



A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis

古松, 恵介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5313

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005313>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	古松 恵介
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5313 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis(腸炎改善におけるアリルハイドロカーボンレセプターの役割)

審 査 委 員

主 査	教 授	的崎 尚
	教 授	平井 みどり
	教 授	平田 健一

(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis

腸炎改善におけるアリルハイドロカーボンレセプターの役割

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
消化器内科学
(指導教員：東 健教授)

古松 恵介

【背景・目的】

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease : IBD) はクローン病と潰瘍性大腸炎に代表される、主として消化管に炎症をおこす慢性疾患の総称であるが、その詳しい機序、病因は不明なままである。しかし近年、不完全な免疫応答やバリア機能の不完全化が原因であるとの報告や、腸管上皮細胞における粘膜免疫反応が大腸炎の病因に関与しているという等の報告がある。

アリルハイドロカーボンレセプター (Aryl hydrocarbon receptor : AhR) は、ダイオキシンのレセプターとして発見された、bHLH/Per-Arnt-Sim の転写因子のひとつで、様々な生物学的機能において重要な役割を担っていることが報告されている。AhR は正常の状態では細胞質に存在しているが、リガンドが結合すると核内に移動し、目標遺伝子 (CYP1A1 等) を起動させる。AhR に強力な環境毒性物質 (3-メチルコラントレンやダイオキシン) がリガンドとして作用すると、免疫抑制、胸腺萎縮、内分泌混乱、腫瘍促進と細胞分化を含む様々な毒性作用をもたらすことが知られている。そして AhR ノックアウト (AhR KO) マウスはこれらのリガンドによる毒物的な影響に抵抗することがわかっている。しかしその一方で、AhR KO マウスは、免疫系の低下や、心肥大、皮膚障害、脈管欠陥など様々な臓器疾患を患うことが報告されており、AhR は生体内でホメオスタシスの調節をしていると考えられている。さらにリガンドによる AhR の活性化によって、マウスの腸での発癌を抑制したという報告もあり、AhR が生体内で腸管機能と関係していることが示唆された。そこで今回、我々は AhR が腸管免疫と機能的に関係しているかどうかについて調査した。

【方法・結果】

まずデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate : DSS) による腸炎モデルを

用いて、AhRKO マウスと C57BL/6J 野生型 (WT) マウスで炎症の程度に違いがあるかについて比較検討した。DSS は 1 %、2 %、3 %を用いた。結果は、1 %DSS 腸炎モデルでは明らかな差は認められなかったが、2 %、3 %において、AhRKO マウスは WT マウスと比較し、体重減少がひどく、また組織学的に腸炎の悪化が認められた。また大腸粘膜上皮における炎症性サイトカインの発現量が上昇しており、AhRKO マウスは WT マウスと比較し腸炎の悪化が示唆された。また 2 %、3 %DSS 腸炎モデルにおいて、大腸上皮の AhR と CYP1A1 の mRNA 発現量が正常の状態より上昇していることが認められ、AhR が腸炎に関与していることが考えられた。

そこで DSS 腸炎と AhR との関係をさらに調べるため、AhR の非毒性アゴニストであるベータナフトフラボン (β -naphthoflavone: β NF) を DSS 投与と同時に投与し、AhR を活性化させた状態で、WT マウスにおける腸炎がどう変化するかを調べた。DSS は 3.5 %を用いた。まず DSS 投与の前日から β NF を投与した上で、DSS を投与した。結果、 β NF 投与群は非投与群と比較し、腸管長や体重減少では有意な差は認められなかったが、組織学的には炎症の程度が β NF 投与群は有意に軽減していた。また β NF 投与群は、大腸粘膜上皮における炎症性サイトカインの発現量も抑制されており、 β NF は腸炎の予防効果がある可能性が考えられた。またさらに β NF の治療効果を検討するために、DSS 腸炎を起こし体重減少が認められた 3 日目から β NF を投与し、その後の腸炎の程度を調べた。結果 β NF 投与群は、非投与群と比較し、体重減少、組織学炎症の程度が有意に軽減した。大腸粘膜上皮における炎症性サイトカインの発現量も β NF 投与群は抑制されており、 β NF が治療にも効果がある可能性が考えられた。

またヒトの大腸癌細胞 (SW480 細胞) を用い、in vitro での検討を行った。まず SW480 細胞に LPS (lipopolysaccharide) を投与し炎症反応刺激を誘導した。その結果、炎症性サイト

カインと共に AhR、CYP1A1 も LPS 刺激により発現量は上昇した。また LPS 投与の 2 時間前から β NF を投与し、AhR を活性化させてから LPS 刺激を行うと、LPS 誘導性の炎症刺激反応が弱まった。次に SW480 細胞を siRNA により AhR を downregulation させ、同様に LPS 誘導性の炎症刺激反応が変化するかにつき検討した。結果、AhR を downregulation させることにより、LPS による炎症刺激反応が上昇した。よって大腸癌細胞にでもマウスの実験同様に、AhR の発現量を低下させることによって炎症反応は増悪し、一方 AhR を活性化させることによって炎症反応が抑制するという結果が得られた。

【考察】

今回我々は、AhR の活性化によって大腸における炎症刺激反応を抑制できることを明らかにした。 β NF は DSS 誘導性の腸炎を軽減させ、腸炎の予防だけでなく治療における効果も示唆された。近年リガンド依存性の AhR 起動が、肝細胞で抗炎症作用を誘導するという報告がある。AhR 作用薬により、NF κ B を介して IL6 を抑制することで抗炎症性反応を調節しており、AhR が NF κ B を介し免疫反応で重要な役割を演じていることが示唆されている。また AhR の活性化は、Th17 細胞と Treg 細胞とも密接に関係しているという報告もある。一方大腸の上皮細胞が粘膜免疫反応で重要な役割をしていることも知られおり、TGF の上昇によって上皮のアポトーシスを抑え、またケモカインが IBD の患者における粘膜ホメオスタシスの重要な役割を演じていることも証明されている。このように、大腸の上皮細胞における作用が、IBD の病因に関与していると考えられている。今回の研究においても、ヒトの大腸癌 SW480 細胞の AhR を downregulation させることによって LPS 誘導性の炎症刺激反応は悪化した。さらに、AhR の活性化によって、LPS 誘導性の炎症刺激反応は減少した。これらの結果から、大腸の上皮細胞に

おける AhR の発現量の活性化が大腸炎改善に関与していることが考えられた。

今回我々は、腸管上皮において AhR の活性化と腸管免疫との関連性を示した。このことより、AhR の活性化が IBD の治療に役立つ可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2183 号	氏 名	古松 恵介
論文題目 Title of Dissertation	A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis 腸炎改善におけるアリルハイドロカーボンレセプターの役割		
審査委員 Examiner	主 査 田崎 尚 Chief Examiner 副 査 平田 健一 Vice-examiner 副 査 平井 みどり Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景・目的】

炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease：IBD）はクローン病と潰瘍性大腸炎に代表される、主として消化管に炎症をおこす慢性疾患の総称であるが、その詳しい機序、病因は不明なままである。

アリルハイドロカーボンレセプター（Aryl hydrocarbon receptor：AhR）は、ダイオキシンのレセプターとして発見された、bHLH/Per-Arnt-Sim の転写因子のひとつで、様々な生物学的機能において重要な役割を担っている。AhR ノックアウト（AhR KO）マウスは、免疫系の低下や、心肥大、皮膚障害、脈管欠陥など様々な臓器疾患を患うことが報告されており、AhR は生体内でホメオスタシスの調節をしていると考えられている。そこで今回、AhR が腸管免疫と機能的に関係しているかどうかについて検討した。

【方法・結果】

デキストラン硫酸ナトリウム（dextran sodium sulfate：DSS）による腸炎モデルを用いて、AhR KO マウスと C57BL/6J 野生型（WT）マウスで炎症の程度に違いがあるかについて比較検討した。DSS 2%および3%投与下において、AhR KO マウスはWT マウスと比較して体重減少の程度が増強し、組織学的に大腸での炎症所見の悪化が認められた。また AhR KO マウスでは WT マウスと比較して、大腸粘膜上皮における炎症性サイトカインの発現量が上昇しており、腸炎の程度が増強していることが示唆された。さらに、WT マウスにおいて、DSS 投与により大腸上皮の AhR と CYP1A1 の mRNA 発現量の増加が認められ、AhR が腸炎の発症進展に関与していることが示唆された。

そこで DSS 腸炎と AhR との関係をさらに調べるため、AhR の非毒性アゴニストであるベータナフトフラボン（ β -naphthoflavone： β NF）を DSS 投与と同時に投与し、AhR を活性化させた状態で、WT マウスにおける腸炎への影響を検討した。DSS 投与の前日から β NF を投与した上で 3.5%DSS 投与を行ったところ、腸管長や体重減少では β NF 投与群は非投与群で有意な差は認められなかったが、組織学的には炎症の程度が β NF 投与群で有意に軽減していた。さらに、 β NF 投与群では、大腸粘膜上皮における炎症性サイトカインの発現量も抑制されており、 β NF は腸炎の予防効果がある可能性が示唆された。また、 β NF の治療効果を検討するために、DSS 腸炎を起こし体重減少が認められた 3 日目から β NF を投与し、腸炎からの回復への影響について検討したところ、 β NF 投与群は、非投与群と比較し、体重減少、組織学炎症の程度が有意に軽減していた。大腸粘膜上皮における炎症性サイトカインの発現量も β NF 投与群では抑制されており、 β NF が治療にも効果がある可能性が

示唆された。さらに、ヒトの大腸癌細胞（SW480 細胞）を用い、AhR の腸上皮細胞での役割について in vitro で検討を行った。SW480 細胞では、LPS (lipopolysaccharide) 刺激により炎症性サイトカインと共に AhR、CYP1A1 の発現量が上昇した。また β NF の前処理により AhR を活性化させてから LPS 刺激を行うと、LPS 誘導性の炎症刺激反応が減弱した。一方、siRNA により内在性の AhR をノックダウンさせると、LPS による炎症刺激反応が増強した。

【考察ならびに結論】

本研究において、 β NF 投与により AhR を活性化することにより、大腸における炎症刺激反応を抑制し、治療に有効である可能性が示唆された。

大腸の上皮細胞が粘膜免疫反応で重要な役割を担っていることが知られおり、その異常が IBD の病因に関与していると考えられている。本研究において、ヒトの大腸癌 SW480 細胞の AhR の活性化や発現量の変化により、LPS 誘導性の炎症刺激反応が変化したことから、大腸上皮細胞における AhR が、腸管免疫の恒常性の維持に関与していることが示唆された。

本研究は、腸管上皮における AhR の活性化と腸管免疫との関連性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

The candidate, having completed studies on “A role of aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis”, with a specialty in gastroenterology, and having advanced the field of knowledge in the area of mucosal immunology in the intestine, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D. (Medicine).