



Indigo Naturalis Ameliorates Oxazolone-induced Dermatitis but Aggravates Colitis by Changing the Composition of Gut Microflora

Adachi, Soichiro

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6979号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006979>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Indigo Naturalis Ameliorates Oxazolone-induced Dermatitis but Aggravates Colitis by Changing the Composition of Gut Microflora

青黛はオキサゾロン皮膚炎を改善させる一方で、腸内細菌の構成を変化させることにより
オキサゾロン腸炎を増悪させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科学講座 消化器内科学
(指導教員: 東健教授)

足立聰一郎

青黛は植物由来の青い粉末状の漢方薬であり、古くから中国にて抗炎症薬として幅広く用いられてきた。ひとつに乾薬を始めとする皮膚疾患によく用いられており、その効果を示す臨床研究が多く発表されている。また慣習的に炎症性腸疾患、とくに潰瘍性大腸炎にも用いられており、日本では青黛の潰瘍性大腸炎に対する効果を示した臨床研究がいくつか発表されている。しかし、その基礎的機構については未だ解明されていない。我々はオキサゾロン(OXA)による薬剤誘発性の皮膚炎および腸炎モデルマウスも用いて、青黛の炎症性疾患に対する効果を評価した。OXAはハプテン由来のアレルギー性皮膚炎およびTh2関連腸炎を誘発する薬剤であり、これは青黛の治療対象となる皮膚疾患や潰瘍性大腸炎により近いと思われる。

始めに C57BL/6J マウスの腹部に 2%OXA を塗布することで感作させ、数日後にマウスの耳介に 1%OXA を塗布することでアレルギー性皮膚炎を誘発し、同時に青黛を連日塗布することで、炎症所見に対する影響を評価した。すると青黛を塗布した群において耳介の肥厚が有意に抑制され、病理所見においては皮膚組織内への炎症性細胞浸潤が抑制された。皮膚組織内における炎症性サイトカインの発現をリアルタイム PCR 法にて評価したところ、青黛投与群では Th2 関連サイトカインである IL-4 が有意に抑制されていた。また病理所見においては OXA 皮膚炎にみられる炎症細胞浸潤には好酸球の割合が多く、同じく PCR 法にて好酸球のマーカーである Siglec-F を測定したところ、青黛投与にて Siglec-F の発現が有意に抑制されていることを示した。これらの結果より、青黛にはアレルギー性皮膚炎を抑える効果があり、その機序が Th2 関連サイトカインの抑制と好酸球遊走の抑制であることが示唆されている。

次に BALB/c マウスに対して同様に 2%OXA にて感作した後に、0.5%OXA100μl を注腸投与することで OXA 腸炎を誘発し、同時に 5%青黛入り粉末飼料を連日経口投与した上で、体重測定、マウス内視鏡、病理、リアルタイム PCR にて腸炎の評価を行った。驚いたことに、青黛投与群においてマウスの体重は有意な減少を認めた。マウス内視鏡検査でも青黛投与群においてびらんや潰瘍などの重度の粘膜障害を認め、病理所見においても青黛投与群にて腸管上皮の消失、腸管上皮の浮腫、炎症性細胞の浸潤などの所見の増悪を認めた。青黛を別の 2 社より購入して同様の実験を行ったが、これらの結果は変わらなかった。しかし、腸管上皮内の炎症性サイトカインをリアルタイム PCR にて評価したところ、OXA 腸炎において最も重要な IL-13 が、青黛投与によって逆に低下していた。対照的に、各種炎症性サイトカインの中で TNF- α だけは上昇していた。同様の実験を DSS 腸炎モデルを用いて行ったが、青黛投与による腸炎増悪は認めなかった。

IL-10 ノックアウトマウスなど一部の腸炎モデルは腸炎発症が腸内細菌に依存していることがわかっている。これまで OXA 腸炎モデルと腸内細菌が関与しているという報告はないが、その可能性は否定できない。そこで OXA 腸炎モデルに青黛を投与する前後の糞便を採取し、そこから抽出した DNA の 16S rRNA 領域を次世代シーケンサーにより解析した。その結果、青黛の投与により腸内細菌の構成が劇的に変化することがわかった。具体的には、約 50~70%を占めていたバクテリオIDES門に属する細菌種の多くが青黛投与後は著しく減少し、それとは逆にフィルミクテス門に属する細菌種は増加していた。

腸内細菌の変化が OXA 腸炎の増悪に関与したのかどうかを調べるために、BALB/c マウスにあ

らかじめ 4 種類の抗生素（パンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシン、アンピシリン）を 1 週間投与させることで腸内細菌を消失させ、その上で前回と同じプロトコルで OXA による腸炎誘発および青黛の投与を行った。すると、体重変化、マウス内視鏡所見、病理所見、いずれにおいても青黛非投与群と青黛投与群の間で差がみられなくなり、腸管組織内の TNF- α の発現レベルにも差がみられなくなった。これらの結果より示唆されるのは、まず腸内細菌が正常の状態だと青黛は OXA 肠炎モデルにおいても IL-13 の発現を抑制しうること、しかし腸内細菌の構成が変化することでこの効果が打ち消され、腸炎が増悪するという逆の結果が導かれたということである。

我々が OXA 肠炎モデルを選んだのは、青黛の Th2 関連腸炎に対する効果を評価するためであり、それは同じく Th2 関連腸炎である潰瘍性大腸炎への青黛の効果が示されているからである。しかしながら、腸炎モデルは実際の腸炎疾患を完全に再現したものではない。本研究では青黛が OXA 肠炎を増悪させたが、だからと言って潰瘍性大腸炎を増悪させるとは限らない。実際に本研究では青黛が IL-4 や IL-13 といった Th2 関連サイトカインの発現を抑制しており、これが潰瘍性大腸炎を改善させる原因となっている可能性は考えられる。そしてもう一つの重要な要素が、青黛は腸内細菌の構成を変化させることである。潰瘍性大腸炎の患者に糞便移植やプロバイオティクス製剤が奏功した報告があることは、潰瘍性大腸炎に腸内細菌が関与していることを示唆している。青黛が潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌を変化させることで、病状に影響を与える可能性も考えられる。

結論として、青黛は OXA 皮膚炎に対して好酸球の遊走を抑えること、また IL-4 の産生を抑制することで抗炎症作用を示す。しかし OXA 肠炎に対しては、IL-13 の産生を抑制するのにも関わらず腸炎の増悪を来し、それは腸内細菌の構成を変化させることによる。この結論から言えることは、青黛はアレルギー反応を抑えることで抗炎症作用を示す一方で、腸管炎症に対しては腸内細菌の変化も影響するため、改善にも増悪にも転じ得るということである。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2707 号	氏名	足立 聰一郎
論文題目 Title of Dissertation	Indigo Naturalis Ameliorates Oxazolone-induced Dermatitis but Aggravates Colitis by Changing the Composition of Gut Microflora		
青黛はオキサゾロン皮膚炎を改善させる一方で、腸内細菌の構成を変化させることによりオキサゾロン腸炎を増悪させる			
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	錦織 千佳子	
	副査 Vice-examiner	全 陽	
	副査 Vice-examiner	森信 晃元	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

青黛は植物由来の青い粉末状の漢方薬であり、古くから中国にて抗炎症薬として乾癥をはじめとする皮膚疾患に幅広く用いられており、その効果を示す臨床研究が多く発表されている。また、慣習的に炎症性腸疾患、特に、潰瘍性大腸炎にも用いられており、日本では、青黛の潰瘍性大腸炎に対する有効性を示した臨床研究がいくつか発表されている。しかし、青黛の作用機序については未だ解明されていない。OXAは、ハプテン由来のアレルギー性皮膚炎、および、Th2関連腸炎を誘発する薬剤であり、OXAによる引き起こされる疾患は、青黛の治療対象となる皮膚疾患や潰瘍性大腸炎に、より近い病態と考えられる。そこで、申請者達は、オキサゾロン(OXA)誘発性の皮膚炎、および、腸炎モデルマウスを用いて、青黛の炎症性疾患に対する効果について評価した。

はじめに、C57BL/6Jマウスの腹部に2%OXAを塗布し感作させ、数日後にマウスの耳介に1%OXAを再塗布し、アレルギー性皮膚炎を誘発した。そして、OXAの再塗布と同じタイミングから、青黛を連日塗布することで、炎症所見に対する青黛の影響を評価した。その結果、青黛を塗布した群において、耳介の肥厚が有意に抑制され、病理所見においては、皮膚組織内における炎症性細胞、特に好酸球の浸潤が抑制された。皮膚組織内における炎症性サイトカインの発現レベルをリアルタイムPCR法にて評価した結果、青黛塗布群では、Th2に関連するサイトカインであるIL-4の発現が有意に抑制された。これらの結果より、青黛にはアレルギー性皮膚炎を抑える効果があり、その作用機序として、Th2に関連するサイトカインの抑制と好酸球遊走の抑制が関与する可能性を示唆された。

次に、BALB/cマウスに対して、上記と同様に、2%OXAにて感作した後に、100μlの0.5%OXAを注腸投与することでOXA腸炎を誘発し、OXAの注腸投与と同じタイミングに、5%青黛入り粉末飼料の摂取を開始させ、続けて、体重測定、マウス内視鏡検査、病理評価、リアルタイムPCR法によるmRNA発現レベルの検討を実施し、青黛が腸炎に与える影響について検討した。その結果、青黛摂取群において、マウス体重の有意な減少が確認できた。マウス内視鏡検査においても、青黛投与群では、びらんや潰瘍発生などの重度の粘膜障害を認め、病理所見においても、青黛摂取群では、腸管上皮の消失、腸管上皮の浮腫、炎症性細胞の浸潤などの所見増悪を認めた。腸管上皮内の炎症性サイトカイン発現レベルをリアルタイムPCRによって評価した結果、OXA腸炎において最も重要なIL-13の発現レベルが、青黛摂取によって低下することを示した。一方、同条件下において、本研究で検討した各種炎症性サイトカインの中で、TNF-α発現だけは、青黛摂取により上昇していた。なお、青黛による腸炎への効果の検証を、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性腸炎モデルを用いて実施したが、青黛投与による腸炎増悪は認めなかつた。

IL-10ノックアウトマウスなど一部の腸炎マウスモデルでは、腸炎発症が腸内細菌叢に依存していることが明らかにされている。これまで、OXA腸炎モデルと腸内細菌叢とが関連しているという報告はないものの、その可能性は否定できないことから、申請者達はOXA腸炎モデルマウスにおいて、青黛を摂取させる前後の糞便を採取し、そこから抽出したDNAを用いて、腸内細菌に対する16S rRNA領域の次世代シーケンサーによる解析を

実施した。その結果、青黛摂取により、腸内細菌叢の構成が劇的に変化することを示した。具体的には、約50～70%を占めていたバクテロイデス門に属する細菌種の多くが、青黛摂取後には著しく減少し、その一方で、フィルミクテス門に属する細菌種の割合が増加した。次に、青黛摂取における腸内細菌叢の変化がOXA腸炎の増悪に関与したのか否かを検討するため、BALB/cマウスに、あらかじめ4種類の抗生素（パンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシン、アンピシリン）を1週間投与することで腸内細菌を消失させ、その条件下で、前回と同じプロトコルで、OXAによる腸炎誘発、ならびに、青黛摂取を行った。その結果、体重変化、マウス内視鏡所見、病理所見、いずれにおいても、青黛非摂取群と青黛摂取群との間で有意な差は観察されず、大腸組織内のTNF- α の発現レベルにおいても、有意な差は確認できなかった。これらの結果は、青黛摂取により、OXA腸炎モデルにおいて、腸炎発症に重要な役割を発揮するIL-13の発現が抑制されるものの、青黛摂取に引き起こされる腸内細菌叢の構成変化が、IL-13発現抑制に基づく効果を打ち消し、腸炎が増悪した可能性を示唆している。

本研究では、青黛摂取がOXA腸炎を増悪させたが、腸炎動物モデルは、実際のヒトの腸炎疾患を完全に再現したものではないためであると考えられ、青黛が潰瘍性大腸炎を増悪させる可能性が示されたというわけではない。しかし、本研究では、青黛摂取がIL-4やIL-13といったTh2に関連するサイトカインの発現を抑制しており、これがヒト潰瘍性大腸炎を改善させる要因となっている可能性は十分に考えられる。また、青黛が、腸内細菌叢の構成を変化させたことも、重要な要素である。実際に、潰瘍性大腸炎患者に対する糞便移植やプロバイオティクス製剤が有効であると確認できた報告があり、潰瘍性大腸炎に対する腸内細菌叢の関与が示唆されている。このことから、青黛摂取が潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢の構成を変化させることで、病状に影響を与える可能性も考えられる。

本研究において、青黛が、OXA皮膚炎において、好酸球の遊走を抑制すること、そして、IL-4産生を抑制することで、抗炎症効果を発揮できる可能性を明らかにしたが、OXA腸炎に対して、青黛は、IL-13産生を抑制するのにも関わらず、腸炎の増悪を引き起こし、その増悪は、青黛摂取による腸内細菌叢の構成変化による可能性が示された。これらのことから、青黛は、アレルギー反応を抑えることで抗炎症作用を発揮する一方、腸内細菌叢の構成変化も関係する腸炎に対しては改善にも増悪にもなりうる可能性を示した。よって本研究は重要な知見を得たものとして価値ある集積であり、博士（医学）学位を得る資格があると認める。