

論文要旨

論文題目 クロウン病の腸管傷害およびその評価に関する研究

氏名 菊地 優子

クロウン病 (Crohn's disease; CD) は、炎症性腸疾患のひとつであり、1932年にクロウンが初めて報告した口腔から肛門に至る消化管のあらゆる部位に潰瘍ができる疾患である。主要症状には下痢、腹痛、体重減少、発熱、全身倦怠感、貧血などがあるが、病変部位がさまざまであるため、症状は多岐にわたる。発症患者数（特定疾患医療受給者証交付件数による）は1976年には128人であったのが、2013年には39799人と急増しており、若年で発症することが多いため、就学、就職、結婚、出産など、重要なライフイベントを病気とともに過ごさなければならず、症状による苦痛だけでなく、食事制限や再発へ恐怖など精神的にも負担が大きい。そのため、患者への疾病に関する十分な説明と周囲の支援が必要である。CDの発症には食事、腸内細菌、免疫異常、遺伝的要因、環境要因、腸管透過性の亢進などの関連が示唆されており、今日までに様々な報告がなされているが、原因は未だに不明である。そのため、根本的な治療法は確立されておらず、現在のところ寛解期への早期導入と寛解維持が治療の目標となっている。CDの治療法には手術などの外科的治療、薬物療法、栄養療法などがあり、わが国では成分栄養剤 (Elemental diets; ED) を用いた栄養療法が広く用いられている。EDは低分子のアミノ酸とデキストリンを主成分とし、脂質は必須脂肪酸を最小限しか含まず、食物繊維は含まれていない。そのため、栄養補給による栄養状態の改善だけでなく、消化管を安静に保つことができると考えられているが、CDにおけるEDの有効性について詳細なメカニズムは明らかになっていない。また、CDの診断では、臨床症状や病歴に加え、内視鏡検査、X線造影などによる全消化管検査を行い、本症に特徴的な病変を確認する。CDは寛解と再発を繰り返す疾患であり、診断時だけでなく診断後も治療効果や活動度のモニタリングを行う上で内視鏡検査やX線検査が必要となることが多いが、このような検査は患者にとっては侵襲が大きく、また、経済的、精神的にも負担となる。そのため、CDの診断やモニタリングに利用できる非侵襲的かつ簡便な指標の開発が求められている。そこで本論文では、Indomethacin (Indo) 投与による腸管傷害ラット (CDモデルラット) を用いて、腸管傷害時の免疫グロブリンや腸管透過性の変

化とそれらに対する ED の効果、そして、CD の評価指標としての $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質 (α -1 acid glycoprotein; AGP) の活用を検討した。

第 2 章では腸管傷害時の腸管透過性と免疫グロブリンの変化 (第 1 節) およびでは食物アレルギーの腸管透過性亢進とタイトジャンクションタンパク質の変化 (第 2 節) について検討した。また、飼料として市販飼料を摂取する群 (LC 群) と成分栄養剤を摂取する群 (ED 群) を設定し、それぞれの食餌と Indo 投与の影響を観察することにより、ED の効果についても検討した。第 1 節では、Indo 投与後の腸管傷害を小腸傷害スコアと phenolsulfonphthalein (PSP) の腸管透過性試験を経日的に観察した。腸管傷害は、Indo 投与 3 日目に最も重症となり、PSP 透過性は Indo 投与 2 日目に最も高値となった。一方、ED 群においては腸管傷害や透過性亢進はみられなかった。次に、CD モデルラットにおける腸間膜リンパ節 (MLN) および脾臓リンパ球における IgA、IgG 産生能とリンパ球サブセットの変化、血漿 IgA、IgG およびアルブミン (Alb) 濃度を検討したところ、IgA、IgG 産生能が増加し、MLN リンパ球における CD45RA⁺細胞の割合が増加した。血漿 IgG および Alb 濃度は Indo 投与後有意に減少した。一方、ED 群においてはこれらの変化はみられなかった。血漿免疫グロブリン、Alb の減少について詳細に検討するために、Indo 投与後の経日的変化と小腸管腔内における IgA、IgG、Alb の変化を検討した。その結果、Indo 投与後、血漿 IgG および Alb は低下し、IgG は 3 日目、Alb は 2 日目に最も低い値となった。一方、小腸管腔内において、Indo 投与 2、3 日目に IgG と Alb の増加がみられた。このことから、血漿中の IgG や Alb が小腸管腔内に漏出している可能性が示唆された。第 2 節では食物アレルギーの腸管透過性について研究を行った。第 1 節での研究において、Indo 投与時の PSP の腸管透過性亢進が示された。腸管透過性の亢進は食物アレルギーや腸内細菌の体内侵入を増加させ、このような抗原の体内移行の増大は、様々な疾病の発症や増悪に関与していると考えられる。この点を明らかにするために、CD モデルラットに乾燥卵白を経口投与し、投与後の門脈及び下大静脈血中のオボアルブミン (ovalbumin; OVA) 濃度から食物アレルギーの腸管透過性について評価した。その結果、CD モデルラットにおいて、乾燥卵白投与 60 分後の門脈血中 OVA 濃度は有意に高く、食物アレルギーの腸管透過性亢進が示され

た。次に、腸管透過性亢進の機序を解明するために、細胞間接着装置のひとつであり、細胞間透過性の調節因子であるタイトジャンクション (Tight junction; TJ) タンパク質の mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR 法により測定した。CD モデルラットにおいて TJ タンパク質である claudin-2 が有意に増加し、claudin-4 が有意に減少した。claudin-2 はリーキー型のタンパク質であり、発現量の増加は透過性の亢進につながる。一方 claudin-4 はバリア型のタンパク質であるため、発現量が減少すると透過性は亢進する。その他の TJ タンパク質の変化や、ウエスタンブロッティングを用いた解析など、今後詳細な検討は必要であるが、CD モデルラットにおいて、TJ タンパク質は細胞間の透過性を亢進する方向に発現量が増加していると考えられる。また、ED 群においては Indo を投与による OVA の腸管透過性亢進や TJ タンパク質の変化はみられなかったことから、ED は腸管透過性を正常に保つことにより CD に対する ED の有効性の一助となることが示唆された。

第 3 章では、CD の評価指標としての α 1 酸性糖タンパク質 (α -1 acid glycoprotein; AGP) の活用を検討した。CD モデルラットを用いた研究において、血漿タンパク質の SDS-PAGE を行ったところ、Indo 投与後に増加するタンパク質の存在を認めた。第 1 節では、Indo 投与時に増加したタンパク質を同定し、腸管傷害との関連を検討した。Indo 投与後、経日的 (0、1、2、3、7 日目) にサンプルを採取し、血漿タンパク質を SDS-PAGE により分離したところ、腸管傷害が重症となるに伴って、37~50 kDa のタンパク質に増加がみられた。これらについて、糖タンパク質を検出する PAS 染色を行ったところ、PAS 染色陽性であり、糖タンパク質であった。これらの特徴より推測し、ウエスタンブロッティングを行い、増加したタンパク質が AGP であることを明らかにした。また、AGP の主な産生器官である肝臓や炎症部位である小腸における AGP の変化を検討したところ、血中のみならず、肝臓や小腸においても AGP が増加しており、炎症による AGP の産生亢進が示唆された。そこで AGP の腸管傷害の指標としての活用を検討するために第 2 節では CD 患者の血漿 AGP 濃度と病態との関連を検討した。対象者は疾患のない、年齢と性別をマッチさせた健常者 8 名 (Normal 群) と CD 病患者 (入院または外来通院中) (CD 群) 20 名とした。はじめにウエスタンブロッティングにより AGP の同定を試みたが、個人差が大きく、CD 群と Normal 群との間に明確な差はみられなかった。そのため、ELISA 法により血中 AGP 濃度

を測定した。AGP 濃度は Normal 群に比べ CD 群で高くなったが、有意差はみられなかった。しかし、血漿 AGP 濃度と Crohn's Disease Activity Index (CDAI) および血液生化学検査値との相関をみると、C 反応性タンパク (CRP) との間に正の相関、ヘモグロビン (Hb)、Alb との間に負の相関がみられた。さらに、血漿 CRP と CDAI および Alb との関連を検討したところ、AGP と同様に Hb、Alb との間に負の相関がみられた。そのため、AGP は CRP と同様に CD 重症度を示す指標となる可能性が示唆された。健常者の CRP 濃度の中央値は 0.08 mg/dL、AGP の血中濃度は約 50 mg/dL であり、AGP の血中濃度は CRP に比べて高く、CRP が低値で同一濃度 (0.01 mg/dL の患者 5 名) であっても、AGP 濃度は 0.63~0.95 mg/dL (中央値 0.8 mg/dL) と変動したことから、CRP が低濃度の場合には AGP 濃度を用いた評価が有効であると考えられる。また、AGP は 5 個の N 結合型糖鎖を持つ酸性タンパク質であり、炎症時にはグリコシレーションが変化し、枝分かれの程度、糖鎖のフコシル化などに応じ、AGP の構造が変化することが報告されている。今後、患者の重症度や病変部位、炎症の程度、栄養状態などに対応した AGP 構造の変化を検討することにより、CD の病態を詳細に判定できるマーカーとしての活用が期待される。今後対象者を増やし、CDAI 別の解析や抗 TNF- α 薬や経腸栄養剤の使用を考慮した解析が必要である。

本論文では、CD の腸管傷害時には TJ のバリア機能が崩壊し、腸管透過性が亢進することで、食物アレルゲンや菌体成分などの体内侵入が増加し、炎症の発症・増悪を生じることを示唆した。また、ED は腸管透過性を正常に保つことにより CD に対する有効性を発揮すると推測される。さらに、AGP が CD の重症度や栄養状態を反映する指標として活用できる可能性を示した。本研究成果は CD の病態理解と栄養療法の有効性の解明、および CD の診療に大きく貢献すると考える。