

氏名	清水 卓也
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	甲第9号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	炎症性腸疾患における有機カチオン膜輸送体の機能と役割

論文審査委員	主査	加藤 将夫
	副査	玉井 郁巳
	副査	中西 猛夫
	副査	檜井 栄一
	副査	中道 範隆

学位論文要旨

OCTN1/SLC22A4 is expressed in intestinal epithelial cells, and is involved in gastrointestinal absorption of a food-derived antioxidant ergothioneine (ERGO). ERGO concentration in circulating blood of patients with inflammatory bowel disease (Crohn's disease) is lower than that in healthy volunteers. Therefore, circulating ERGO is a potential diagnostic marker, although the mechanisms underlying low ERGO concentration in patients are still unknown. Here, we focused on intestinal macrophages, which infiltrate sites of inflammation, and examined possible first-pass uptake and metabolism of ERGO by macrophages. ERGO concentration in blood was lower in mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis than in controls. On the other hand, expression of Octn1 and ERGO concentration in intestinal tissues of DSS-treated mice were higher than in controls. Interestingly, lamina propria mononuclear cells (LPMCs) isolated from DSS-treated mice contained ERGO and its possible metabolite, and showed [³H]ERGO uptake and Octn1 expression, whereas both compounds were undetectable in LPMCs of control mice. Functional expression of OCTN1 was also confirmed in LPS-stimulated human macrophage-like cell line, THP-1. In conclusion, OCTN1 is functionally expressed on activated intestinal macrophages, and ERGO uptake into these immune cells could contribute at least in part to the altered disposition of ERGO in intestinal inflammation.

【背景・目的】

Camitine/organic cation transporter 1 (OCTN1/SLC22A4)は小腸上皮細胞の刷子縁膜に発現し、食餌由来の抗酸化物質 ergothioneine (ERGO) を含む基質の消化管吸収に関与している。これまで所属研究室において、炎症性腸疾患のクローン病患者の血液中ERGO濃度が健康人や潰瘍性大腸炎患者よりも低下することを報告しており、このことはERGOがクローン病の診断マーカーになる可能性を示唆している。しかしながら、そのメカニズムは未だに解明されていない。これまでクローン病患者の回腸粘膜炎症部位におけるOCTN1発現量とERGO濃度は非炎症部位に比べて高いことが報告されているが、腸管ERGO濃度が高いことはERGOの消化管吸収が増加していることを意味しており、クローン病患者の血液中ERGO濃度の低下とは対応しない。したがって、クローン病患者のERGO体内動態変化のメカニズムを解明することは、バイオマーカーとしてのERGOの妥当性を示すのに不可欠である。そこで、本研究では変動メカニズムとして、炎症部位に浸潤する免疫細胞、特にマクロファージに焦点を当て、それら細胞におけるERGOの初回通過取り込みとOCTN1の発現を調べた。さらに、取り込まれたERGOが代謝される可能性についても調べた。

【方法】

炎症性腸疾患の病態研究に広く用いられている腸管炎症モデルの一つである dextran sodium sulfate (DSS)誘発性大腸炎マウスを作製するため、C57BL/6J マウスに2% (w/v) DSS を含む滅菌済み飲用水を摂取させた。腸管上皮細胞と免疫細胞に相当する粘膜固有層単核球細胞(lamina propria mononuclear cells; LPMCs)は、小腸および大腸より単離を行った。ERGO濃度はLC-MS/MSによって定量を行った。In vitroの解析には、ヒト単核球性細胞株THP-1をphorbol 12-myristate 13-acetateによってマクロファージ様細胞に分化させ、その後lipopolysaccharide (LPS)で刺激した細胞を用いた。

【結果・考察】

作製したDSS誘発性大腸炎モデルマウスでは、体重の減少や大腸の短縮、ヘマトキシリン&エオシン染色

した大腸組織切片により上皮細胞・Crypt の脱落や免疫細胞の浸潤が見られており、腸管の炎症が起きていることが確認された。LC-MS/MS により血液中および血漿中 ERGO 濃度を測定したところ、DSS 大腸炎マウスでは control マウスに比べ著しく低下した。これはクローン病患者で以前に見られた血液中濃度の低下と対応している。その一方で、DSS 大腸炎マウスの小腸および大腸上皮細胞の Octn1 の発現は control マウスよりも高かった。この Octn1 の発現上昇と対応して、DSS 大腸炎マウスの組織中 ERGO 濃度は、小腸において control マウスよりも増加傾向が見られ、大腸では著しく増加した。そこで、DSS 大腸炎マウスの小腸・大腸から LPMCs を単離した結果、ERGO が検出されたのに対し、control マウスの大腸 LPMCs は検出限界以下であった。また、DSS 大腸炎マウスの LPMCs 中 ERGO は、小腸の方が大腸よりも高い値を示した。octn1 遺伝子欠損 (octn1^{-/-}) マウスより単離した小腸および大腸 LPMCs においては ERGO が検出されなかった。さらに、DSS 大腸炎マウスの単離 LPMCs では、放射標識体 ERGO の時間依存的な取り込みとタンパクレベルでの Octn1 の発現も確認された。これらのことから、腸管上皮細胞で吸収された ERGO は、腸管炎症時に固有層に浸潤した免疫細胞によって取り込まれることが示された。

さらに、本研究では腸管炎症時に LPMCs に取り込まれた抗酸化物質 ERGO が別の物質に代謝されるかを調べた。ERGO を生体内の活性酸素種の一つである過酸化水素と反応させた結果、LC-MS/MS により m/z 278.0 の物質が検出された。そこで、腸管組織中の m/z 278.0 の物質を測定したが、control および DSS 投与マウスの小腸・大腸において検出されなかった。しかしながら、興味深いことに、野生型の control マウスや octn1^{-/-} の DSS 大腸炎マウスでは検出されなかったが、野生型の DSS 大腸炎マウスの LPMCs でのみ m/z 278.0 の物質が検出された。これらの結果は、腸管固有層に浸潤した免疫細胞が ERGO の代謝に関与していることを示唆している。これは、*in vivo* で炎症時に ERGO が代謝されることを初めて示した例であり、クローン病患者の血液中 ERGO が低下する要因の一つであるかもしれない。

DSS 大腸炎マウスの血液中 ERGO 濃度低下は、腸管固有層に浸潤した免疫細胞における ERGO 取り込みや代謝以外にも、肝臓での ERGO 取り込みの増加や ERGO の尿細管再吸収の減少によっても説明できる可能性がある。しかし、本研究において、DSS 大腸炎マウスにおける肝臓中 ERGO 濃度は、control マウスに比べ低下した。また、DSS 大腸炎マウスの尿中 ERGO/creatinine 比は低下しており、再吸収の減少は見られなかった。したがって、これら肝臓や腎臓でのメカニズムでは、DSS 誘発性大腸炎マウスにおける血液中 ERGO 濃度低下を説明することはできない。

炎症性マクロファージにおける OCTN1 の機能的な発現を *in vitro* で調べるため、THP-1 マクロファージ様細胞で解析を行った。単球およびマクロファージ様細胞において、mRNA およびタンパクレベルでの OCTN1 発現が示された。さらに、LPS 刺激後のマクロファージ様細胞において、時間依存的かつ飽和性の放射標識体 ERGO の取り込みも確認された。これらの結果から、活性化マクロファージにおいて OCTN1 が機能的に発現していることが支持された。これまでにヒトにおいて単球・マクロファージマーカー CD14 陽性細胞に OCTN1 の mRNA 発現が高いことは報告されていたが、本研究が最初にマクロファージにおける OCTN1 の機能的な発現を証明した例となった。

腸管炎症時に OCTN1 と ERGO の病態生理学的な役割を解明するために、野生型と octn1^{-/-} マウスにおいて DSS 誘発性大腸炎モデルを作製し、炎症の重症度の比較を行った。octn1^{-/-} マウスでは、野生型よりも体重減少が著しく悪化し、大腸の長さもより短くなった。大腸組織切片による組織化学的解析では、octn1^{-/-} マウスの方が Crypt 部分の上皮細胞が減少し、浸潤した細胞が増加していた。また、免疫組織染色によっても octn1^{-/-} マウスにおいて粘膜固有層のマクロファージマーカー F4/80 陽性細胞数の増加が見られた。したがって、野生型

マウスに比べ *octn1*^{-/-}マウスの方が DSS 誘発性大腸炎の重症度が高いことが示された。この結果は、以前に虚血再灌流による腸管炎症に対して *octn1*^{-/-}マウスの感受性が高いこととも対応している。したがって、OCTN1 が腸管炎症を抑制する役割を果たしていることが示唆された。

【結論】

本研究により OCTN1 が活性化マクロファージに機能的に発現し、腸管炎症時に腸管粘膜固有層に浸潤する免疫細胞に ERGO が取り込まれることが明らかになった。さらには、これら免疫細胞に取り込まれた ERGO が代謝される可能性も示唆された。これらのメカニズムが DSS 誘発性大腸炎モデルマウスにおける血液中および血漿中 ERGO 濃度低下に少なくとも一部寄与していることが考えられる。クローン病患者における ERGO の血中濃度低下にも同様のメカニズムが関与するかは、今後、患者サンプルを用いた更なる研究が必要である。また、本研究において新たに見出した ERGO 代謝物は、代謝物と ERGO の比を調べることで、より炎症性疾患特異的なバイオマーカーになる可能性も考えられる。この ERGO 代謝物の単離・精製を行い、NMR や精密分子量の測定を実施することで、この物質を同定することが不可欠であり、炎症性腸疾患患者の血液中および血漿中代謝物濃度についても調べる必要がある。

審査結果の要旨

本研究は、炎症性腸疾患の際に血液中濃度が変化する生体内化合物に着目し、当該化合物が病態を把握するバイオマーカーとして妥当であるかの検証を目指したものである。食物由来アミノ酸の一種であるエルゴチオネイン(ERGO)は、ヒト体内では生合成されず、もっぱら食物から摂取され、血液中に μM レベルで存在する。以前の検討から、炎症性腸疾患(IBD)の一つであるクローン病患者において、健常人に比べ、血液中 ERGO 濃度が平均 1/5 程度にまで低下することが報告されている。本研究ではその原因を探る第一段階として、IBD モデルマウスを作製し、ERGO の血液中および臓器中濃度、体内 ERGO 濃度を支配する有機カチオン膜輸送体 OCTN1/SLC22A4 の発現変化を調べた。その結果、当該モデルマウスでも血液中および血漿中 ERGO 濃度が、患者血液同様低下した。一方で、ERGO の吸収部位である小腸組織中 ERGO 濃度や、ERGO の吸収に働く膜輸送体 OCTN1 の発現量は、むしろ増加した。そこで炎症部位の消化管間質に集積する炎症性マクロファージを含む粘膜固有層単核球細胞 (lamina propria mononuclear cells; LPMCs) を単離したところ、当該モデルマウスで ERGO 濃度が増加していた。LPMCs には OCTN1 の遺伝子産物が確認され、ERGO の取り込みも認められた。マクロファージにおける OCTN1 の機能的発現は、ヒト単核球細胞株 THP-1 でも確認された。以上の結果は、IBD における血液中 ERGO 濃度の低下の一部が、炎症部位に集積する炎症担当細胞による取り込み（初回通過効果）に起因することを示唆した。これらの成果は、IBD の病態を診断するマーカー化合物の探索研究として、創薬科学分野において有益な知見を与えるものと考えられることから、博士(創薬科学)に値すると判定された。