

# オートファジーを標的とした炎症性腸疾患に対する 新規治療法の開発

萩野 崇之

# オートファジーを標的とした炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発

## Developing novel therapeutic approaches targeting autophagy for inflammatory bowel disease

荻野 崇之<sup>\*1</sup>

Key words : 炎症性腸疾患、オートファジー、マクロファージ、腸管粘膜固有層、潰瘍性大腸炎

### 要 旨

**目的** 本研究は、既存治療薬と作用機序が異なるオートファジー誘導を標的とし、炎症性腸疾患（IBD）に対する新規治療薬を開発することを目的とする。

**方法** オートファジー誘導物質を high-throughput assay system で同定し、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）投与により作製した腸炎モデルマウスにてその効果を検証する。また手術検体を用いて、ヒト腸管組織でも検証を行う。

**結果** 食品由来および低分子化合物ライブラリからオートファジー誘導物質をスクリーニングし、生薬である *Sanguisorba officinalis* L. (SO) を同定した。腸炎モデルマウスで SO の炎症抑制効果と臓器毒性がないことを確認した。潰瘍性大腸炎（UC）手術症例の切除検体を用いた実験においても、SO によるマクロファージを介したオートファジー誘導と炎症抑制効果を認めた。

**結論** SO によるオートファジー誘導を介した腸炎制御が明らかとなった。今後、IBD に対する治療や予防への応用が期待される。

### はじめに

炎症性腸疾患（IBD）は潰瘍性大腸炎（UC）とクローン病に代表され、消化管に強い炎症像を呈し、再燃・寛解を繰り返す原因不明のびまん性慢性炎症性疾患である<sup>1)</sup>。本邦の患者数は増加の一途を辿っており、若年発症が多いため、病勢コントロールの可否が就学、就労、出産、子育てなど社会的な問題に深く関わる<sup>2)</sup>。IBD の病因として食事形態、遺伝的因子、免疫学的因子など複合的な因子が挙げられているが、原因は未だ明らかとなっていない。2008 年に大規模ゲノムワイド関連解析によりオートファジー関連遺伝子である *Atg16L1* がクローン病の感受性遺伝子として同定され、IBD 発症とオートファジーとの関連に注目が集まっている<sup>3)</sup>。

オートファジーとは、細胞がオートファゴソーム、オートリソソームを形成して自己成分を分解する機構であり、劣化タンパクや傷害された細胞内器官を除くことにより細胞恒常性を保っている。オートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスは致死性を示すことから、IBD をはじめとする自己免疫疾患ではオートファジーが全く機能しないのではなく、機能低下を来している状態であると考えられる。マウスレベルでは、*Atg5* 遺伝子や *Atg16* 遺伝子の異常がパネート細胞を含む腸管上皮細胞やリンパ球の機能低下を引き起こすことが報告されているが<sup>4,5)</sup>、ヒト腸管を対象としたオートファジーに関して詳細に解析した報告はほとんどなく、臨床応用には未だ大きな課題が残っている。

再発を繰り返す IBD 症例に対し何度も手術が必要

<sup>\*1</sup> OGINO TAKAYUKI 大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科

となるということが少なからず生じている<sup>6)</sup>。薬物療法の発展により同一患者の頻回手術は減少傾向にあるが、2024年現在IBDに対する根治可能な治療法は存在していない。また薬物療法の長期投与を要する症例が増え、医療経済的にも大きな課題となっている。本研究では、既存の治療薬と作用機序が異なっているオートファジー誘導を標的としたIBDに対する新規治療薬を開発することを目的とした。

## 対象と方法

### マウス

C57BL/6J系統のマウスは、クレア・ジャパン株式会社（東京）から入手した。実験には7週齢の雌マウスを使用した。マウスに関する実験は、大阪大学医学部実験動物施設の動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：#27-099-000）。すべての実験手法は、大阪大学医学部実験動物施設の動物実験委員会のガイドラインおよび規制に従って実施した。

### high-throughput assay system を用いた

#### オートファジー誘導物質の同定

$1 \times 10^3$  GFP-LC3 発現マウス胚線維芽細胞を96ウェルプレートの各ウェルで16時間培養し、その後、天然化合物ライブラリに含まれる各物質で処理した。5時間後、Incell Analyzer 1000 (GE Healthcare UK Ltd., England) を用いて GFP-LC3 点状構造の面積を測定した。

### ヒト腸管組織サンプル

コントロールの腸管は、大腸癌 (CRC) 非癌部の肉眼的および顕微鏡的に健常な領域から採取された。また、臨床所見および内視鏡所見に基づいて診断された UC 患者から、外科的に切除された標本から炎症部および非炎症部腸管が採取され、炎症部の病理組織学的検査により中等度から重度の炎症が確認された UC サンプルを、評価に供した。

細胞単離は既報告プロトコルに沿って施行した<sup>7)</sup>。本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けて実施された（承認番号：#10261）。すべての患者から標本使用に関するインフォームド・コンセントを得た。

### フローサイトメトリー

フローサイトメトリー解析は、FACS CantoII フローサイトメーター (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて実施した。LPC は FACS AriaII システム (BD Biosciences) を使用して精製し、データは FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR) で解析した。

### ウェスタンブロットティング

細胞溶解物および組織サンプルは、プロテアーゼ阻害剤 (Thermo) およびホスファターゼ阻害剤 (Thermo) を含む RIPA バッファー (Thermo) に溶解した。免疫ブロットは、抗マウス LC3B 抗体 (希釈 1:1000)、抗マウス  $\beta$  アクチン抗体 (希釈 1:1000, Sigma-Aldrich Co. LLC, SLE, USA)、および抗マウス GAPDH 抗体 (希釈 1:2000, Abcam) を使用して行った。

### 定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) 解析

Total RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen K.K., California, USA) を使用して腸管粘膜固有層細胞から抽出した。RNA は、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo) を用いて、製造業者プロトコルに従い、一次鎖相補 DNA に逆転写した。qRT-PCR は、Thunderbird Probe qPCR Mix (東洋紡株式会社、大阪、日本) を使用して ABI Prism 7900HT シーケンス検出システム (Applied Biosystems (Thermo) で実行した。増幅条件は、95 °C で 10 分間、次いで 95 °C で 15 秒、60 °C で 60 秒のサイクルを 40 回繰り返した。すべての値はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする Gapdh の発現に対して正規化し、

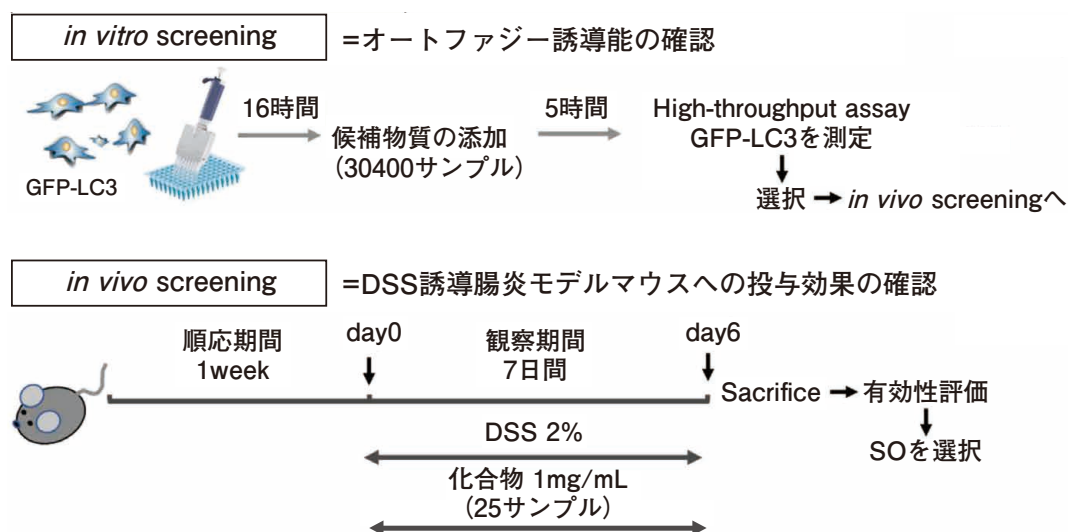


図1 オートファジー誘導化合物のスクリーニング

GFP: 緑色蛍光タンパク質、LC3: 微小管関連タンパク質1軽鎖3、DSS: 2% デキストラン硫酸ナトリウム

Gapdhに対する相対的な発現の倍数差を示した。すべてのリアルタイム qRT-PCR 反応は3回ずつ実施した。

### 統計解析

すべての統計解析は JMP Pro 13 (SAS Institute Inc., North Carolina, USA) を使用して行った。統計的有意性の評価には、複数比較のための Dunnett's test および2群間の比較には unpaired, two-tailed Student's t test を使用した。 $p$  値 < 0.05 は有意差ありと見なした。

## 結 果

### オートファジーを誘導する化合物の同定

食品由来化合物ライブラリ 5400 種類、および低分子化合物ライブラリ 25000 種類を対象とし、ヒト腸管上皮由来細胞株 (Caco2) およびマウス胎児由来線維芽細胞株 (MEF) に添加し、リソソームの融合を指標にオートファゴソーム膜の集積を検討し、オートファジー誘導化合物のスクリーニングを行った (図1)。活性の強い順に低分子由来

から14種類、食品由来から11種類を選択した。選択した化合物25種を、2% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与により腸炎を誘導したマウスに投与し、それらの有効性について検討した。体重減少の抑制効果、腸管長の短縮抑制効果を認め、かつ有効成分に関する先行研究のある *Sanguisorba officinalis* L.(SO) を選択し、以降の実験を実施した。SO に関しては、これまでに抗腫瘍効果、出血抑制、抗炎症、抗アレルギー能、抗菌作用などに関する報告があるが、腸炎に関連する報告は認めなかった。

### SO による腸炎制御効果の検証と毒性評価

DSS 投与により作製した腸炎モデルマウスを用いて、SO による炎症抑制効果を検討した。DSS と SO を投与した SO 群と DSS のみのコントロール群、および各々の DSS を投与していない群を作成し4群に分けて、投与後7日目の体重、腸管長、病理組織学的評価を行い、腸炎制御効果について検討した。腸管炎症状態において、SO 群はコントロール群と比較して、有意に体重減少が抑制された (図2A)。腸管長においても、炎症により短縮を認めたが、SO 群がコントロール群と比較して有意に

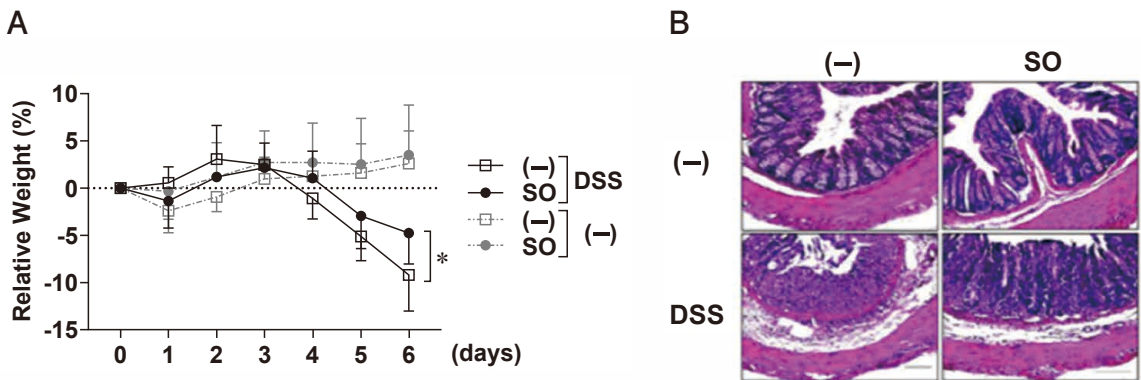


図2 オートファジー誘導化合物 SO による腸炎制御効果

薬剤性腸炎誘導マウスにおいて、SO 投与により体重減少率、腸管長短縮、病理組織学的所見における炎症像がコントロール群と比較して有意に抑制された。

DSS: 2% デキストラン硫酸ナトリウム

SO or vehicle with (n = 14) or without (n = 7), means  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , unpaired, two-tailed Student's t test.

長く、短縮を軽減された。炎症状態の腸管においては炎症細胞浸潤と腺管構造の破綻を認めるが、SO 投与により、炎症細胞浸潤はあるものの、腺管構造の維持と炎症細胞浸潤が減少していることが確認された (図 2B)。また、SO 群、コントロール群で腸管上皮アポトーシスを TUNEL assay を用いて検討した。コントロール群では腸炎誘導によりアポトーシスが亢進しているのに対し、SO 群では、DSS 非投与の炎症がない状態と同等にアポトーシス

が抑制されていた (図 3)。次に、腸管以外の各臓器における SO 投与の影響について検討した。薬剤性腸炎が誘導された状態において、SO 群とコントロール群間で、心臓、腎臓、肝臓、脾臓の HE 染色による病理組織学的所見に異常は認めなかった (図 4A)。また肝逸脱酵素であるアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) も併せて検討したが、両群間に差は認めず、SO 投与による他臓器毒性は観察されなかった (図 4B)。

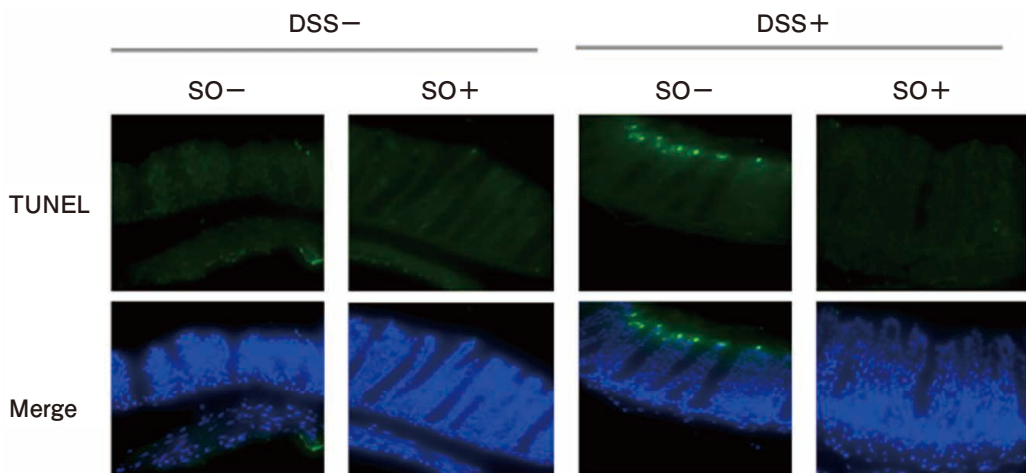


図3 TUNEL assay によるアポトーシス評価

DSS: 2% デキストラン硫酸ナトリウム、緑: TUNEL、青: DAPI



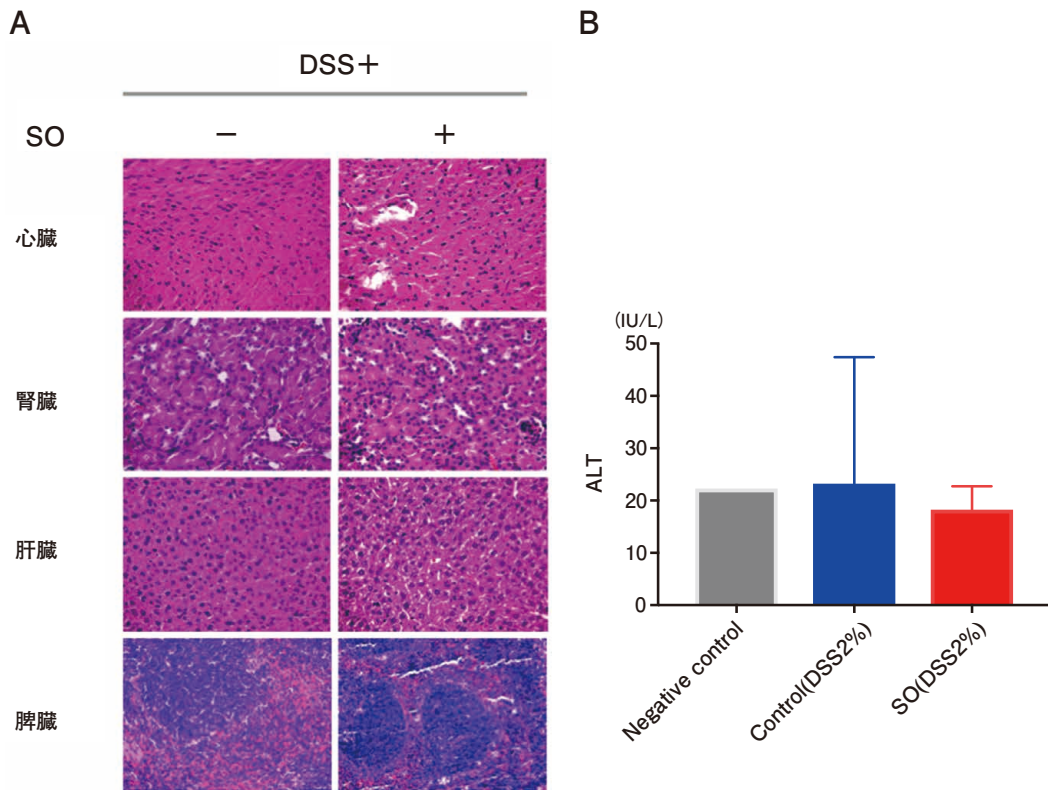


図4 炎症時 SO 投与による他臓器毒性に関する検討

DSS: 2% デキストラン硫酸ナトリウム、n=5 each、means  $\pm$  SD

#### ヒト腸管における SO 投与による炎症制御効果の検討

UC 手術検体から炎症部腸管および非炎症部腸管、コントロールとして CRC 手術検体から非癌部腸管の粘膜を剥離して細断し、酵素処理して細胞を単離、遠心して腸管粘膜固有層細胞を回収し、フローサイトメトリーを行い、死細胞を除去して CD45+ HLADR+ CD14+ の細胞をマクロファージとして単離した (図 5)。CRC 非癌部と比較して、UC 炎症部ではマクロファージの比率が高く、単位重量当たりのマクロファージ数も多かった。次に CYTO-ID を使用し、オートファジー誘導の確認を施行した。単離した CD45+ HLADR+ CD14+ マクロファージを SO 添加群と非添加群に分け、スライドチャンバーに播き、37 °C で培養し、培養開始 24 時間後に CYTO-ID で染色したところ、UC 炎症部では、CRC 非癌部と比較して、緑染細胞が

減少していたが、SO 投与した群では増加していた。UC 炎症部由来マクロファージでは SO 投与によってオートファゴソームの形成が増加し、オートファジーが誘導されていると考えられた。一方で、非炎症部や大腸癌非癌部のマクロファージでは SO 投与によるあきらかな変化は認めなかった (図 6A)。さらにウェスタンブロッティングにて、LC3-I/II タンパクの発現変化を評価したところ、UC 炎症部のマクロファージでは、CRC 非癌部と比較して、LC3-II の発現が低下し LC3-I 発現が上昇しており、炎症部でのオートファジーの低下が示唆された。SO 投与して培養した UC 炎症部由来マクロファージでは、LC3-I に対する LC3-II の割合が上昇しており、低下したオートファジーが一部改善されていることが示唆された。一方で、非炎症部や CRC 非癌部では SO 投与による変化

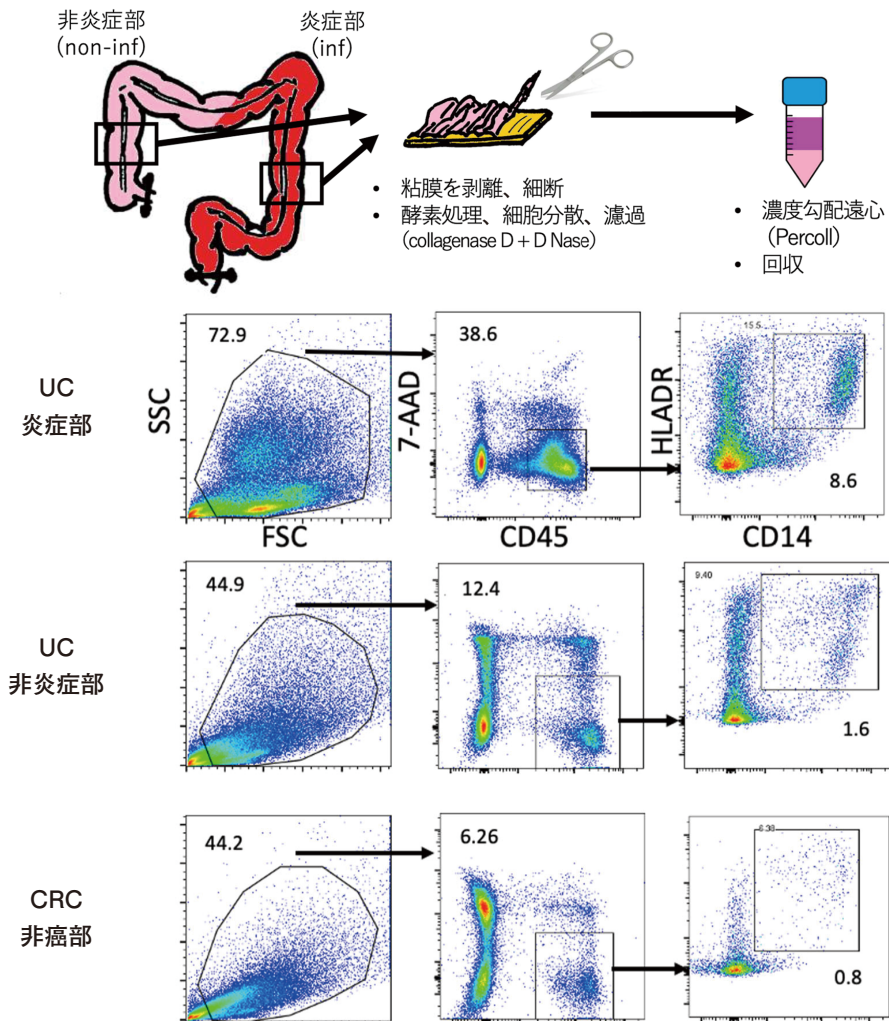


図5 フローサイトメトリーを用いたヒトCRC手術検体から腸管マクロファージ単離

SSC: 前方散乱光、FSC: 側方散乱光、7-AAD: 死細胞除去、CD45: 白血球共通抗原、HLADR: HLA クラス II 抗原、CD14: 細菌由来成分の認識受容体

は認めなかった (図 6B)。ヒト腸管マクロファージはいくつかのサブセットがあり、炎症の発生や持続に関与しているマクロファージや抗炎症作用や組織修復に関与しているマクロファージなどが報告されている<sup>7-9)</sup>。UC 炎症部、非炎症部、CRC 非癌部の CD45+ HLADR+ CD14+ マクロファージを CD163 でさらに細分化すると、炎症部で CD163<sup>low</sup> 分画が増加していた (図 7)。SO の炎症緩和能とマクロファージ分画が関連していると考え、今後

CD163<sup>low</sup> および CD163<sup>high</sup> に対する SO 投与の効果を評価していく予定としている。

#### SO によるクローン病炎症制御に関する臨床研究

ヒト腸管の *in vitro* 実験にて、オートファジー誘導効果が得られた SO の摂取により病勢コントロールが可能であるか臨床研究の計画および実施を行っている。本研究のマウス実験では SO 投与による他臓器毒性は認めなかった。SO は一部の地域で

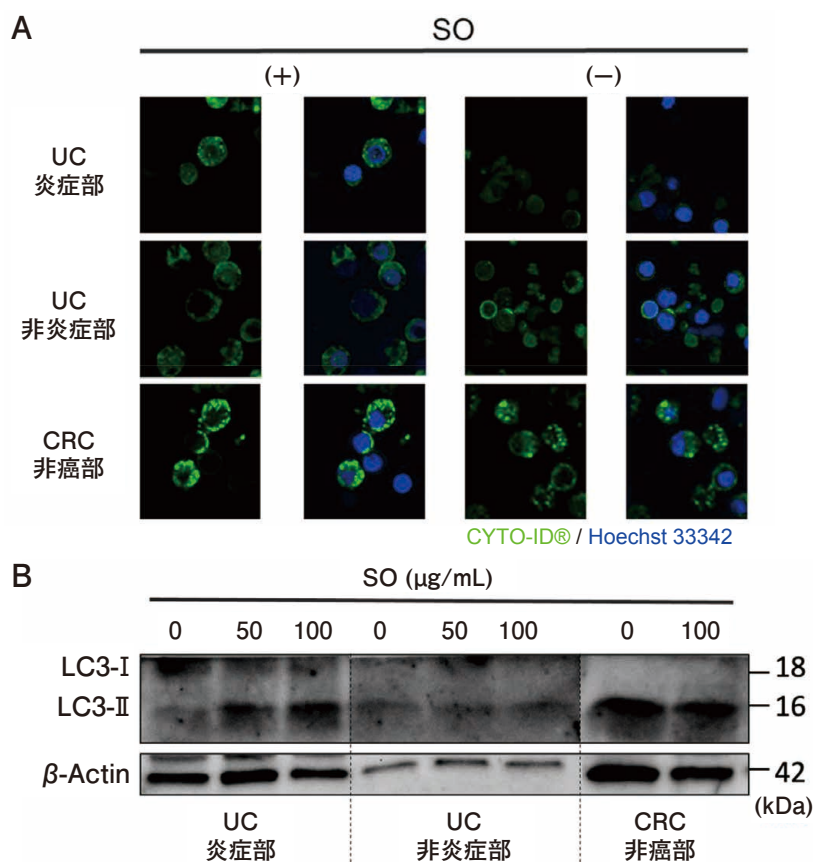


図6 蛍光免疫染色およびウェスタンブロッティングによるオートファジー誘導評価

LC3-I: 微小管関連タンパク質1 軽鎖3の細胞質型 (前駆体)、

LC3-II: 微小管関連タンパク質1 軽鎖3の膜結合型 (オートファゴソーム膜に結合)

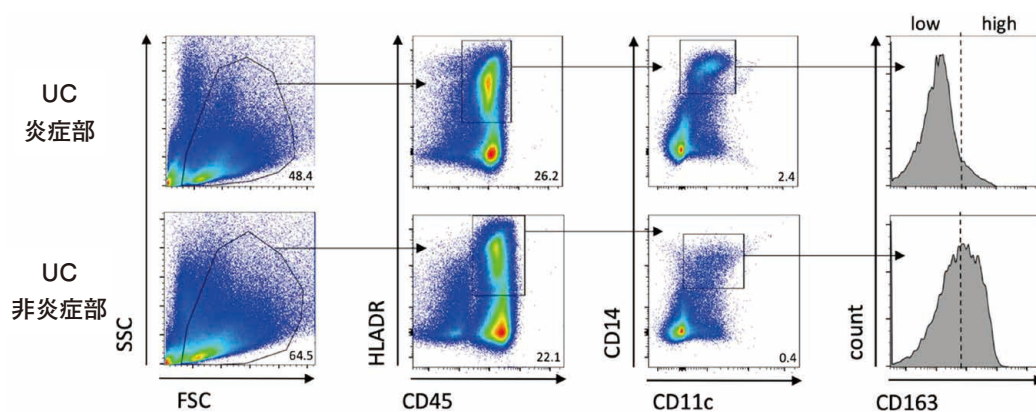


図7 UC 腸管におけるマクロファージ分画評価

SSC: 前方散乱光、FSC: 側方散乱光、CD45: 白血球共通抗原、HLADR: HLA クラス II 抗原、CD14: 細菌由来成分の認識受容体、CD11c: インテグリンファミリーに属する膜貫通糖タンパク質、CD163: ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体に対する高親和性受容体



経口摂取の慣習があり、人体への投与は可能であり、これまで有害事象の報告はない。現在、切除腸管を用いた *in vitro* 実験と並行して、有効成分の分析、人体投与時の安全性確認のため、臨床研究の準備を進めている段階である。

## 考 察

本研究では、オートファジーを誘導する化合物を同定し、その効果を腸炎モデルマウスおよびヒト腸管において検討した結果、SO が有望な候補であることが明らかとなった。DSS 誘導性腸炎モデルマウスでは、SO 投与により体重減少の抑制や腸管長の短縮抑制が確認された。病理組織学的評価においても炎症細胞浸潤が減少し、腸管構造が保持されていた。これらの結果は、SO が腸炎において重要な炎症抑制作用を持つことを示しており、その作用メカニズムとしてオートファジーの誘導が関与している可能性が示唆された。モデルマウスの研究から、マクロファージにおける Atg7 依存的オートファジーは、組織修復や再生促進に重要な役割を果たすことが先行研究から示されている。IBD 患者では腸管 CD14+ マクロファージが腸内細菌に反応して IL-6 や IL-23 を産生しやすいという報告があることから、新規治療薬開発の観点から、SO がヒトマクロファージにおいてこれらのサイトカイン産生を抑制するかどうかを検証することとした。また、ヒト腸管マクロファージにおいても、SO は

オートファジーを誘導し、炎症部でのオートファゴソーム形成を促進することが示された。さらに、SO 投与による他臓器への毒性はマウス実験で確認されず、安全性が示唆された。これらの結果を踏まえ、SO の腸炎制御効果をヒトにおいて検証するため、臨床研究を準備中である。

本研究で標的とした「オートファジー誘導」は、既存の薬剤とは異なる作用機序を有し、IBD に対する新規治療法として位置付けられる。オートファジーによる腸炎制御のメカニズムを解明することは、IBD の根治に繋がる可能性があり、その学術的意義は極めて高い。また、今後の臨床研究の進展が望まれる。ヒトにおける有効性と安全性が確認されれば、既存の薬剤で効果が乏しい症例の治療に加え、発症予防の観点からもアプローチできる新たな治療薬として応用できる可能性がある。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人臨床薬理研究振興財団に心より感謝申し上げます。また、本研究にご協力いただきました患者様に御礼申し上げます。

## 利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Ogino T, Mizushima T, Matsuda C, Mori M, Doki Y. Essential updates 2018/2019: Colorectal (benign): Recent updates (2018-2019) in the surgical treatment of benign colorectal diseases. *Ann Gastroenterol Surg* 2019; **4(1)**: 30-8.
- 2) Proposed guidelines for the management of patients with Crohn's disease. Annual reports of Research Group of Intractable Inflammatory Bowel Disease subsidized by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. 2008. (in Japanese).
- 3) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; **39(2)**: 207-11.
- 4) Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 2009; **461(7264)**: 654-8.
- 5) Kang YH, Cho M, Kim J, Kwon M, Peak J, Kang SW, et al. Impaired macrophage autophagy induces systemic insulin resistance in obesity. *Oncotarget* 2016; **7(24)**: 35577-91.
- 6) Ogino T, Sekido Y, Hata T, Miyoshi N, Takahashi H, Uemura M, et al. The safety and feasibility of laparoscopic redo surgery for recurrent crohn's disease: A comparative clinical study of over 100 consecutive patients. *Ann Gastroenterol Surg* 2021; **6(3)**: 405-11.
- 7) Ogino T, Nishimura J, Barman S, Kayama H, Uematsu S, Okuzaki D, et al. Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2013; **145(6)**: 1380-91.
- 8) Barman S, Kayama H, Okuzaki D, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, et al. Identification of a human intestinal myeloid cell subset that regulates gut homeostasis. *Int Immunol* 2016; **28(11)**: 533-45.
- 9) Matsuno H, Kayama H, Nishimura J, Sekido Y, Osawa H, Barman S, et al. CD103+ dendritic cell function is altered in the colons of patients with ulcerative colitis. *Inflammation Bowel Dis* 2017; **23(9)**: 1524-34.