

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10075

研究課題名(和文) 小児炎症性腸疾患におけるガレクチン9の免疫調節機能とその治療戦略

研究課題名(英文) Galectin-9 in Intestinal Mucosa of Pediatric Inflammatory Bowel Disease.

研究代表者

工藤 孝広 (Kudo, Takahiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90365601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：初発の炎症性腸疾患患児22例(Crohn病：CD 10例、潰瘍性大腸炎：UC 12例)と正常対照延べ24例の大腸内視鏡検査中に、CDでは回腸末端、UCではS状結腸、正常対照では両部位の粘膜を生検採取した。real time-PCRにて、ガレクチン9の発現を解析し、正常対照群と比較してCDでは有意に高値であった($p=0.009$)が、UCでは有意差はなかった($p=0.244$)。免疫組織染色ではガレクチン9陽性細胞はCDにおいて粘膜下層に多く存在し、UCと正常対照群では多くなかった。ガレクチン9と結合するTim3は各群で差はなかった。単核球細胞培養については実施したものの良好な結果を得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガレクチン9の小児炎症性腸疾患における動向を把握できた。炎症におけるガレクチン9の動向を把握することで、難病指定疾患である炎症性腸疾患の治療の1つの選択肢になる可能性があると考えた。また、他の炎症性疾患である自己免疫疾患や膠原病の炎症抑制の治療への応用も期待できると考えられた。さらには、ガレクチン9をコントロールすることで腫瘍細胞の増殖抑制から、癌の撲滅に寄与する可能性があると考えた。

研究成果の概要(英文)：Twenty-two pediatric patients with first attack inflammatory bowel disease (Crohn's disease (CD);10, ulcerative colitis (UC);12) and 24 normal control patients were enrolled in this study. The terminal ileum mucosa or the sigmoid colon mucosa were taken under ileo-colonoscopy.

In the results, galectin-9 (Gal-9) expression in CD mucosa was significantly increased compared with normal mucosa ($p=0.009$), but no difference in UC mucosa ($p=0.244$). Immunohistochemical staining revealed that galectin-9-positive cells were increased in the submucosa of CD and not increased in that of UC and the normal control group. Regarding Tim3 that binds to Gal-9, no difference was observed as compared with the CD, UC, and normal control group. Although it was carried out for mononuclear cell culture, No results were obtained.

Our results suggest that elevated Gal-9 expression in CD terminal ileum mucosa may reflect inhibits expansion of effector Th1 cells to prevent further tissue inflammation.

研究分野：小児消化器疾患

キーワード：炎症性腸疾患 Crohn病 ガレクチン9 粘膜免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は、腸管に慢性炎症をきたし再燃寛解を繰り返す慢性炎症性の消化管疾患である。近年、IBD 発症の原因として、食餌抗原や腸内細菌叢との免疫応答の関与が報告されているが、不明な点も多く存在する。Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、調節性 T 細胞などの獲得免疫と、腸内細菌叢や食餌抗原への初期免疫反応を行う樹状細胞 (DC) やマクロファージなどの抗原提示細胞をはじめとする自然免疫の両者が複雑に絡み合って IBD の発症に関与していると報告されている。また、小児期発症の IBD は、腸管罹患範囲が広く、重症度が高いとの報告もあり、成人との発症機構の違いや、免疫異常の疾患の関与も示唆されている。一方、ガレクチンは糖を認識するドメインを持つ蛋白であるレクチンの一種で哺乳類では 15 種類のガレクチンが判明しており、ガレクチンが免疫調節活性や炎症誘発活性を有し、マクロファージや好中球などの自然免疫系細胞と T 細胞などの獲得免疫細胞の両者に関与している蛋白であることが報告されており、ガレクチン 9 と IBD の関連では、ガレクチン 9 が過剰炎症を抑制することが報告された 2 編のみであり詳細な検討はなされていない。

2. 研究の目的

小児炎症性腸疾患におけるガレクチン 9 についての報告はなく、小児 IBD におけるガレクチン 9 の関与は不明である。これまでの当科における IBD の炎症粘膜におけるガレクチン 9 の発現は Crohn 病において有意に高かった。ガレクチン 9 は前述のように過剰炎症を抑制する作用が示唆されるため、小児 IBD の炎症粘膜におけるガレクチン 9 の作用と、その治療効果について免疫染色と細胞培養を用いて解析し、炎症調節作用があること、治療効果について検討した。

3. 研究の方法

小児 IBD (潰瘍性大腸炎、Crohn 病) 患児と健康小児の内視鏡的生検組織 (大腸病変部粘膜、パイエル板粘膜) を採取する。採取した粘膜生検のガレクチン 9 と TIM-3 の局在を免疫染色を行い蛋白発現の相違を確認した。採取した粘膜をそれぞれ単核球まで分離し、無添加、ガレクチン 9 を添加したもの、抗ガレクチン 9 抗体を添加したもの、陽性対照として PHA 添加の計 6 条件を設定、4 8 時間の細胞培養を行った。その後の上清中の炎症性サイトカインである IL-6、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、調節性サイトカインである IL-10、TGF- β などのサイトカインを ELISA を用いて測定する。細胞培養中の血球成分中の転写因子としての Th1 細胞は T-bet、Th17 細胞は ROR γ t、調節性 T 細胞は Foxp3 などのシグナル分子の発現を real-time PCR を用いてそれぞれ解析した。ガレクチン 9、TIM-3 の組織局所の発現、上清中のサイトカイン濃度、培養血球中サイトカイン転写因子が関連しているか、それがガレクチン 9 添加や阻害でどのように変化するかなどを各条件で比較した。

4. 研究成果

対象は初発炎症性腸疾患患児 22 例 (Crohn 病: CD 10 例、潰瘍性大腸炎: UC 12 例、図 1) と正常対照延べ 24 例。大腸内視鏡検査中に、CD では回腸末端、UC では S 状結腸、正常対照では両部位の粘膜を生検採取した。

real time-PCR

粘膜から cDNA を抽出し、real time-PCR にて、ガレクチン 9、GAPDH の発現を比較検討した。ガレクチン 9 の発現は、正常対照群と比較して CD において有意に高値を示した ($p=0.0096$) が、UC において有意差はなかった ($p=0.244$) (図 2)。

免疫組織染色

免疫誌組織染色では、ガレクチン 9 陽性細胞は CD において粘膜下層に多く存在し、UC と正常対照群では多くなかった (図 3)。ガレクチン 9 と結合する Tim3 については、CD、UC、正常対照群と比較し差は認めなかった (図 4)。

細胞培養

単核球細胞培養については実施したものの良好な結果は出なかった。

	Crohn病	潰瘍性大腸炎	正常対照
症例数	10	12	15(延べ24)
平均年齢	12歳5か月 6歳0か月-15歳0か月	12歳4か月 7歳6か月-15歳1か月	12歳2か月 6歳11か月-15歳6か月
男/女比	5 / 5	5 / 7	11 / 4
病型	小腸大腸型 8例 大腸型 2例 小腸型 0例	全大腸炎型 9例 左側大腸炎型 3例 直腸炎型 0例	過敏性腸症候群 12例 若年性ポリープ 1例 裂肛 1例 直腸粘膜脱症候群 1例
重症度	IOIBD 3.1±1.85 PCDAI 30.5±9.63	PUCAI 52.5±17.65	

図 1 患者詳細

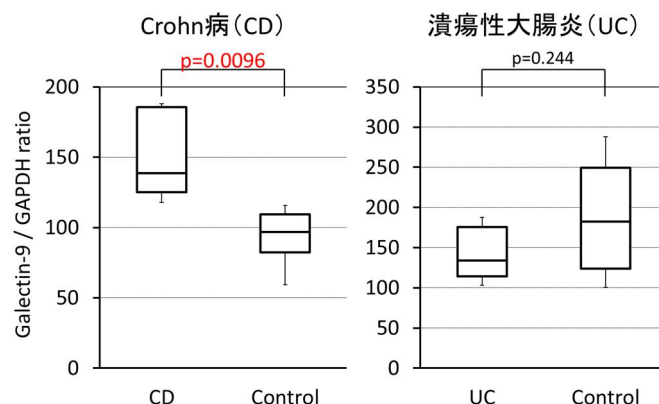


図 2 Galectin-9 の発現

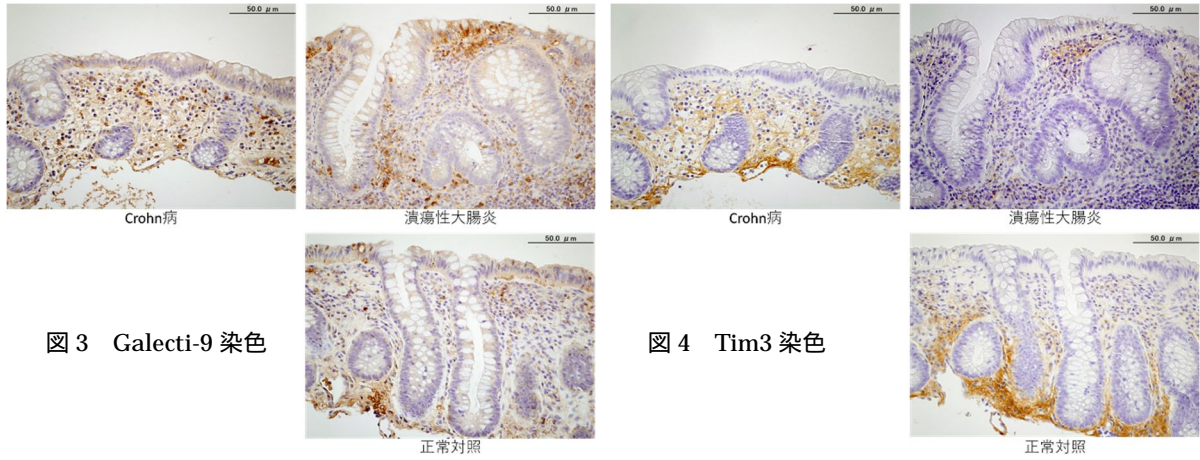


図3 Galectin-9 染色

図4 Tim3 染色

ガレクチン9は、Tim3を介して過剰なTh1細胞や好酸球を抑制しており、炎症抑制に関わる蛋白であることが報告されている。CDの回腸末端粘膜においてガレクチン9の発現が有意に高値であり、炎症が惹起されている局所粘膜においてガレクチン9がさらなる炎症の波及を抑制している可能性が考えられ、ガレクチン9がCDの活動性を抑制することにより、CDの病態に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 KENJI HOSOI, TAKAHIRO KUDO, KEISUKE JIMBO, NAHO OBAYSHI, YO AOYAGI, TOHRU FUJII, YOSHIKAZU OHTSUKA, TOSHIAKI SHIMIZU
2. 発表標題 Galectin-9 is Overexpressed in the Intestinal Mucosa of Pediatric Crohn ' s Disease
3. 学会等名 AOCC 2015
4. 発表年 2016年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----