

炎症性腸疾患モデルにおける benzo[a]pyrene の
炎症抑制効果
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系機能生理学専攻

安達 慶太

修了年 2020 年

指導教員 越永 從道

背景：

1. 炎症性腸疾患について

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD)は腸粘膜に炎症や潰瘍を生じる原因不明の慢性炎症性疾患で、病変部位および病理組織学的特徴から潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis : UC)と Crohn 病 (Crohn's disease : CD)に大別される。UC は直腸から連続性・びまん性に主として粘膜を侵し、しばしばびらんを形成する。一方、CD は消化管のどの部位にも生じうる非連続性の全層性肉芽腫性炎症や瘻孔を特徴とする。その臨床症状として、下痢、血便、腹痛および体重減少などをきたす。疫学的には、UC が 1975 年、CD が 1976 年にそれぞれ難病として特定疾患に指定されて以降、我が国で増加の一途を辿っている。近年では、生活習慣の欧米化に伴い、本邦のみならず、アジア諸国でも急激な罹患率の上昇を認めている。IBD は遺伝的素因や環境因子に加えて、食餌や腸内細菌叢などの複合的要因が関与し、腸管免疫の過剰応答が生じて腸管炎症が引き起こされると考えられている。UC、CD いずれも再燃と寛解を繰り返す慢性疾患であるが、その発症機序の全貌はいまだ明らかになっていない。

2. DSS 大腸炎モデルについて

IBD モデルマウスは、①上皮バリアの傷害によるモデル、②自然免疫系の異常によるモデル、③過剰な T 細胞応答を特徴とするモデル、④制御性およびエフェクター T 細胞不均衡によるモデル、⑤自然発症モデルの 5 つに大別される。数十種類以上と多岐にわたる IBD モデルマウスが存在する中、ヒト IBD の臨床的・組織学的特性の複雑さをよく反映した動物モデルは多くない。

最も頻用されるモデルが、デキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate : DSS)を飲水投与することによって腸炎を発症させる DSS 大腸炎モデルである。DSS は腸粘膜上皮細胞の障害を誘導し、下痢、血便、体重減少などが引き起こす。ヒト UC に類似した病態を呈する DSS 大腸炎モデルは、その迅速性、単純性、再現性および操作性が特徴である。薬効評価や免疫応答のシグナル解析にも有用であり、IBD の病態を組織学的、免疫学的小および形態学的側面から解明するにあたり不可欠な存在である。

3. 芳香族炭化水素受容体について

芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor : AhR) は多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon : PAH)の受容体として、リガンド応答性転写因子として働く。AhR のリガンドは多種多様であり、ダイオキシンとして知られる 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)や PAH である benzo[*a*]pyrene (BaP)をはじめ、tryptophan 代謝物である 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole (FICZ)などが知られている。AhR のリガンドが細胞質内に局在する AhR に結合すると、複合体は核内へ移行し、AhR nuclear translocator (ARNT)とヘテロダイマーを形成する。AhR-ARNT 複合体は標的遺伝子のプロモーター領域にある xenobiotic responsive element (XRE)配列に結合し、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)をはじめとする多くの標的遺伝子の転写を活性化させる。

AhR は近年になり、免疫応答における炎症の調節因子として重要であることが明らかになり、自己免疫疾患の病態形成に関与しているとされている。そのため、AhR を標的にしたアプローチが注目され、いくつかの AhR リガンド投与による AhR の活性化が大腸炎に対して保護的に働くことが知られている。これまでに TCDD や FICZ などのリガンドの投与によって大腸炎の炎症が抑制されたことを示す複数の報告がある。

4. Benzo[*a*]pyrene について

環境中に普遍的に存在する有害環境汚染物質である PAH のうち最も代表的な物質が、タバコ煙や加熱調理食品に含まれる生活環境因子 BaP である。半世紀以上前より BaP の発がん性が注目されてきたが、AhR の活性化により誘導される CYP1A1 などによって代謝された BaP の中間産物が DNA 付加体を形成し、遺伝子変異を誘導することが関与する。これは、代謝活性化と呼ばれるメカニズムであり、本来 BaP を解毒すべき AhR-CYP1A1 経路が、他の酵素とのバランスの相違などにより毒性の強い BaP の中間代謝産物を産生してしまうことによる。また、BaP は、さまざまな種や組織において細胞毒性や催奇形性、遺伝毒性、変異原性を引き起こし、肺癌や頭頸部癌、アテローム性動脈硬化症などの発症に関与していることが知られている。先行研究では、動脈硬化モデル・脂肪肝モデルにおいて、BaP はそれぞれの病態を増悪させる方向にはたらいた。BaP は AhR リガンドとして AhR 依存性の免疫調節作用を誘導す

ることに加え、CYP1 酵素により代謝される解毒作用と、BaP 特有の代謝活性化による障害作用の二面性を有している。

目的：

IBD に対する内科的治療の進歩が著しい一方で、病態メカニズムの解明や根本治療の確立は十分とは言えない。近年では、AhR を標的にしたアプローチが注目されており、AhR リガンドを用いた IBD 治療法の開発も期待されている。これまでに TCDD や FICZ など、いくつかの AhR リガンドの投与により大腸炎の炎症が抑制されたという報告を認めているが、BaP が大腸炎に及ぼす影響についてはこれまでに報告されていない。

本研究は、BaP が大腸炎を抑制するのか、または増悪させるのかを検証し、生体における BaP の作用を明らかにすることを目的とした。

実験方法：

7 週齢の雄の C57BL/6 マウスに対し、以下の群構成でモデルマウスを作製した。

①(Ctrl 群) (n=4)

:濾過滅菌水およびコーン油を浸したペレットを投与する群

②(BaP 群) (n=4)

:濾過滅菌水および BaP を含んだコーン油を浸したペレットを投与する群

③(3%DSS 群) (n=4)

:3%DSS 溶液およびコーン油を浸したペレットを投与する群

④(3%DSS + BaP 群) (n=4)

:3%DSS 溶液および BaP を含んだコーン油を浸したペレットを投与する群

DSS 投与群は濾過滅菌水にて 5 日間の馴化後、3%DSS 溶液の投与を開始した。DSS 投与開始日を day0 とし、6 日間投与の後、day6 からは濾過滅菌水に変更した。BaP 投与群は、実験開始日から終了まで連日 BaP を含んだコーン油を浸したペレットを自由摂取させた。連日、体重、摂水量および摂餌量を測定し、体重、便の性状、血便の有無により disease activity index (DAI) スコアを評価した。Day9 にすべてのマウスに頸椎脱臼による安楽死処置を行い、大腸、脾臓、肝臓を回収し、長さ・重量を測定した。また、遠位大腸を用いて、

組織学的検査および RT-PCR による遺伝子解析、さらに enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)法により血漿 IL-6 を測定した。すべてのデータは平均値±標準誤差で示し、一元配置分散分析および Tukey 法による多重比較検定を行った。p<0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

結果：

1. 体重変化率、摂水量および摂餌量の変化

3%DSS は day4 より体重を減少させたが、BaP は DSS による体重減少を摂取 7 日目から軽減させた。Day9 における体重変化率は DSS+BaP 群に比べて DSS 群で有意に低かった。摂水量および摂餌量も、DSS によって減少したが、BaP 投与によって減少が軽減した。

2. 大腸の長さ、DAI スコア

DSS 群は Ctrl 群に比べて、腸管の短縮が有意に認められたが、BaP 投与により有意に抑制された。DSS 投与群では、day4 より下痢による DAI スコアの増加が認められ、day5 には下血のためにさらに上昇し、day6 でピークを認めた。DSS 投与を終了した day6 以降はスコアの減少を認めたが、BaP の投与によって、day9 における DAI スコアの有意な減少が認められた。

3. 組織学的検査による大腸の炎症状態の評価

DSS 群ではびらん、腸陰窩の消失、炎症性細胞浸潤、粘膜上皮における杯細胞消失などが観察され、大腸の強い炎症所見を認めた。一方、DSS+BaP 群では腸陰窩の消失および上皮過形成がわずかにみられる程度であった。3つの炎症スコア (Severity of inflammation、Extent of injury、Crypt damage)は、DSS 投与にていずれも有意に増加し、BaP 投与によりいずれも有意に減少を認めた。

4. mRNA 発現解析

炎症促進因子である TNF- α 、IFN- γ 、IL-17A および IL-6 の mRNA 発現は、いずれも DSS 投与で増加する傾向を認めた。IL-17A および IL-6 は、BaP の併用により有意に発現低下を認めた。炎症制御因子では、IDO1 の mRNA 発現は、DSS 投与で増加したものの有意差は認めず、BaP による有意

な変化も認められなかった。IL-22 および Foxp3 の mRNA 発現はそれぞれ、DSS 投与で有意に増加を認めた。BaP の併用では、いずれの遺伝子の発現量も低下する傾向を認めた。AhR の活性化マーカーである CYP1A1 の mRNA 発現は、BaP 含有飼料単独摂取によって強く誘導された一方、DSS 存在下では、有意差は認めないものの、発現量は抑制されていた。

5. 血中サイトカインレベルの評価

炎症マーカーとして血漿 IL-6 産生量を評価した。DSS 投与は血漿 IL-6 を有意に増加したが、BaP は DSS による IL-6 増加を有意に軽減した。

考察：

先行研究では動脈硬化と脂肪肝の病態を増悪させる方向にはたらいた BaP が、大腸炎モデルに対しては病態を抑制することが明らかとなった。これらの研究結果は、BaP の病態促進または抑制作用が組織・疾患選択的であること、BaP の解毒・代謝活性化バランスが組織によって異なることを示している。

タバコ煙に含まれる成分である BaP が UC に近い病態を呈するとされている DSS モデルにおいて大腸炎を改善したという結果は、喫煙によってリスクが下がる UC の特徴を反映していると言える。BaP は、代謝活性化により、健康への影響、発がん性や、さまざまな疾患の発症に寄与する有害物質である一方、UC に対しては AhR リガンドとして予防的にはたらくのかもしれない。BaP には代謝活性化による障害作用があるため、BaP を治療に応用することは現実的ではないが、毒性のない天然 AhR リガンドの開発は臨床応用できる可能性があり、重要だと言える。

まとめ：

本研究の結果から、DSS を用いた IBD モデルにおいて、BaP が大腸炎に対し炎症抑制効果を発揮することが明らかになった。DSS 大腸炎環境下においては、BaP の AhR リガンド作用と AhR 誘導酵素による解毒または代謝活性化による障害作用という二面性のうち、AhR リガンドとしての免疫調節作用がより強く影響していると考えられた。