

195. 糖鎖構造から探る炎症性腸疾患の新規治療法の開発

西田 淳史

Key words : 炎症性腸疾患, 糖鎖修飾酵素, C2GNT

滋賀医科大学 医学部 内科学講座
消化器内科

緒 言

細胞表面は糖鎖複合体である glycan によって覆われており, その構造は 糖鎖修飾酵素 (glycan-modifying-enzyme) によって修飾を受ける. この酵素の発現は, 細胞分化, 細胞活性, 炎症などの多様な因子によって変化し, それに伴い glycan 構造も様々な形態を有している. このように多様な形態を持ち, 細胞表面に豊富に存在する glycan は一つの “まとまり” を成しており, それは glycome と呼ばれている¹⁾. 最近の研究によって, この glycome が細胞のホーミング, アポトーシス, 細菌認識などの免疫システムの制御に重要な役割を果たしていることが分かってきており, 注目されている²⁾.

潰瘍性大腸炎, クローン病に代表される炎症性腸疾患は, 原因不明の慢性炎症性疾患であり, 厚生労働省難病特定疾患に指定されている. その患者数は年々増加しており, 病態解明と新規治療法の開発が望まれている³⁾. 本研究では, 大腸炎における免疫担当細胞の糖鎖構造およびその構造に関わる糖鎖修飾酵素を解析し, ヒト大腸組織を用いて, 糖鎖修飾酵素 (C2GNT1) の発現と炎症性腸疾患の重症度を比較検討した.

方法および結果

1. 大腸における樹状細胞, マクロファージ, B 細胞, NK 細胞における糖鎖修飾酵素の検討

腸炎マウスモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎および腸炎を自然発症する TCR α ノックアウトマウスを用いて検討を行った. TCR α ノックアウトマウスは, 潰瘍性大腸炎のモデルとして用いられている. 野生型 C57BL/6, DSS 腸炎マウス, および TCR α ノックアウトマウスの大腸より単核球を単離した. その単価球を CD11c, B220, および F4/80, NK1.1 にて染色を行い, FACS sorting にてそれぞれの分画を採取した (図 1).

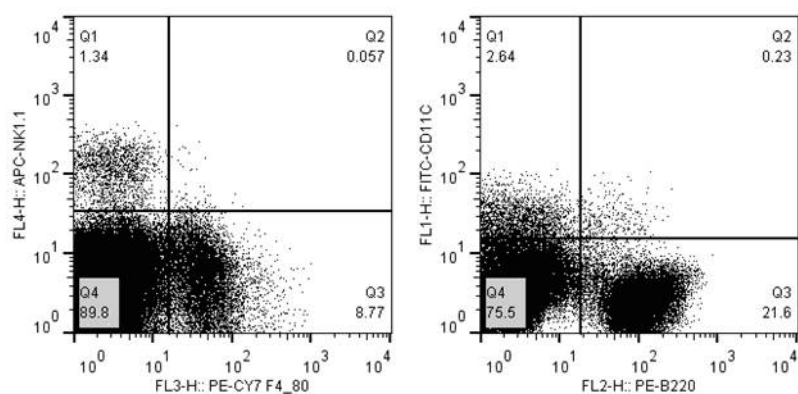


図 1. FACS sorting.

大腸粘膜下細胞を単離し、CD11c, F4/80, B220, NK1.1 で染色し、FACS にて単離した。

採取した細胞から mRNA を抽出し、主要糖鎖修飾酵素の発現を real-time PCR 法を用いて検討を行った。その結果、大腸における樹状細胞、マクロファージ、B 細胞、NK 細胞における糖鎖修飾酵素の発現は、腸炎環境下において、非大腸炎マウス（野生型非腸炎マウス）におけるそれらの免疫細胞における糖鎖修飾酵素の発現と比較し、有意な変化は認められなかった（図 2a 樹状細胞、図 2b マクロファージ、B 細胞および NK 細胞は示さず）。このことから、T 細胞、特に CD4 陽性 T 細胞における糖鎖構造の変化が大腸炎においては重要であり、その他の免疫担当細胞（樹状細胞、マクロファージ、B 細胞、NK 細胞）における糖鎖構造という点においては、腸炎の増悪に大きく関与している可能性は低いと考えられた。

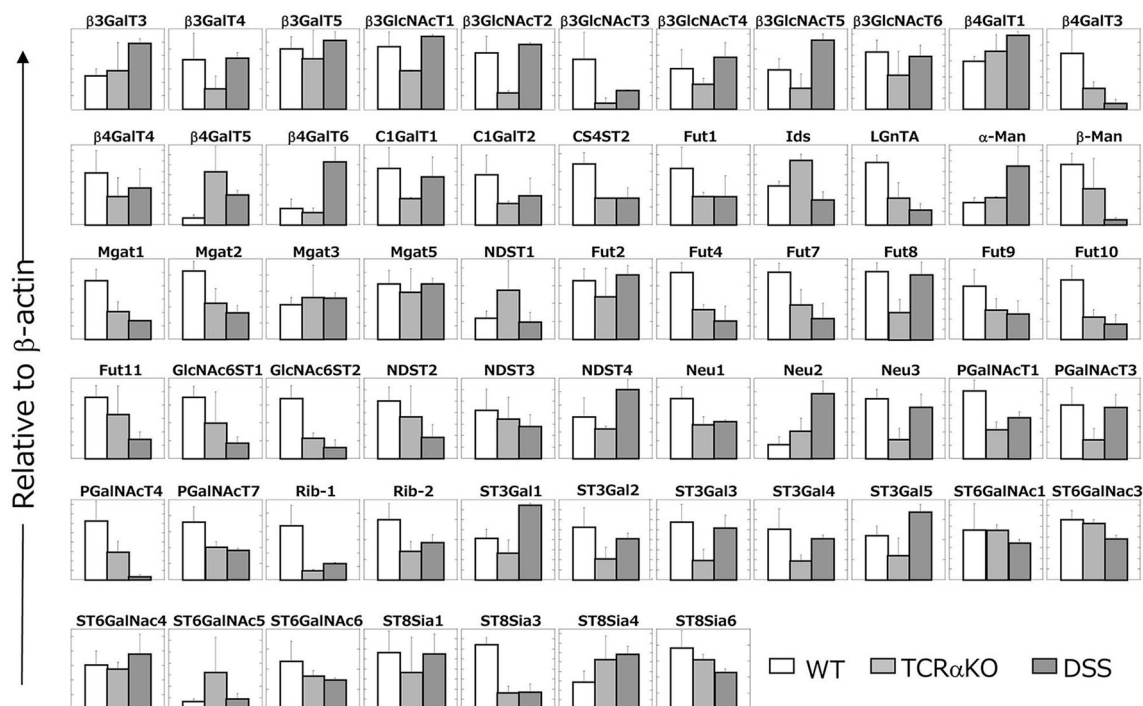


図 2a. 樹状細胞の糖鎖修飾酵素の変化.

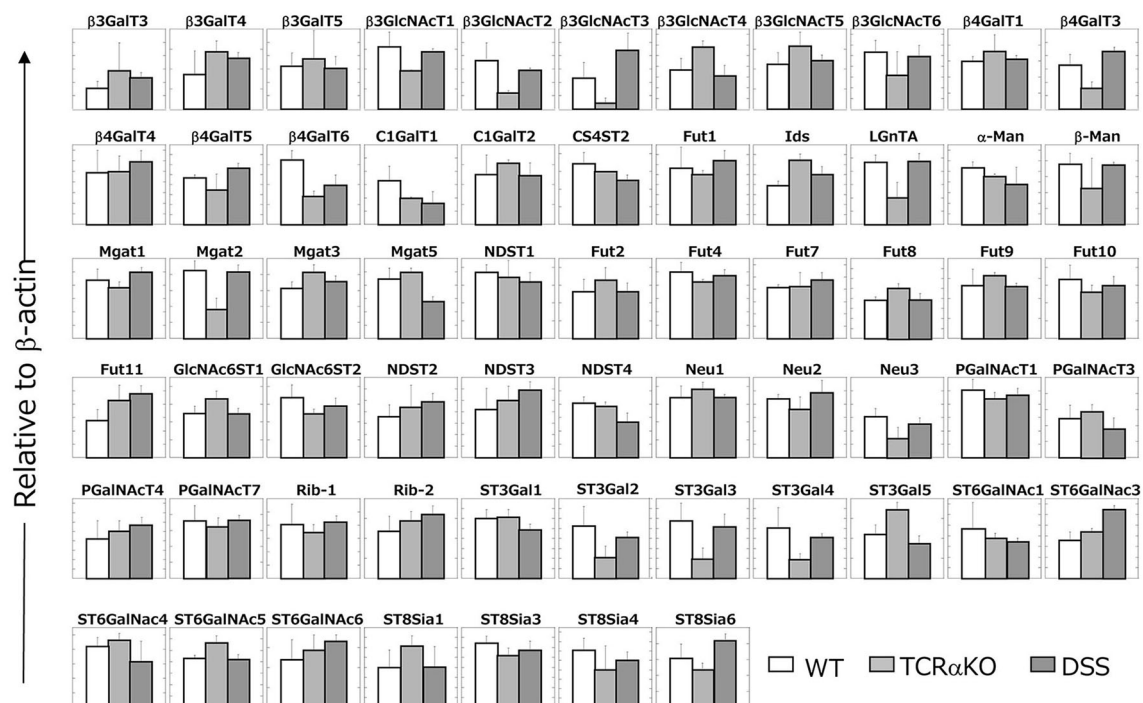


図 2b. マクロファージの糖鎖修飾酵素の変化.

WT, DSS 腸炎マウス, TCR α KO マウスの大腸より CD11c 陽性細胞 (a), F4/80 陽性細胞 (b) を sorting し, 糖鎖修飾酵素を網羅的に検索した. 非腸炎および腸炎との比較で, 有意差のある糖鎖修飾酵素は認められなかった. Mann-Whitney U test により検定.

2. 炎症性腸疾患の内視鏡的活動性と大腸組織内 C2GNT1 発現の検討

ヒト炎症性腸疾患の内視鏡的活動性と糖鎖修飾酵素の関係を明らかにするために、大腸組織における糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現を比較検討した。内視鏡的活動性は Matts のスコアを用いた。図 3a および図 3b に示すように、内視鏡的活動性が高くなるに従い、糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現が減少しており、同酵素の発現とヒト炎症性腸疾患における相関性が示された。

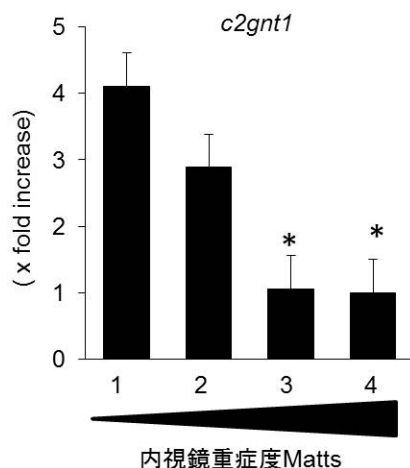


図 3a. 内視鏡的活動性と大腸組織内 C2GNT1 発現の検討.

内視鏡的活動性と大腸組織内 C2GNT1 発現を比較検討した。内視鏡的活動性は Matts スコアを用いた。内視鏡的活動性が高くなるに従い、糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現が減少していた。Mann-Whitney U test により検定。* $P < 0.01$ 。

内視鏡所見分類(Matts)

1=Normal

2=Mild granularity of the mucosa, with mild contact bleeding

3=Marked granularity and oedema of the mucosa, contact bleeding, and spontaneous bleeding

4=Severe ulceration of mucosa with haemorrhage

図 3b. Matts スコア.

内視鏡的活動性は Matts スコアで検討した。

3. 炎症性腸疾患の臨床的活動性（臨床症状）と大腸組織内 C2GNT1 発現の検討

ヒト炎症性腸疾患患者の臨床活動性と糖鎖修飾酵素の関係を明らかにするために、大腸組織における糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現を検討した。臨床的活動性は partial Mayo スコアを用いて検討した。図 4a および図 4b に示すように、臨床的活動性が高くなるに従い、糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現が減少し、同酵素の発現をヒト炎症性腸疾患の臨床症状に対する相関性が示された。

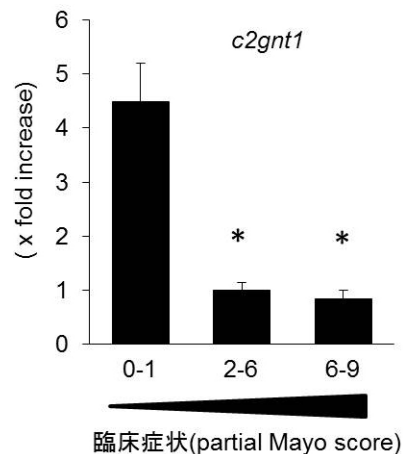


図 4a. 臨床的活動性（臨床症状）と大腸組織内 C2GNT1 発現の検討.

臨床的活動性が高くなるに従い、糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現が減少した. Mann-Whitney U test により検定. *P < 0.01.

Partial Mayo score		
サブスコア	排便回数	0:UCになる前と同程度,1:UCになる前より1~2回/日多い,2:UCになる前より3~4回/日多い, 3:UCになる前より5回/日以上多い
	直腸からの出血	0:なし,1:少量の出血、排便回数の半分以下,2:はっきりした血液、ほぼ毎日, 3:ほぼ血液ばかり
	医師の全般評価	0:正常と区別がつかない状態（完全な寛解期）,1:軽症（軽度の活動期）,2:中等症（中等度の活動期）,3:重症（高度の活動期）

図 4b. partial Mayo score.

partial Mayo score で検討した.

4. 炎症性腸疾患に対する治療効果と大腸組織内 C2GNT1 発現の検討

ヒト炎症性腸疾患に対する治療効果と糖鎖修飾酵素の関係を明らかにするために、大腸組織における糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現を検討した. このため、治療効果が得られた患者における、治療前・後での C2GNT1 の発現を比較検討した. 図 5 に示すように、治療が奏功した症例では、大腸組織内の C2GNT1 発現は有意に増加しており、治療効果と相関していることが示された.

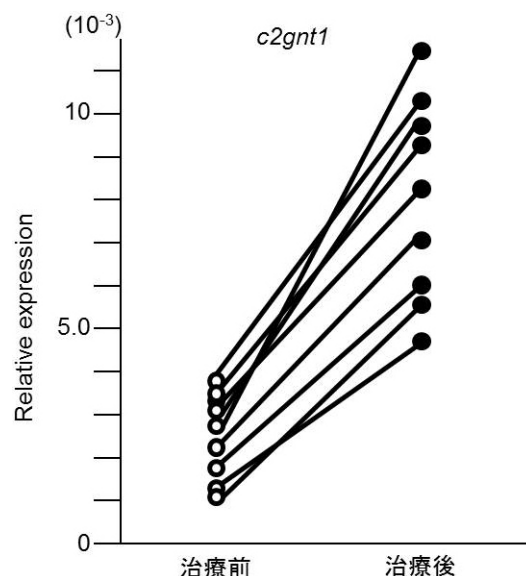


図5. 治療効果と大腸組織内 C2GNT1 発現の検討.

治療が奏功した症例では、大腸組織内の C2GNT1 発現は有意に増加していた.

考 察

炎症性腸疾患の原因としては、腸内細菌を中心として、環境因子、遺伝子素因、食餌、そして免疫異常などの関与が考えられている。今回我々は、免疫担当細胞における糖鎖構造、その構造決定に関与する糖鎖修飾酵素の観点から、炎症性腸疾患との関連を検討した。以前我々は、腸炎の悪化には CD4 陽性 T 細胞における糖鎖修飾酵素 C2GNT1 の発現が重要であることを示した。しかし、ヒト炎症性腸疾患の病態には様々な免疫担当細胞が関与していることが報告されている。このため、CD4 陽性 T 細胞以外の主要免疫担当細胞、樹状細胞、マクロファージ、B 細胞、NK 細胞の腸炎時における糖鎖修飾酵素の変化を検討した。その結果、いずれの細胞においても糖鎖修飾酵素の有意な変化は認められなかった。このことから、これらの細胞の糖鎖構造は、腸炎悪化に対してその病態に大きくは関与していない可能性が示唆された。

ヒト炎症性腸疾患の内視鏡的重症度、および臨床的重症度と大腸組織による C2GNT1 の発現を検討し、その発現がヒト炎症性腸疾患にも応用できるかどうか解析を加えた。実際に、内視鏡的重症度および臨床的重症度は大腸組織内 C2GNT1 発現は相関を認めた。さらに、治療が奏功した症例においては、治療後の C2GNT1 発現が治療前よりも有意に上昇していることが確認された。これらの結果より、組織内の C2GNT1 発現は臨床においても相関性が確認されたため、今後は治療効果予測因子として用いられるかどうかなどの検討を加え臨床応用につなげたいと考えている。

文 献

- 1) van Kooyk, Y. & Rabinovich, G. A. : Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, **9** : 593-601, 2008.
- 2) Nishida, A., Nagahama, K., Imaeda, H., Ogawa, A., Lau, C. W., Kobayashi, T., Hisamatsu, T., Preffer, F. I., Mizoguchi, E., Ikeuchi, H., Hibi, T., Fukuda, M., Andoh, A., Blumberg, R. S. & Mizoguchi, A. : Inducible colitis-associated glycome capable of stimulating the proliferation of memory CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, **209** : 2383-2394, 2012.
- 3) Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. : Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, **448** : 427-434, 2007.