以上の結果から、*Veillonella dispar*投与によって、DSS誘導性大腸炎の症状が悪化することが示唆された。しかし、糞

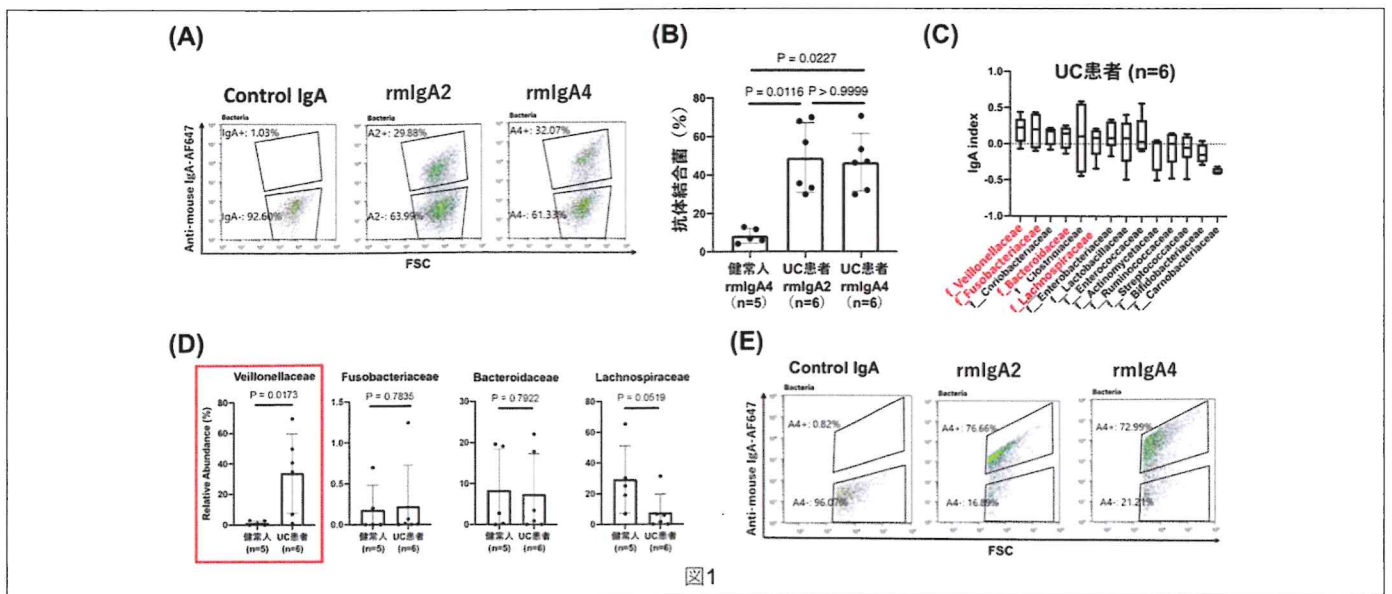


図1

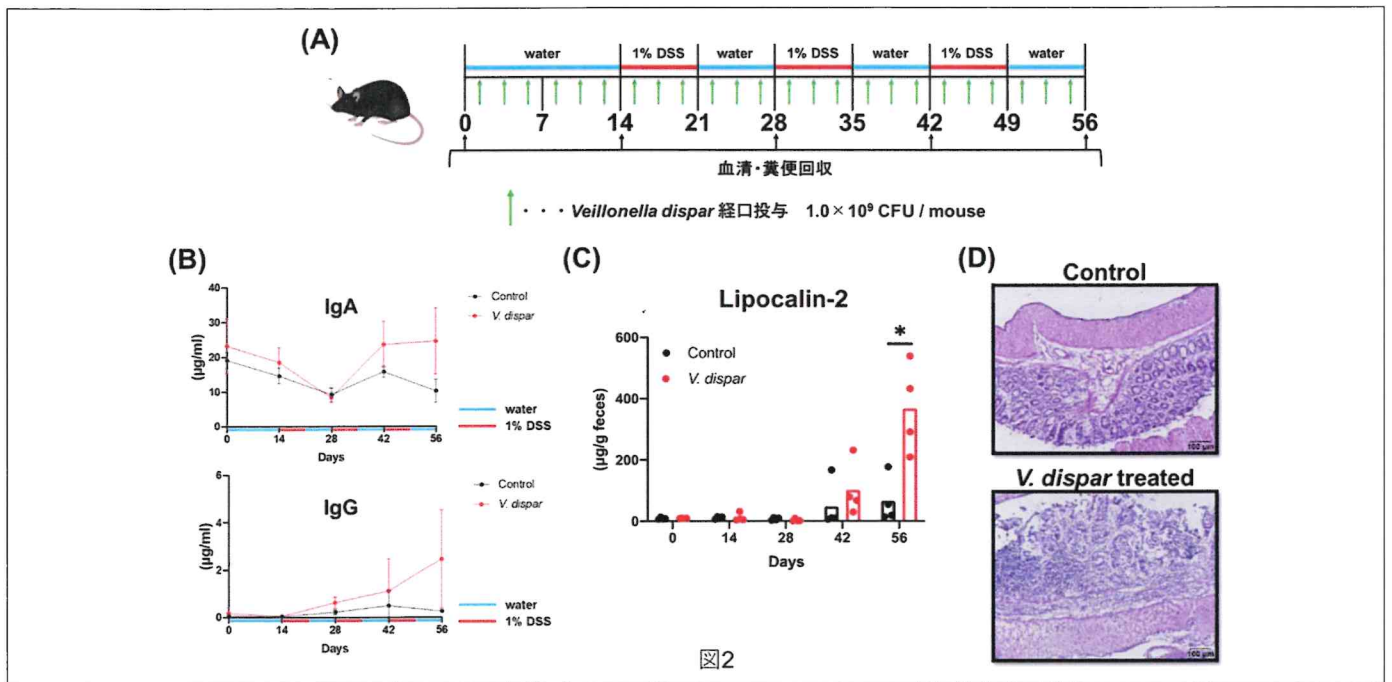


図2

便および血清中に抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の存在は確認できず、今回の実験系では *Veillonella dispar* に対する抗体が抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体として交差反応するという仮説を裏付ける結果は得られなかった。

結論：今回、内在性ヒト抗体が結合する多くの腸内細菌の中から、抗ヒトインテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体が結合する特定の腸内細菌を分離するために、定常部を組換えたマウスキメラ抗体を作製した。さらに、作製した抗体を用いて分離した細菌の解析を行うことで *Veillonella dispar* という細菌に抗ヒトインテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体

が強く結合するということを明らかにし、これを UC 原因菌の候補とした。この *Veillonella dispar* をマウスに投与した結果、DSS 誘導性大腸炎の症状が悪化したことから、*Veillonella dispar* が UC を悪化させる腸内細菌であることが示唆されたが、抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の産生はみられなかった。今後は、免疫異常のみられる遺伝子改変マウスに対して、*Veillonella dispar* をはじめとした抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体結合細菌を投与することで、UC の発症機序を明らかにしたいと考えている。

この度は第61回日本消化器免疫学会総会において奨励賞を賜り、大変光栄に存じます。これまでご指導いただいた先生方、先輩方に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。研究を続けているとなかなか成果が出ないこともありますが、今回の受賞は今後の研究活動における何よりの支えになると思います。潰瘍性大腸炎の発症機序の解明を目指した研究を継続していきますので、今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。(和田一成)



D-alanine Inhibits Murine Intestinal Inflammation by Suppressing IL-12 and IL-23 Production in Macrophages

橋本 光 (大阪鉄道病院, 京都府立医科大学 消化器内科学教室)



アミノ酸はその分子内にアミノ基とカルボキシル基をもつ化合物の総称であり、生体タンパク構成アミノ酸20種のうちグリシンを除く19種では光学異性体としてL体とD体が存在する。分析技術の向上により哺乳類においても、血中・組織中にD体アミノ酸 (DAA) が検出されることが示されており、L体とD体では生体内で機能的に異なる生理活性を持つことが明らかとなってきた。近年の報告では腸内細菌が哺乳類における便中のL体アミノ酸 (LAA) をDAAに変換することが明らかとなり、哺乳類におけるDAAの供給源の一つとして注目されている。腸管炎症病態におけるDAAの役割・意義については、マウスナイーブT細胞移入腸炎モデルにおいて、D-セリン経口投与により腸管炎症が抑制されること、この腸管炎症抑制効果はL-セリンでは確認されないことが報告されているものの、腸炎におけるDAAの役割については十分な検討はなされていないのが現状である。そこで、今回、我々は健康成人と潰瘍性大腸炎患者におけるDAAのプロファイルは明らかにし、デキストラン硫酸ナトリウム (Dextran Sulfate Sodium: DSS) による大腸炎マウスにおいてDAAの腸管炎症における動態ならびにD-アラニン (D-Ala) による炎症抑制効果を検討した。

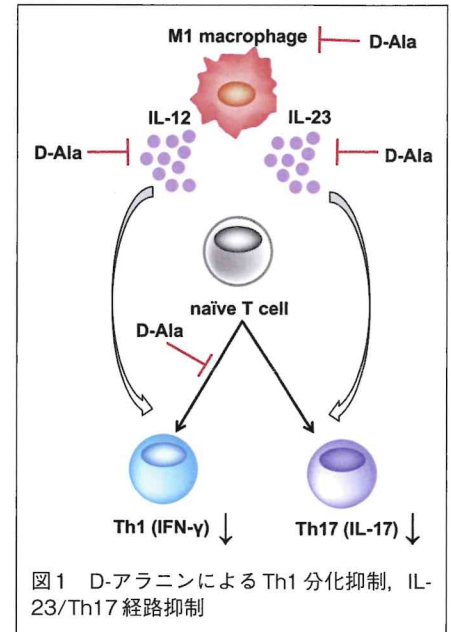
2019年11月～2021年8月に京都府立医科大学附属病院 消化器内科外来を受診した、もしくは、同院消化器内科にて入院した潰瘍性大腸炎患者40名、ならびに健康成人34名を対象としそれぞれ血液中LAAおよびDAAを網羅的に定量し、潰瘍性大腸炎患者におけるDAAのプロファイルの評価を行った。被験者においてD-Ala, D-アスパラギン, D-プロリン, D-セリンが検出されたが、その他のDAAは検出感度以下であった。さらに、健康成人と比較し潰瘍性大腸炎活動期患者において血中D-Alaならびに血中D-Ala/L-Ala比の低下を認めた。

上述したヒトを対象とした血中DAA濃度解析結果を受けて、7週齢雄性C57/BL6マウスを用いて2.5%DSS惹起性大腸炎モデルを作製し、血液、尿、便中のDAA濃度を解析した。その結果、ヒト潰瘍性大腸炎活動期患者と同様にマウス2.5%DSS惹起性大腸炎モデルにおいても血中D-Ala濃度の低下が認められた。また、腸内細菌叢と血中D-Ala濃度との関連性を検証した。腸内細菌叢解析において、DSS惹起性大腸炎マウスにおいて有意に減少する

菌種が抽出され、これらの減少する菌種のなかで *g_Prevotella*, *g_Adlercreutzia*, *f_S24-7* は血中D-Ala濃度と強い正の相関を示した。

ヒト潰瘍性大腸炎患者、ならびに、マウスDSS惹起性大腸炎において血中D-Ala濃度が低下する知見を得たことを背景に、D-Ala投与による腸管炎症病態への影響を検証した。コントロール群として生理食塩水を腹腔内注射 (sham+vehicle群), D-Alaの腹腔内注射投与 (sham+D-Ala群), L-Alaの腹腔内注射投与 (sham+L-Ala群), 2.5%DSS惹起性大腸炎マウスにおいても、生理食塩水を腹腔内注射 (DSS+vehicle群), D-Alaの腹腔内注射投与 (DSS+D-Ala群), L-Alaの腹腔内注射投与 (DSS+L-Ala群) を設定し、6群で検討を行った。DSS投与開始7日後に解剖を行い、体重、腸管長、Disease activity index (DAI) スコア、組織学的所見、大腸粘膜におけるサイトカインmRNAの発現を検討した。その結果、DSS惹起性大腸炎マウスにおいてDSS+D-Ala群ではDSS+vehicle群, DSS+L-Ala群と比較し体重の減少率、腸管長の短縮、DAIスコア、組織学的スコアにおいて有意に腸管炎症が抑制されていた。大腸粘膜における各種サイトカインmRNA発現を検討したところ、D-Ala投与により大腸粘膜内IFN- γ , IL-12p35, IL-17A, IL-23p19 mRNA発現は有意に低下していた。さらに、大腸粘膜固有層内単核球についてFlow Cytometryを用いて解析を行ったところ、D-Ala投与によりM1型マクロファージ (Macrophage: Mph) への分化が抑制され、Th1細胞, Th17細胞への分化が抑制されることが明らかになった。

また、マウス脾臓より単離したnaïve T細胞を用いてD-AlaによるTh1細胞, Th17細胞分化への影響を検討したところ、D-AlaによりTh1細胞分化は抑制されたが、Th17細胞への分化は抑制されなかった。さらに、マウス骨髄由来単球より分化誘導したマウス骨髄由来マクロファージ (Bone Marrow-Derived Macrophages: BMDM) から分化誘導させたM1型Mphを用いて



M1型Mph分化やサイトカイン産生におけるD-Alaの影響を検討した。その結果、D-Alaがマウス骨髄由来M1型MphのIL-12p35, IL-23p19 mRNA発現を有意に抑制することが明らかとなった。

近年、DAAの生体での機能性についての報告がなされつつあるが、腸管炎症病態におけるDAAの役割については未解明の課題となっていた。本研究においてD-アラニンによるマクロファージやリンパ球への作用が明らかとなり、D-アラニンによるTh1, M1分化抑制を介した腸管炎症病態を抑制する機構の一端への関わりが明らかにされた (図1)。MphにおけるIL-12/IL-23産生経路やnaïve T細胞からTh1細胞への分化機構は、炎症性腸疾患のみならず、多くの炎症性疾患・自己免疫疾患の病態形成に関与することが知られている。本知見は、D-Alaを用いた炎症性腸疾患治療への展望のみならず、その他の炎症性疾患・自己免疫疾患に対する新規治療戦略の構築に対しても有用な知見となることが期待された。

この度は2024年度日本消化器免疫学会若手学術賞という名誉ある賞を賜り、恐れ多くも誠に光栄に存じます。理事長の金井隆典先生、御選考いただいた先生方、日頃よりご指導いただいております内藤裕二先生、高木智久先生をはじめ諸先生方にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。D体アミノ酸についてはまだまだ解明されていないことが多く、今回の受賞を励みにより一層この分野の発展に貢献させていただきたいと考えております。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。

(橋本 光)