慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	インジゴ化合物による新規原発性硬化性胆管炎治療法の開発
Sub Title	Development of a new treatment for primary sclerosing cholangitis with indigo naturalis
Author	谷木, 信仁(Taniki, Nobuhito)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	原発性硬化性胆管炎(PSC, Primary Sclerosing Cholangilitis)には有効な治療法がなく、新規治療開発が求められている。PSC患者ではしばしば炎症性腸疾患を合併するが、本検討においては潰瘍性大腸炎に対して有効なAryl hydrocarbon receptor (AhR)リガンドを含む生薬である青黛を用い、PSCに対する有効性を検証した。青黛は薬剤誘発性および胆汁うっ滞性PSCモデルマウスにおける胆管障害をAhR依存的に軽減することを見出した。今後、青黛およびAhRがPSCの病態形成に与える影響を明らかにし、PSCに対する創薬シーズとして発信することを目的とする。 Currently, no cure or effective treatments for primary sclerosing cholangitis (PSC) exist, and development of new treatment is on demand. Inflammatory bowel disease (IBD) and PSC are closely associated disease. We previously reported efficacy of aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand-containing biopharmaceutica agent, indigo naturalis (IN) in inducing a clinical response in patients with ulcerative colitis in a randomized, placebo-controlled trial. In the current study, we analyzed the efficacy of IN for patients with PSC. We found IN to be effective in reducing cholangitis of 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)-induced and MDR2 KO PSC model mouse in an AhR-dependent manner. In the future, we aim to clarify the effects of IN and AhR on the pathogenesis of PSC and to disseminate IN as drug discovery seeds for PSC.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2020～2021 課題番号：20K17062 研究分野：腸肝臓軸
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K17062seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ１７０６２

研究課題名（和文）インジゴ化合物による新規原発性硬化性胆管炎治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for primary sclerosing cholangitis with indigo naturalis

研究代表者
谷木　信仁（Taniki, Nobuhito）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：２０６２７１２９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：原発性硬化性胆管炎(PSC, Primary Sclerosing Cholangilitis)には有効な治療法がなく、新規治療開発が求められている。PSC患者ではしばしば炎症性腸疾患を合併するが、本検討においては潰瘍性大腸炎に対して有効なAryl hydrocarbon receptor (AhR)リガンドを含む生薬である青黛を用い、PSCに対する有効性を検証した。青黛は薬剤誘発性および胆汁うっ滞性PSCモデルマウスにおける胆管障害をAhR依存的に軽減することを見出した。今後、青黛およびAhRがPSCの病態形成に与える影響を明らかにし、PSCに対する創薬シーズとして発信することを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義
PSCは肝内外胆管のびまん性狭窄を生じる慢性炎症性疾患であり、有効な治療法が確立されておらず、進行例では肝移植が唯一の救命法である。肝移植に関しては脳死肝移植ドナーの少ない本邦では生体肝移植が主に行われているが、生体肝移植後のPSC再発率が高いことが問題となっており、新たな治療法の開発が求められている。本研究ではAhRリガンドをPSCに対する新たな創薬シーズとして臨床応用に展開するための基盤的研究を行う。本研究ではすでに青黛がAhR依存的にin vivoマウス硬化性胆管炎における病態形成の抑制に寄与することを見出しており、PSCに対する新たな治療を開発するための画期的な知見と言える。

研究成果の概要（英文）：Currently, no cure or effective treatments for primary sclerosing cholangitis (PSC) exist, and development of new treatment is on demand. Inflammatory bowel disease (IBD) and PSC are closely associated disease. We previously reported efficacy of aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand-containing biopharmaceutica agent, indigo naturalis (IN) in inducing a clinical response in patients with ulcerative colitis in a randomized, placebo-controlled trial. In the current study, we analyzed the efficacy of IN for patients with PSC. We found IN to be effective in reducing cholangitis of 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)-induced and MDR2 KO PSC model mouse in an AhR-dependent manner. In the future, we aim to clarify the effects of IN and AhR on the pathogenesis of PSC and to disseminate IN as drug discovery seeds for PSC.

研究分野：腸肝臓軸

キーワード：AhR　原発性硬化性胆管炎

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

原発性硬化性胆管炎(Primary Sclerosing Cholangilitis:PSC)は肝内外胆管のびまん性狭窄を生じる慢性炎症性疾患である。有効な治療法が確立されておらず、進行例では肝移植が唯一の救命法である。肝移植に関しては脳死肝移植ドナーの少ない本邦では生体肝移植が主に行われているが、生体肝移植後の PSC 再発率が高いことが問題となっており、新たな治療法の開発が求められている。

PSC 患者ではしばしば潰瘍性大腸炎(UC, ulcerative colitis)や Crohn 病などの炎症性腸疾患(IBD, inflammatory bowel disease)を合併することが知られており(Hirschfield GM et al. *Lancet* 2013) (Lazaridis KN et al. *N Engl J Med* 2016)、その病態形成の関与が示唆される。我々は先行研究において、PSC と UC を合併した患者の便中に、肝臓内の TH17 細胞の活性化を引き起こす Klebsiella pneumonia(Kp)を始めとする 3 種類の腸内細菌が高確率で存在することを見出した。3 菌を無菌マウスに移植する（PSC マウス）と肝臓に Th17 細胞の誘導を認めた。PSC マウスは胆管炎モデルで重症度が増悪することが判明した。Kp とヒト大腸上皮細胞との共培養系において、Kp が上皮細胞のアポトーシスを誘導した。PSC の病態に、Kp が腸管上皮細胞を破壊し、”leaky gut”を誘導するという新規メカニズムを明らかとした。さらに、同マウス肝臓で起こる TH17 免疫反応は、抗菌薬によるクレブシエラ菌の排除により 30%程度に減弱することが示された(Nakamoto et al. *Nat Microbiol*. 2019)(図 1)。この研究結果から我々は、腸内環境を標的とした PSC に対する新たな治療薬や診断薬の開発を目指している。

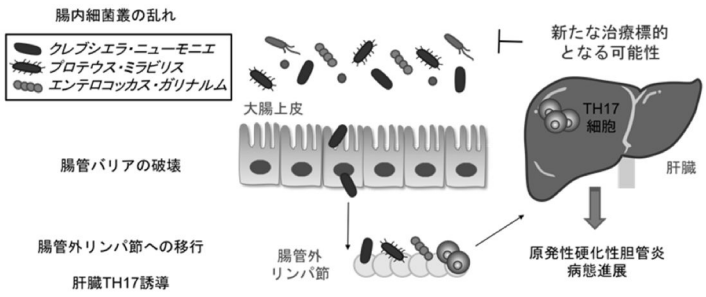

図1.　PSC に病態に関与する腸内細菌

２．研究の目的

青黛はインジゴなどの Aryl hydrocarbon receptor (AhR)のリガンドを主成分とする生薬であり、UC の民間療法に用いられてきたが、青黛の UC に対する有効性・安全性に関する科学的な確認がなされていなかった。我々の研究室では、多施設二重盲検ランダム化比較試験において、青黛の UC に対する有効性・安全性に関する高いエビデンスを創出した(Naganuma et al. *Gastroenterology* 2018)。今回我々は、UC に対して有効性が示された青黛において、その病態形成が UC と深く関わるとされる PSC の新たな治療法としての可能性に着目した。

申請者は、UC に対して有効性が示された青黛において、その病態形成が UC と深く関わるとされる PSC に対しても有効ではないかという仮説を立てた。本研究においては PSC モデルマウスにおいて、青黛の投与がその病態形成にどのような影響を与えるかを検討し、AhR リガンドであるインジゴ化合物を含む青黛を PSC に対する新たな創薬シーズとして臨床応用に展開するための基盤的研究を行うことを目的とした。

３．研究の方法

3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine(DDC)を投与したマウスでは、区域性の胆管閉塞

および肝外胆管を含む大胆管周囲の炎症と線維化が誘導されることから、PSC モデルとして広く用いられている。また、胆汁酸の胆管への排出を担う ATP-Binding Cassette(ABC)トランスポーターの一つである MDR2 を欠損させたマウスでは、胆汁うっ滞により誘発される胆管周囲の慢性炎症および線維化をきたすため、PSC モデルとして広く用いられている。本研究ではこれらのモデルマウスを用いて、青黛の投与がその病態形成にどのような影響を与えるか検討を行った。血清学的・組織学的評価に加え、肝臓内の免疫細胞の変化をフローサイトメトリーにより解析し、青黛および AhR リガンドが肝臓内免疫細胞に与える影響を検討した。また、AhR 発現と腸炎抑制効果との関係については、そのメカニズムとして免疫細胞が関わることが報告されており、innate lymphoid cells type 3（ILC3）細胞数の増加に伴い、組織修復として働く IL-22 産生量が増加し、組織修復が促進されるとされている（Qiu et al. Nature 2017）。本研究においては、青黛および AhR リガンド投与が肝臓内 ILC3 に与える影響を検討した。さらに、ILC3 が欠損する RORγt KO マウスを用いて青黛の胆管炎抑制効果と ILC3 の関わりを検討した。

４．研究成果

(1) DDC 胆管炎モデルマウスに青黛を投与することにより、血清学的に著明な胆管障害の軽減が認められた（図 2）。組織学的にも同様に胆管周囲の炎症細胞浸潤および線維化の減弱が認められた。

(2)MDR2 ノックアウト(KO)マウスにおいて、8 週齢から 4 週間の期間に青黛含有食を投与することで、血清学的に著明な胆管障害の軽減が認められた（図 3）。組織学的にも同様に胆管周囲の炎症細胞浸潤および線維化の減弱が認められた。

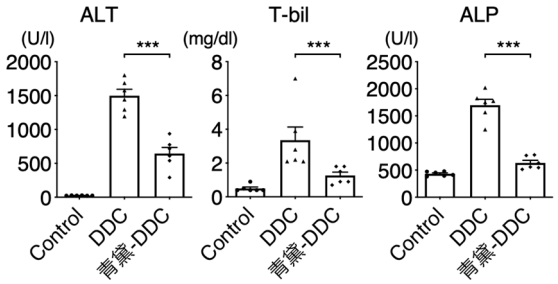

図2.　青黛投与によりDDC誘発性胆管炎は減弱

(3)AhR KO マウスでは、DDC 胆管炎モデルマウスにおける青黛の血清学的な胆管障害減弱効果はキャンセルされた。組織学的にも同様に胆管周囲の炎症細胞浸潤および線維化の減弱効果はキャンセルされた。さらに、マウス AhR リガンドである indole-3-carbinol（I3C)の投与により、DDC 胆管炎モデルおよび MDR2 KO マウスの胆管炎は減弱することが示された。これらの結果から、PSC モデルマウスにおける青黛の胆管障害改善効果は AhR 依存的であることが示された。

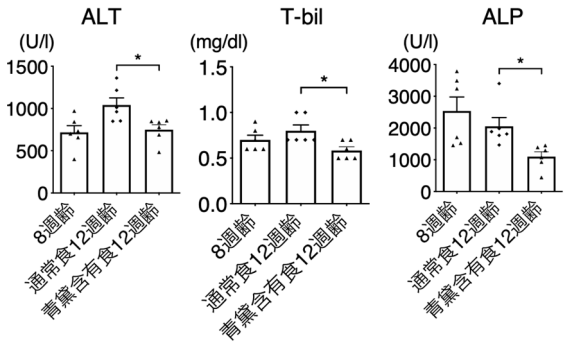

図3.　青黛投与によりMDR2ノックアウトマウスの胆管障害は軽減される

(4) DDC 胆管炎モデルおよび MDR2 KO マウスでは肝臓内に浸潤する IL-1β産生性マクロファージおよび Th17 細胞が増加する一方で、青黛投与によりこれらの細胞浸潤は減少した。また、ILC3 の肝臓内浸潤は青黛投与の影響を受けず、RORγt KO マウスにおいても DDC 胆管炎モデルにおける青黛の血清学的な胆管障害減弱効果は再現された。

本研究の結果から、青黛は PSC の病勢制御に対して有効である可能性が見出された。今後、AhR が PSC の病態形成に与える役割を、免疫細胞、上皮細胞、腸内細菌叢およびその相互作用を細胞生物学的にさらなる理解を深め、PSC に対する創薬シーズとして発信することを目指す。ヒト AhR

はマウスやラットの AhR と比較して、種々の AhR リガンドに対するに親和性が異なることから、まずは、遺伝子工学的にヒトの AhR 遺伝子を挿入したマウスを用いて、青黛の効果がヒトにおいても有効であるか検証することで、本研究を臨床応用につなげるための基盤的研究とする。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Teratani T, Mikami Y, Nakamoto N, Suzuki T, Harada Y, Okabayashi K, Hagihara Y, Taniki N, Kohno K, Shibata S, Miyamoto K, Ishigame H, Chu PS, Sujino T, Suda W, Hattori M, Matsui M, Okada T, Okano H, Inoue M, Yada T, Kitagawa Y, Yoshimura A, Tanida M, Tsuda M, Iwasaki Y, Kanai T	４．巻 585
２．論文標題 The liver-brain-gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Nature	６．最初と最後の頁 591～596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2425-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Taniki Nobuhito、Nakamoto Nobuhiro、Chu Po-Sung、Ichikawa Masataka、Teratani Toshiaki、Kanai Takanori	４．巻 -
２．論文標題 Th17 cells in the liver: balancing autoimmunity and pathogen defense	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Seminars in Immunopathology	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00281-022-00917-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関