

論文内容要旨

Significance of non-alcoholic fatty liver disease in Crohn's disease

(クローン病における非アルコール性脂肪性肝疾患合併の臨床的重要性
-コリン欠乏がマウス実験腸炎に及ぼす影響に関する基礎的検討を含めて-)

1. Significance of non-alcoholic fatty liver disease in Crohn's disease: A retrospective cohort study

(クローン病における NAFLD 合併の臨床的意義に関する検討)

Hepatology Research, 2016, in press.

2. Choline Deficiency Causes Colonic Type II Natural Killer T (NKT) Cell Loss and Alleviates Murine Colitis under Type I NKT Cell Deficiency

(コリン欠乏がマウス実験腸炎に及ぼす影響に関する検討)

PLoS ONE 12(1): e0169681. doi:10.1371/journal.pone.0169681

主指導教員：茶山 一彰 教授

(応用生命科学部門 消化器・代謝内科学)

副指導教員：田中 信治 教授

(病院 内視鏡医学)

副指導教員：田妻 進 教授

(病院 総合診療医学)

佐上 晋太郎

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

近年、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）患者が増加しているが、クローン病においてもその合併が報告されている。クローン病は消化管、特に小腸に慢性炎症をきたす疾患であり、種々の栄養素の吸収障害を生じる。一方、NAFLDは一般に過栄養の状態が生じるものであり、クローン病でも薬物療法が奏功し寛解状態が保たれていれば、栄養素の吸収が効率的に行われ NAFLD に至るものと考えられる。また小腸切除術後、ステロイドの使用、低栄養、タンパク質不足、カロリー制限、コリン欠乏、中心静脈栄養なども NAFLD 発症のリスクとなることが報告されており、クローン病における NAFLD の原因は様々であると考えられる。しかしながら、クローン病患者において NAFLD の合併が腸管炎症にどのような影響を及ぼすのかを検討された報告はない。

本研究では、後ろ向きコホートで NAFLD 合併クローン病腸管病変の腸炎の重症度、予後を検討し、その後マウス実験モデルを用いてその機序の解析を試みた。

最初にクローン病における NAFLD 合併の臨床的意義に関する検討を行った。

2008 年から 2014 年の間に当院を受診し腹部エコーを施行したクローン病患者 304 症例を対象に、NAFLD 合併の割合、腸管関連手術の予後を解析し、NAFLD の存在そのものがクローン病の寛解および予後に影響との関連について検討した。NAFLD の定義は既報に従い、エコーで脂肪沈着の所見があり、アルコール摂取量（20g/日以下）で他の肝疾患がないものと定義し、まず NAFLD 合併の割合、C reactive protein (CRP)、Crohn's Disease Activity Index (CDAI) について後ろ向きの横断研究を行い、その後無手術期間、観察期間における腸管関連手術の有無について後ろ向きコホート研究を行った。

66 症例（21.8%）が NAFLD と診断され、NAFLD 合併症例では CRP が有意に低く（0.58 vs. 2.18 mg/dL, $P < 0.0001$ ）、寛解率（CDAI < 150 ）が有意に高い結果であった（75.9% vs. 53.7%, $P = 0.0024$ ）。また、Cox 比例ハザードモデルにおいても、“無手術”を目的変数としたところ NAFLD は予後良好な独立変数であった（ $P = 0.0014$ ）。BMI < 20 の患者群でも同様の結果が得られた。

以上より NAFLD 合併症例において、腹部エコー施行時の腸炎の活動性は低く腸管関連手術率も低値であった。クローン病において NAFLD の存在は予後良好の一因子であることが示唆された。しかし、本研究はあくまでも後ろ向き研究であり、両者の因果関係は不明である。本研究のサブ解析にて、痩せ型のクローン病でも NAFLD 合併症例の予後が良好であったことから NAFLD を引き起こす病態が腸管炎症に何らかの影響を及ぼす可能性も想定された。

炎症性腸疾患ではコリン欠乏を合併していることが報告されており、コリン欠乏下では NAFLD を発症することがわかっている。NAFLD を引き起こす病態が腸管炎症に与える影響について検討するため、コリン欠乏がマウス実験腸炎に及ぼす影響に関する実験を行った。この目的でマウスにメチオニンコリン欠乏食（MCD diet）を投与し、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発腸炎へ及ぼす影響につき検討した。

まず、C57BL/6/J マウス（WT）に MCD diet を摂取させ肝脂肪沈着を評価したところ、MCD diet 負荷 4 週後に肝への脂肪沈着を認め、1 週間の時点から有意に natural killer T (NKT) 細胞が選択的に増加した。次に MCD diet 1 週間負荷後、諸臓器の単核球を単離し、表面マーカーを FACS にて解析すると WT の type

II NKT 細胞の割合が肝臓では増加し、大腸では減少した。クローン病では type I NKT 細胞が減少していることが報告されているため、Type I NKT 細胞欠損マウス (Ja18^{-/-}) でも同様に MCD diet を負荷したところ、WT 同様 type II NKT 細胞の割合が肝臓では増加し、大腸では減少した。

腸での Type II NKT 細胞数の変化が腸炎に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、Ja18^{-/-}マウスと CD1d^{-/-}マウスに MCD diet 1 週間負荷し、4 日後より 2.0%DSS 自由飲水後、体重、便性状、血便、内視鏡スコア、組織学的スコアを解析した。Ja18^{-/-}マウスでは MCD diet 負荷により腸炎が改善したが、CD1d^{-/-}マウスでは改善は認めなかった。大腸固有粘膜層単核球 (LPL) に LPS 刺激後に上清中サイトカインの発現を ELISA で検討した。MCD diet 摂取した Ja18^{-/-}マウス由来 LPL からの IFN- γ 、IL-4 産生は減少したが、IL-10 は不変であった。一方、CD1d^{-/-}マウスでは MCD diet 負荷による各サイトカインの変動はみられなかった。サイトカイン産生細胞のサブセットを解析するために、諸臓器の単核球を単離し、PMA, ionomycin で刺激し細胞内サイトカインを FACS にて解析すると、MCD diet 負荷後に IFN- γ 、IL-4 産生 NKT 細胞は減少した。Type II NKT 細胞が colitogenic であることを確認するために Ja18^{-/-}マウスの LPL を MCD diet を摂食している Ja18^{-/-}マウスの腹腔内移入し MCD diet による Ja18^{-/-}マウスの腸炎改善効果に対する影響を評価した。MCD diet による腸炎改善効果は type II NKT 細胞を移入することでキャンセルされた。

type II NKT 細胞が MCD diet 負荷後に肝と大腸で割合が変化する機序として NKT 細胞が大腸から肝臓に移動する可能性を考えた。そこで control (CTR) diet を摂食している Ja18^{-/-}マウスの LPL を PKH 標識し、MCD diet を摂食している Ja18^{-/-}マウスの腹腔内に移入し、FACS、免疫組織化学検査にて細胞が肝および腸管に移動する割合の変化を評価した。PKH 標識 NKT 細胞の数は FACS、免疫組織化学検査ともに MCD diet 負荷後、肝臓で増加し、大腸で減少した。これらの移動にケモカインの関与がないか検討するため、MCD diet 負荷後に LPL、肝臓単核球 (HMNC) のケモカイン mRNA の発現を確認した。HMNC のケモカインレセプター CXCR6 mRNA 発現は MCD 負荷後上昇したが、LPL では低下した。以上の結果から MCD diet が CXCR6 の発現に変化を与え、大腸 Type II NKT 細胞が肝臓へ移動する可能性が示唆された。

よって、コリン欠乏下では LPL における colitogenic な type II NKT 細胞の割合が減少し、腸炎が改善される可能性が示唆された。

【まとめ】

クローン病において NAFLD の存在は予後良好の一因子であることが示唆され、マウス実験腸炎を用いた基礎的検討から、その機序として NAFLD を誘発するコリン欠乏下では、粘膜固有層リンパ球における炎症性 type II NKT 細胞の割合が減少することが考えられた。