

論文題目 胆汁酸によって制御される大腸での炎症反応と  
胆汁酸受容体Gpbar1の機能解析

指導教員 清野宏教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 魚住明央

【背景と目的】

代表的な大腸疾患のひとつである潰瘍性大腸炎・クローン病といった炎症性腸疾患の患者は、アメリカやヨーロッパ諸国に多く見られる傾向にあるが、日本でも近年の食生活や生活様式の欧米化に伴って患者数は増加しており、患者数は約10万人にのぼる。炎症性腸疾患では消化管の粘膜に炎症が生じ、とくに潰瘍性大腸炎は大腸癌の危険因子である。潰瘍性大腸炎の病態には遺伝的要因を背景として、腸内細菌叢が関与していると考えられており、炎症性腸疾患の予防・治療には腸内細菌叢と宿主免疫の相互理解が不可欠である。

粘膜免疫システムの構築・制御で重要なのは、腸内細菌の lipopolysaccharide (LPS) や peptidoglycan (PGN) 菌体構成成分と、それによって誘導される宿主の免疫応答あることが明らかにされつつある。大腸粘膜免疫システムの構築および制御には、免疫担当細胞、上皮細胞、腸内細菌の三者のクロストークが存在する。つまりマクロファージを始めとする免疫担当細胞はパターン認識受容体である toll like receptor (TLR) などを介して菌体を認識し、貪食反応や炎症性サイトカインを産生する。炎症性サイトカインは、上皮細胞の細胞死抵抗性の獲得を補助し、粘膜組織を外界から隔てる強固な城壁として機能させるほか、上皮細胞からのディフェンシンの分泌を促進し、腸内細菌が過剰に宿主側に作用することを物理的・化学的に防いでいると考えられている。

腸内細菌の菌体成分が介在する粘膜免疫システムの構築・制御メカニズムは、近年の報告により徐々に明らかにされつつある。その一方で腸内細菌の代謝物による大腸粘膜免疫システムの制御メカニズムについては、その重要性は

示唆されているものの、大部分が未解明のままである。そこで本研究では、二次胆汁酸という腸内細菌にのみ由来する分子に着目し、腸内細菌と大腸粘膜免疫システム制御について調べることにした。

胆汁酸は肝臓で合成されるコラン酸骨格を持つステロイド誘導体化合物の総称であり、食餌中に含まれる脂質に対して界面活性剤として作用することで、その消化吸収を補助する。胆汁酸は腸内細菌による代謝の有無により一次胆汁酸と二次胆汁酸に分類される。肝臓で合成されたものは一次胆汁酸と呼ばれ、代表例は cholic acid (CA) や chenodeoxycholic acid (CDCA) である。小腸での再吸収を受けない胆汁酸は腸管内容物とともに結腸へと送られる。一次胆汁酸は共生する腸内細菌の代謝活動によって酸化され、その副産物として lithocholic acid (LCA) や deoxycholic acid (DCA) などの二次胆汁酸が産生される。

近年、この二次胆汁酸がアゴニストとして作用する胆汁酸受容体 G protein bile acid receptor-1 (Gpbar1) が同定された。Gpbar1 は膜7回貫通型の受容体であり、核内型が多い胆汁酸受容体の中ではユニークな性質を有する。すなわち胆汁酸と結合すると、セカンドメッセンジャーである cAMP の細胞内濃度を上昇させることで、そのシグナルを伝達する。腸管には二次胆汁酸を含む大量の胆汁酸が存在し、また細胞内シグナル伝達において類似の性質をもつプロスタグランジン受容体は、消化管粘膜の安定化に深く関わっている。これらの知見を総合的に考えると、胆汁酸-Gpbar1 経路が炎症を制御する重要な分子であると予想された。

本研究では、大腸での二次胆汁酸-Gpbar1 経路による炎症制御メカニズムの解明を目指した。まず大腸内の胆汁酸を除去することを目的として、コレステロール排泄剤である陰イオン交換樹脂 Colestimide を投与したマウスに対して、薬剤性の潰瘍性大腸炎を誘発し、その病態の解析・検討をおこなった。さらに大腸における Gpbar1 の発現部位を明らかにし、Gpbar1 欠損マウスを用いた解析を通過じて、大腸に発現する Gpbar1 の炎症制御機構を中心に解析し、その生理学的意義の解明を目指した。

## 【結果と考察】

大腸における Gpbar1 mRNA の発現を調べてみると、大腸上皮細胞で強く発現していることが認められた。一方で粘膜固有層の CD45<sup>+</sup>白血球にはほとんど発

現が認められなかった。抗 Gpbar1 抗体を用いて、大腸組織切片に免疫染色を施したところ、上皮細胞に強いシグナルを検出した。大腸における Gpbar1 の炎症制御機能を調べる目的で、Gpbar1 欠損 (Gpbar1 KO) マウスに対して 2.5% DSS を投与し大腸炎を誘導した。Gpbar1 KO マウスは野生型 (WT; wild type) マウスと比較して、大腸炎の症状 (体重減少、慢性炎症に伴う脾臓の腫大) が軽度であった。大腸炎の発症に伴い粘膜固有層に浸潤した好中球の数は、Gpbar1 KO マウスの方が WT マウスよりも少なかった。また ELISA 法に粘膜白血球からの炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  および IL-10) の産生量を比較したところ、WT と Gpbar1 KO マウスで細胞あたりの産生量に差は認められなかった。組織学的解析として、上皮細胞における BrdU; 5-bromo-2'-deoxyuridine の取り込みを調べたところ、WT では炎症状態下で BrdU 陽性細胞数が増加していたが、Gpbar1-KO マウスでは無処置と比較して BrdU 陽性上皮細胞数の増加は認められなかった。これらの結果から Gpbar1 が大腸での炎症を促進していることが示唆された。

コレステロール排泄薬である陰イオン交換樹脂 Colestimide を投与すると腸管内の胆汁酸と結合する。Colestimide 投与マウスに対してさらに DSS 大腸炎を誘導すると、Colestimide を投与しない対照群よりも重篤化した。Colestimide を投与したマウスでは、肝臓での胆汁酸生合成を制御する CYP7A1 の発現が増加しており、胆汁酸排泄効果が確認されたが、Colestimide 投与により Gpbar1 の機能が低下していると仮定すれば、Gpbar1 KO マウスで得られた結果に反する。Colestimide の実際のヒト臨床での適当な投与量は 12 g/日であり、これをマウスでの場合に換算すると 4 mg/日程度となる。本研究での Colestimide 投与量は推定で 40-50 mg/匹/日であり、過剰量摂取であったのかもしれない。あるいは胆汁酸とは無関係に Colestimide 自体が DSS 大腸炎を増悪化する要素を持ち合わせているのかもしれないが、その詳細は不明である。

本研究により胆汁酸受容体 Gpbar1 を欠損させたマウスは、DSS 大腸炎に抵抗性であること、また陰イオン交換樹脂 Colestimide が DSS 大腸炎を重篤化することが示された。本研究の成果によって Gpbar1 が大腸炎症を促進する分子であることが示唆されるとともに、炎症性腸疾患などの腸管疾患の新規治療・予防法の開発にあたり胆汁酸受容体 Gpbar1 が標的となりうることが示唆された。