

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19322

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患における制御性B細胞(Breg)の臨床応用を目指した基礎検討

研究課題名(英文) the role of regulatory B cells in inflammatory bowel disease

研究代表者

西田 淳史(Nishida, Atsushi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90719915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞は様々な免疫機能を有しているが、一般に知られている主な機能は免疫グロブリン(抗体)産生である。その一方で、近年の研究成果の蓄積によって、抗体産生以外に、Interleukin(IL-)10、IL-4、IL-17、IFN- γ などの種々のサイトカインを産生し、生体内の免疫応答において重要な役割を果たしているB細胞の存在が明らかになっている。IL-12産生B細胞は、腸炎発症時、特に腸炎回復期に最も誘導されることが確認され、大腸以外の組織では誘導されないことが確認できた。またこのB細胞は抗体産生能が低い特徴を有していた。B細胞からのIL-12産生にはT-betの誘導が必要であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：B cells have various immune functions, but the commonly known main function is immunoglobulin (antibody) production. On the other hand, accumulation of research results in recent years has resulted in the production of various cytokines such as Interleukin (IL-) 10, IL-4, IL-17, IFN- γ and so on. The presence of B cells which play an important role in the mucosal immunity has been clarified. IL-12-producing B cells were shown to be most induced during colitis onset, especially in the recovery phase of colitis, and it was confirmed that it is not induced in tissues other than colon. In addition, this B cell had a low antibody producing ability. It was confirmed that the activation of T-bet is necessary for IL-12 production from B cells.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は様々な免疫機能を有しているが、一般に知られている主な機能は免疫グロブリン(抗体)産生である。その一方で、近年の研究成果の蓄積によって、抗体産生以外に、Interleukin(IL-)10、IL-4、IL-17、IFN- γ などの種々のサイトカインを産生し、生体内の免疫応答において重要な役割を果たしている B 細胞の存在が明らかになっている。その中で、これらの抗体“非依存性”に働き、疾患の免疫応答に対して抑制性・制御性に働くサイトカイン産生 B 細胞(制御性 B 細胞、regulatory B cell; Breg)が非常に注目されている。1997 年に Mizoguchi ら(J. Exp. Med. 186, 1997)によって制御性 B 細胞が炎症性腸疾患モデルで報告されて以来、多発性硬化症モデル、慢性関節リウマチモデルなど複数の疾患モデルで証明され、その関与の報告が急増している。また、この制御性 B 細胞において一貫して報告されている特長は、“誘導性の(inducible な)”細胞群であることである。即ち、健常人では制御性 B 細胞は極僅かしか存在しないが、炎症下では分化、増殖が誘導され、その誘導された制御性 B 細胞は病気の進行抑制または回復促進に貢献する。さらに特記すべき事は、抗 CD20 抗体(リツキサン)治療による B 細胞除去療法は炎症性腸疾患を増悪させるという臨床報告があり、これは制御性 B 細胞が、炎症性腸疾患の抑制に関与している事を強く示唆していると言える。

2008 年に Shimomura ら(J. Exp. Med. 205, 2008)によって、腸炎における IL-12 産生 B 細胞の存在が報告されていたが、その機能は未だ不明である。本研究計画では、ヒト炎症性腸疾患における IL-12 産生制御性 B 細胞の誘導機序、特徴、機能を詳細に検討し、治療応用を目指した IL-12 産生制御性 B 細胞の治療効果をマウスモデルを用いて検討することを目的とする。

2. 研究の目的

B 細胞の主な役割は抗体産生能であるが、その一方で、様々な疾患モデルにおいて、炎症環境下では、サイトカインを産生する B 細胞が存在することが分かってきている。その中で、特に制御性機能をもつ B 細胞(regulatory B cell; Breg)が注目されている。申請者は、炎症性腸疾患モデルマウスを用いて腸炎回復期に、サイトカインを産生することで腸炎

を収束させる機能をもつ腸管の IL-12 産生制御性 B 細胞を初めて発見した。本研究では、IL-12 産生制御性 B 細胞の臨床応用を視野に入れた基礎検討を完成させ、ヒト炎症性腸疾患での誘導機序、その特性を詳細に検討し、制御性 B 細胞を用いた炎症性腸疾患の新規治療に結びつく研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) IL-12 産生 B 細胞 (in vivo)

正常時および腸炎時の大腸における IL-12 産生 B 細胞の in vivo での発現を検討する。

(2) IL-12 産生 B 細胞の表面抗原

腸炎時の大腸 IL-12 産生 B 細胞の表面抗原を検討する。

(3) IL-12 産生 B 細胞の抗体産生能

腸炎時の大腸 IL-12 産生 B 細胞の抗体産生能を検討する。

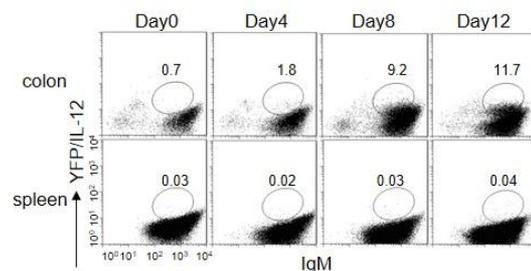
(4) B 細胞の IL-12 産生の分子メカニズム

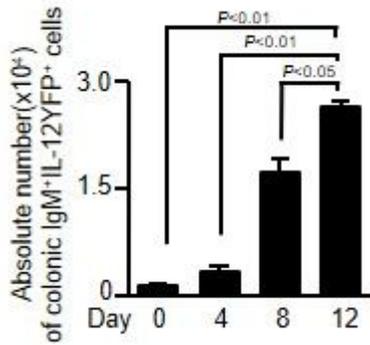
大腸 B 細胞が IL-12 を産生する分子メカニズムを *in vitro* で検討する。

4. 研究成果

(1) IL-12 産生 B 細胞 (in vivo)

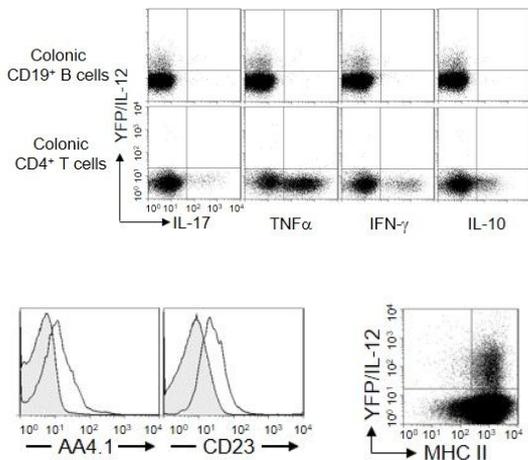
IL-12/YFP マウスを用いて検討した。4%DSS を 4 日間投与し、その後通常水を 4 日間投与し、大腸組織を採取する。大腸組織の B 細胞を単離し、Flow cytometry で IL-12 産生 B 細胞の割合を経時的に検討した。また、組織特異性を検討するために、脾臓の B 細胞を単離し、同様に Flow cytometry で IL-12 産生 B 細胞の割合を検討した。大腸における IL-12 産生 B 細胞は、腸炎の recovery phase に増加していた。それに対して脾臓では IL-12 産生 B 細胞はほとんど確認できなかった。





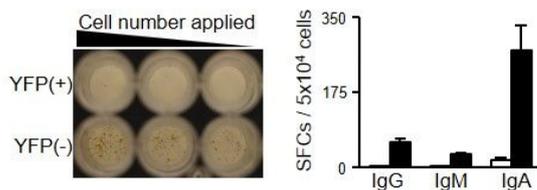
(2) IL-12 産生 B 細胞の表面抗原

大腸における IL-12 産生 B 細胞の表面マーカーを検討するために DSS 腸炎 recovery phase で大腸から IL-12 産生 B 細胞を単離し、flow cytometry で表面マーカーを検討した。大腸の粘膜下層には、IL-17、TNF- α 、IFN- γ 、あるいは IL-10 を産生する B 細胞は確認されず、IL-12 産生 B 細胞が確認された。その表面マーカーとしては、AA4.1 および CD23、MHC II 陽性となった。



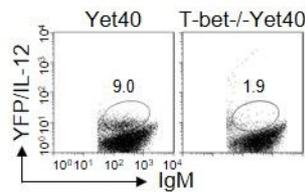
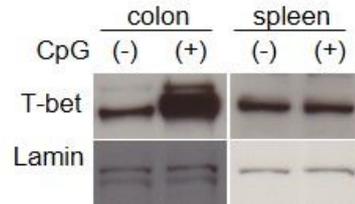
(3) IL-12 産生 B 細胞の抗体産生能

IL-12 産生 B 細胞が抗体産生能を有するかどうかを ELISPOT assay を用いて検討した。大腸より IL-12 産生 B 細胞を Flow cytometry を利用して単離し、ELISPOT assay を行った。IL-12 産生 B 細胞は、他の B 細胞と異なり、抗体産生能を有していなかった。



(4) B 細胞の IL-12 産生の分子メカニズム

これまでの invitro の検討から、IL-12 産生 B 細胞の誘導には、TLR9 ligand である CpG 刺激が必要であることが判明している。CpG の下流のシグナルを western blot 法で検討した。CpG 刺激にて、T-bet の誘導がされ、それによって B 細胞からの IL-12 産生が誘導させることが確認された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 22 件)

1. Murata M, Bamba S, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Inatomi O, Tsujikawa T, Kushima R, Sugimoto M, Andoh A. Application of novel magnified single balloon enteroscopy for a patient with Cronkhite-Canada syndrome. *World J Gastroenterol.* 2017, 23(22):4121-4126. doi: 10.3748/wjg.v23.i22.4121.
2. Bamba S, Sasaki M, Takaoka A, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Inatomi O, Sugimoto M, Andoh A. Sarcopenia is a predictive factor for intestinal resection in admitted patients with Crohn's disease. *PLoS One.* 2017, 12(6):e0180036. doi: 10.1371/journal.pone.0180036.
3. Nishida A, Inatomi O, Fujimoto T, Imaeda H, Tani M, Andoh A. Interleukin-36 Induces Inflammatory Mediators From Human Pancreatic Myofibroblasts Via a MyD88 Dependent Pathway. *Pancreas.* 2017, 46(4):539-548. doi: 10.1097/MPA.0000000000000765.
4. Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. Efficacy and safety of single fecal microbiota transplantation for Japanese

- patients with mild to moderately active ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 2017, 52(4):476-482. doi: 10.1007/s00535-016-1271-4.
5. Asada A, Bamba S, Morita Y, Takahashi K, Imaeda H, **Nishida A**, Inatomi O, Sugimoto M, Sasaki M, Andoh A. The effect of CYP3A5 genetic polymorphisms on adverse events in patients with ulcerative colitis treated with tacrolimus. *Dig Liver Dis*. 2017, 49(1):24-28. doi: 10.1016/j.dld.2016.09.008.
6. Takahashi K, **Nishida A**, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*. 2016, 93(1):59-65. doi: 10.1159/000441768.
7. Morita Y, Imaeda H, **Nishida A**, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Tsujikawa T, Sugimoto M, Andoh A. Association between serum adalimumab concentrations and endoscopic disease activity in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016, 31(11):1831-1836. doi: 10.1111/jgh.13400.
8. Hirayama H, **Nishida A**, Shintani S, Osaki R, Sonoda A, Inatomi O, Bamba S, Kitamura N, Sonoda H, Sugimoto M, Shimizu T, Tani M, Andoh A. A case of a retrocecal hernia successfully diagnosed prior to surgical treatment. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2016, 113(9):1594-9. doi: 10.11405/nisshoshi.113.1594.
9. Ban H, Bamba S, **Nishida A**, Inatomi O, Shioya M, Takahashi KI, Imaeda H, Murata M, Sasaki M, Tsujikawa T, Andoh A. Prognostic factors affecting early colectomy in patients with moderate to severe ulcerative colitis treated with calcineurin inhibitors. *Exp Ther Med*. 2016, 12(2):829-834. doi:10.3892/etm.2016.3341
10. Otsuka T, Sugimoto M, Inoue R, Ohno M, Ban H, **Nishida A**, Inatomi O, Takahashi S, Naito Y, Andoh A. Influence of potassium-competitive acid blocker on the gut microbiome of *Helicobacter pylori*-negative healthy individuals. *Gut*. 2016, 66(9): 1723-1725. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313312.
11. Morita Y, Bamba S, Takahashi K, Imaeda H, **Nishida A**, Inatomi O, Sasaki M, Tsujikawa T, Sugimoto M, Andoh A. Prediction of clinical and endoscopic responses to anti-tumor necrosis factor- antibodies in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2016, 51(8):934-41. doi: 10.3109/00365521.2016.1144781.
12. Andoh A, **Nishida A**, Takahashi K, Inatomi O, Imaeda H, Bamba S, Kito K, Sugimoto M, Kobayashi T. Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *J Clin Biochem Nutr*. 2016, 59(1):65-70. doi: 10.3164/jcbtn.15-152.
13. Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, **Nishida A**, Shioya M, Inatomi O, Bamba S, Shiomi H, Tani M, Andoh A. Eotaxin-3 (CCL26) Expression in Human Pancreatic Myofibroblasts. *Pancreas*. 2016, 45(3):420-4. doi: 10.1097/MPA.0000000000000480.
14. Kanda T, **Nishida A**, Ohno M, Imaeda H, Shimada T, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. Enterococcus durans TN-3 Induces Regulatory T Cells and Suppresses the Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Experimental Colitis. *PLoS One*. 2016, 11(7): e0159705. doi: 10.1371/journal.pone.0159705.
15. **Nishida A**, Hidaka K, Kanda T, Imaeda H, Shioya M, Inatomi O, Bamba S, Kitoh K, Sugimoto M, Andoh A. Increased Expression of Interleukin-36, a Member of the Interleukin-1 Cytokine Family, in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016, 22(2):303-14. doi: 10.1097/MIB.0000000000000654.
16. Asada A, **Nishida A**, Shioya M, Imaeda H, Inatomi O, Bamba S, Kito K, Sugimoto M, Andoh A. NUDT15 R139C-related thiopurine leukocytopenia is mediated by 6-thioguanine nucleotide-independent mechanism in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2016, 51(1):22-9. doi: 10.1007/s00535-015-1142-4
17. Takahashi K, **Nishida A**, Shioya M, Imaeda H, Bamba S, Inatomi O, Shimizu T, Kitoh K, Andoh A. Interleukin (IL)-1 Is a Strong Inducer of IL-36 Expression in Human Colonic Myofibroblasts. *PLoS One*. 2015, 10(11): e0138423. doi: 10.1371/journal.pone.0138423.
18. Kanda T, **Nishida A**, Takahashi K, Hidaka K, Imaeda H, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. Interleukin(IL)-36 and IL-36 Induce Proinflammatory Mediators from Human Colonic

- Subepithelial Myofibroblasts. *Front Med (Lausanne)*. 2015, 2:69. doi: 10.3389/fmed.2015.00069.
19. Tsujikawa T, Bamba S, Inatomi O, Hasegawa H, Ban H, **Nishida A**, Imaeda H, Itoh A, Saotome T, Sasaki M, Andoh A. Factors affecting pancreatic hyperamylasemia in patients undergoing peroral single-balloon enteroscopy. *Dig Endosc*. 2015, 27(6):674-8. doi: 10.1111/den.12449.
20. Bamba S, Hirota S, Inatomi O, Ban H, Nishimura T, Shioya M, Imaeda H, **Nishida A**, Sasaki M, Murata S, Andoh A. Familial and multiple gastrointestinal stromal tumors with fair response to a half-dose of imatinib. *Intern Med*. 2015, 54(7):759-64. doi: 10.2169/internalmedicine.54.3585.
21. Takahashi K, Fujimoto T, Shioya M, **Nishida A**, Bamba S, Inatomi O, Imaeda H, Kitoh K, Andoh A. A case of Crohn's disease that developed anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies. *Clin J Gastroenterol*. 2015, 8(2):88-91. doi: 10.1007/s12328-015-0558-y.
22. **Nishida A**, Lau CW, Mizoguchi A. Examination of the role of galectins in intestinal inflammation. *Methods Mol Biol*. 2015, 1207: 231-48. doi: 10.1007/978-1-4939-1396-1_15.

〔学会発表〕(計 17 件)

2017年

1. **西田淳史**、慢性膵炎の病態における炎症性サイトカインInterleukin 36 の関与についての検討、ワークショップ2、第48回日本膵臓学会大会、2017. 京都、京都国際会館
2. **Nishida A.**, Expression of Human Cathelicidin Peptide LL-37 in Inflammatory Bowel disease, Poster presentation, The 5th annual meeting of Asian organization for Chron's and Colitis, 2017. 韓国、ソウル
3. **西田淳史**、潰瘍性大腸炎に対する糞便移植法の効果と有効性の検討、シンポジウム、第17回日本抗加齢医学会総会、2017. 東京、東京国際フォーラム
4. **Nishida A.**, Poly(I:C) Regulates the Intestinal Barrier Function by the Induction of Antimicrobial Peptide, LL-37 from Human Colonic Myofibroblats, Poster, Digestive Disease Week, 2017. USA, Chicago
5. **Nishida A.**, Efficacy and safety of single fecal microbiota transplantation for Japanese patients with mild to

moderately active ulcerative colitis. Poster, Digestive Disease Week, 2017. USA, Chicago

6. **Nishida A.**, NUDT15 R139C-related thiopurine leukocytopenia is mediated by 6-thioguanine nucleotide-independent mechanism in Japanese patients with inflammatory bowel disease. Poster, Digestive Disease Week, 2017. USA, Chicago
7. **西野 恭平**、**西田淳史**、内視鏡下に採取した腸管粘液を用いた炎症性腸疾患の腸内細菌叢の検討。ワークショップ、第93回日本消化器内視鏡学会総会、2017、大阪、大阪国際会議場
8. **西田淳史**、NUDT15遺伝子多型を用いた炎症性腸疾患個別化治療の試み。ワークショップ、第13回日本消化管学会総会、2017. 名古屋、名古屋国際会議場
9. **西田淳史**、潰瘍性大腸炎に対する糞便移植法の効果の検討。オーラルセッション、第13回日本消化管学会総会、2017. 名古屋、名古屋国際会議場
10. **西田淳史**、軽症～中等症潰瘍性大腸炎に対する糞便移植法の安全性および効果の検討。ワークショップ、第103回日本消化器病学会総会、2017. 東京、京王プラザホテル 2016年
1. **西田淳史**、炎症性腸疾患の病態形成におけるInterleukin36の役割。オーラルセッション、第7回日本炎症性腸疾患学会学術集会、2016. 京都、京都
2. **西田淳史**、チオプリン誘発性白血球減少とNUDT15遺伝子多型との関連についての検討。第7回日本炎症性腸疾患学会学術集会、2016. 京都、国立京都国際会館
3. **Nishida A.**, NUDT15 R139C-related thiopurine leukocytopenia is mediated by 6-thioguanine nucleotide-independent mechanism in Japanese patients with inflammatory bowel disease, Poster oral, The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis, 2016、京都、京都国際会館
4. **西田淳史**、チオプリン関連遺伝子多型に基づく炎症性腸疾患の個別化治療の可能性をさぐる、シンポジウム、第102回日本消化器病学会総会、2016. 東京、京王プラザホテル 2015年
1. **西田淳史**、**神田暁博**、**高橋憲一郎**、**今枝広丞**、**馬場重樹**、**安藤 朗** Dextran sodium sulfate (DSS) 腸炎モデルに対するEnterococcus durans (E.durans)の効果についての検討 第1回 Gut Microbiota研究会 (日本消化器病学会附置研究会)、2015年、仙台、仙台国際会議場

2. Nishida A., H.Imaeda, A.Andoh
The role of interleukin 36, a novel IL-1 family cytokine, in inflammatory bowel disease Digestive Disease Week 2015 (Washington, DC), 2015
3. Nishida A., T.Kanda, H.Imaeda, A.Andoh Heat-Treated Enterococcus durans (E.durans) Ameliorates Acute Experimental Colitis ACG2015 Annual Scientific Meeting & Postgraduate Course (Honolulu, Hawaii) 2015

〔図書〕(計19件)

2017年

1. 安藤 朗, 西田 淳史, 井上 亮:新興医学出版社、Modern Physician、2018、Page167-171。
2. 安藤 朗, 西田 淳史, 井上 亮:臨床医学出版、Intestine、2017、Page351-357。
3. 西田 淳史, 安藤 朗:医師薬出版株式会社、医学のあゆみ、2017、Page1115-1116
4. 西田 淳史, 安藤 朗:メディカルビュー社、Mebio、2017、Page50-58

2016年

1. 西田 淳史, 安藤 朗:ライフサイエンス社、Progress in Medicine、2017、Page657-661
2. 安藤 朗, 西田 淳史, 今枝 広丞, 馬場重樹, 杉本 光繁:最新医学社、最新医学、2016、Page1843-1849
3. 西田 淳史, 安藤 朗:臨床医学出版、Intestine、2016、Page372-379
4. 西田 淳史, 安藤 朗:メディカルビュー社、The GI Forefront、2016、Page40-44
5. 西田 淳史, 安藤 朗:インフォノーツパブリッシング、機能性食品と薬理栄養、2016、Page408-413
6. 西田 淳史, 安藤 朗:先端医学社、IBD Research、2016、Page22-28
7. 西田 淳史, 安藤 朗:Medical Practice、2016、Page773-776
8. 西田 淳史, 安藤 朗:光文堂、診断と治療、2016、Page203-207
9. 西田 淳史, 安藤 朗:先端医学社、G.I.Research、2016、Page9-14
10. 西田 淳史, 安藤 朗:中外医学社、Annual Review 消化器、2016、Page33-40

2015年

1. 西田 淳史, 安藤 朗:先端医学社、IBD Research、2015、Page292-295
2. 西田 淳史, 安藤 朗:南江堂、内科、2015、Page553-557
3. 西田 淳史, 安藤 朗:先端医学社、分子消化器病、2015、Page129-134
4. 西田 淳史, 長谷川 大, 安藤 朗, 藤山佳秀:臨床医学出版、臨床消化器内科、

2015、Page429-434

5. 西田 淳史, 安藤 朗:インフォノーツパブリッシング、機能性食品と薬理栄養、2015、Page505-512

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
西田 淳史(NISHIDA, Atsushi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号:90719915