

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19150

研究課題名(和文) クローン病腸管線維化治療を目的としたHSP47の線維化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the fibrotic mechanism of HSP47 for the treatment of intestinal fibrosis in Crohn's disease

研究代表者

本澤 有介 (HONZAWA, Yusuke)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：90737884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病(CD)腸管線維化において、Heat shock protein(HSP)47に着目し、そのメカニズムについて検討を行った。結果、ヒト腸管筋線維芽細胞株(CCD-18Co)では以前報告したIL-17A以外にIL-1によるHSP47の発現亢進を認めた。IL-1発現誘導にはインフラマゾームが関与しているとされ、実際にMediterranean fever(MEFV)遺伝子変異を有するCD患者の末梢血単核細胞の検討ではインフラマゾームの活性化及びIL-1の誘導が確認された。このことからCDの腸管の複数のサイトカイン環境がHSP47を介した腸管線維化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病(CD)腸管炎症では、免疫学的な観点から多くの研究が行われ、各種薬剤も登場している。その一方で、患者QOLに影響する腸管線維化の機序解明は未だ十分ではなく、治療薬も存在しない。この為、腸管線維化メカニズムの解析は将来的な治療の可能性を有している。今までのところ線維化疾患に関与するとされているHSP47はCD腸管線維化に関与し、その発現にはIL-17A以外にもIL-1といった炎症性サイトカインも関与している可能性があり、それら制御に基づく治療の可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on heat shock protein (HSP) 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease, and examined its mechanism with human samples. As a result, IL-1 enhanced HSP47 expression in the human intestinal myofibroblast cell line (CCD-18Co) in addition to IL-17A. It is believed that IL-1 expression was induced via inflammasome which was multimeric protein complex. In this study, in the examination of peripheral blood mononuclear cells of CD patients with the Mediterranean fever (MEFV) gene mutation, we confirmed inflammasome activation and induction of IL-1. This result suggested that multiple cytokine environments such as IL-1 and IL-17A in the intestinal tract of CD patients might be involved in HSP47-mediated intestinal fibrosis.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患 クローン病 heat shock protein 47 腸管線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病 (CD) は腸管特異的に炎症が生じ、生涯治療の継続が必要な難治性疾患である。その原因については未だ解明されておらず、その根本的治療は確立されていない。CD は 10 年間で 70.8% の患者が手術が必要になるとされ、その半数以上の症例が腸管線維化に伴う狭窄が原因とされている。これにより、CD 患者は外科的腸管切除を余儀なくされ、患者 QOL を著しく損なっている。従って、CD における腸管線維化の機序解明は新規抗線維化治療の開発における重要な課題となっている。

現在まで腸管線維化に関わるサイトカインとして TGF- β 1 が注目され、同サイトカインによる腸管局所制御が線維化抑制につながるとされてきた。しかしながら、TGF- β 1 は強い抗炎症作用を有し、加えて上皮細胞の再構成にも関与する事から、腸管炎症の抑制ならびに上皮再生には必須の分子である。これらの点を踏まえ、CD における腸管抗線維化治療には TGF- β 1 以外の分子の制御が重要であると考えてきた。HSP47 は小胞体に局在するストレス蛋白質であり、各種コラーゲンに対する基質特異性を有し、その発現は常にコラーゲン産生細胞に認められ、コラーゲンの発現と共役している。HSP47 をノックアウトしたマウスでは、コラーゲン線維がほぼ消失し、基底膜は分断される。近年、コラーゲンの蓄積を特徴とする各種線維化疾患では HSP47 が極めて強く誘導される事やマウスを用いた検討では HSP47 の制御によって線維化が抑制されるとの報告が多数なされている。従って、腸管における HSP47 の発現制御は、腸管線維化治療における極めて重要な治療戦略の 1 つであると考えられる。

2. 研究の目的

コラーゲン産生に必須の分子である heat shock protein (HSP) 47 に着目し、腸管局所の HSP47 発現機構の解明、及び HSP47siRNA 局所制御による腸管抗線維化療法の開発を目指す。これにより、炎症性腸疾患 (IBD) 患者、特に CD 患者における腸管線維化の機序の解明及び新たな抗線維化療法の開発に貢献する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス及びヒト線維芽細胞における HSP47 の関与の検討:

マウス線維芽細胞株 (NIH3T3) 及びヒト筋線維芽細胞株 (CCD-18Co) に炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A) 刺激を行い HSP47 の発現を遺伝子 (real-time PCR 法) 及び蛋白 (western blotting 法) にて確認した。さらに HSP47shRNA を作成し、その効果も検討した。

(2) IL-1 と CD との関連についての検討:

IL-1 発現にインフラマゾームと呼ばれる蛋白複合体が関与しているとされている事から CD 患者より peripheral-blood mononuclear cell (PBMC) を単理・培養し、ATP/LPS 刺激にてインフラマゾームの活性化及び IL-1 の発現が亢進されるかを蛋白 (western blotting 法及び ELISA 法) にて確認した。

(3) CD 患者と Mediterranean fever (MEFV) 遺伝子変異との関連の検討:

患者末梢血リンパ球より DNA を抽出し、次世代シーケンサーにて MEFV 遺伝子変異の有無について解析し、背景因子との関連や健常人との変異割合を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス及びヒト線維芽細胞における HSP47 の関与の検討:

マウス線維芽細胞株 (NIH3T3) 及びヒト筋線維芽細胞株 (CCD-18Co) に炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A) による刺激を行ったところ、既に報告している IL-17A 以外に IL-1 刺激にて HSP47 及びコラーゲンの発現亢進を遺伝子 (mRNA)、蛋白にて確認した。また、IL-1 刺激では TNF- α や IL-17A との共刺激にて HSP47 及びコラーゲンの発現がより増強された。さらに HSP47 の制御に関しては HSP47shRNA を作成し、それぞれの細胞株において HSP47 をノックダウンする事でコラーゲンの発現が抑制される事が蛋白にて確認された。

(2) IL-1 と CD との関連についての検討:

CD 患者の PBMC の検討ではインフラマゾームの活性化及び IL-1 の誘導が確認された。

(3) CD 患者と MEFV 遺伝子変異との関連の検討:

MEFV 遺伝子の変異の割合は CD 患者と健常人に有意な差は認めなかった。しかしながら、CD 患者間で変異の有する群及び変異のない群との比較検討では CD 腸管狭窄症例において同遺伝子の変異を有する症例が有意に多かった。同変異を有する CD 患者と変異のない CD 患者の血清中 IL-1 濃度を計測し、変異を有する症例では有意に IL-1 の発現上昇を認めた。

CD では IL-17A 及び TNF- α が病態形成に重要とされており、CD 腸管狭窄症例ではこのインフラマゾームを介した IL-1 が、他の炎症性サイトカインと合わせて HSP47 発現に寄与し、CD 腸管線維化を伴う腸管狭窄形成に関与している可能性が示唆された。また、今後の IL-1 を介した経路及び HSP47 そのものの制御による CD 腸管線維化治療の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Hiejima E, Yasumi T, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Higuchi H, Okafuji I, Yorifuji

T, Tanaka T, Izawa K, Kawai T, Nishikomori R, Heike T. Tricho-hepato-enteric syndrome with novel SKIV2L gene mutations: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 査読有 2017; 96: e8601. doi: 10.1097/MD.00000000000008601.

Minami N, Matsuura M, Koshikawa Y, Yamada S, Honzawa Y, Yamamoto S, Nakase H. Maternal and fetal outcomes in pregnant Japanese women with inflammatory bowel disease: our experience with a series of 23 cases. *Intest Res*. 査読有 2017; 15: 90-96. doi: 10.5217/ir.2017.15.1.90.

Toyonaga T, Matsuura M, Mori K, Honzawa Y, Minami N, Yamada S, Kobayashi T, Hibi T, Nakase H. Lipocalin 2 prevents intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages. *Sci Rep*. 査読有 2016; 13: 35014. doi: 10.1038/srep35014.

[学会発表](計27件)

山田 聡, 山本 修司, 松浦 稔, 北本 博規, 岡部 誠, 本澤 有介, 妹尾 浩. 活動期潰瘍性大腸炎の大腸粘膜における Epstein-Barr virus 再活性化についての検討. 第9回日本炎症性腸疾患学会学術集会. 京都, 2018.11.22

北本 博規, 松浦 稔, 岡部 誠, 山田 聡, 本澤 有介, 山本 修司, 妹尾 浩. サイトメガロウイルス再活性化を伴った潰瘍性大腸炎患者の内視鏡所見と臨床的背景に関する検討. 第9回日本炎症性腸疾患研究会学術集会. 京都, 2018.11.22

山田 聡, 松浦 稔, 岡部 誠, 北本 博規, 本澤 有介, 山本 修司, 妹尾 浩. 小腸カプセル内視鏡で診断が困難であった上部小腸腫瘍2例についての検討. 第56回日本小腸学会学術集会. 東京, 2018.10.27

Honzawa Y, Matsuura M, Yamamoto S, Okabe M, Kitamoto H, Yamada S, Seno H. Endoscopic findings to predict therapeutic efficacy of anti-TNF agents on patients with ulcerative colitis. The 6th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Shanghai, 2018.6.23

Okabe M, Matsuura M, Kitamoto H, Yamada S, Honzawa Y, Yamamoto S, Seno H. Efficacy and safety of thiopurine and allopurinol cotherapy in thiopurine-naïve Japanese UC patients. The 6th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Shanghai, 2018.6.23

Kitamoto H, Yamamoto S, Honzawa Y, Yamada S, Okabe M, Seno H, Matsuura M. Impact of advance in medical therapies on clinical outcome in patients with ulcerative colitis concomitant cytomegalovirus infection. The 6th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis, Shanghai, 2018.6.23

住永 圭一郎, 本澤 有介, 佐藤 千尋, 井口 恵里子, 西川 義浩, 高橋 健, 上田 佳秀, 松本 繁巳, 武藤 学, 妹尾 浩. アルコール離脱症状を契機に診断に至った肺動脈内膜肉腫の一例. 第115回日本内科学会総会. 京都, 2018.4.14

北本 博規, 松浦 稔, 山本 修司, 岡部 誠, 越川 頼光, 山田 聡, 本澤 有介, 妹尾 浩. CMV感染合併潰瘍性大腸炎の臨床転帰に関する検討. 第8回日本炎症性腸疾患学会学術集会. 東京, 2017.12.1

岡部 誠, 山本 修司, 本澤 有介, 松浦 稔, 妹尾 浩. 消化管GVHD診断における内視鏡所見の特徴に関する検討. 第99回日本消化器内視鏡学会近畿支部例会. 京都, 2017.11.18

本澤 有介, 山本 修司, 松浦 稔, 妹尾 浩. クロウン病腸管狭窄における内視鏡拡張術と免疫調節療法の併用による長期予後の検討. 第55回日本小腸学会. 京都. 2017.10.21

Honzawa Y, Matsuura M, Yamamoto S, Yamada S, Koshikawa Y, Okabe M, Kitamoto H, Seno H. Long-term outcome of patients with ulcerative colitis after initial tacrolimus rescue therapy. The 5th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Seoul, 2017.6.17

Okabe M, Matsuura M, Yamamoto S, Honzawa Y, Koshikawa Y, Yamada S, Kitamoto H, Seno H. Early induction of immunosuppressive agents prior to endoscopic balloon dilatation contributes to avoidance of surgery in patients with Crohn's disease. The 5th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis, Seoul, 2017.6.17

北本 博規, 本澤 有介, 山本 修司, 松浦 稔, 妹尾 浩. 腸管局所サイトメガロウイルス感染を伴った潰瘍性大腸炎における大腸内視鏡所見とその臨床転帰との関連性に関する検討. 第98回日本消化器内視鏡学会近畿支部例会. 大阪, 2017.6.17

岡部 誠, 松浦 稔, 本澤 有介, 妹尾 浩. 当院における原発性硬化性胆管炎合併潰瘍性大腸炎関連大腸癌の臨床的特徴についての検討. 第106回日本消化器病学会近畿支部例会. 大阪, 2017.2.25

岡部 誠, 松浦 稔, 本澤 有介, 山本 修司, 妹尾 浩. 当院における潰瘍性大腸炎関連大腸癌の内視鏡サーベイランスに関する検討. 第97回日本消化器内視鏡学会近畿支部例会. 京都, 2016.11.26

本澤 有介, 松浦 稔, 妹尾 浩. タクロリムス救済療法 (Tacrolimus rescue therapy) が難治性潰瘍性大腸炎の長期経過に与える影響. 第58回日本消化器病学会大会 (第24回日本消化器病関連学会週間). 神戸, 2016.11.4

Yamada S, Matsuura M, Honzawa Y, Okabe M, Minami N, Koshikawa Y, Yamamoto S, Seno H. Differential distribution of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus expression in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. Asian Pacific Digestive Week 2016. Kobe, 2016.11.3

Minami N, Matsuura M, Yamamoto S, Honzawa Y, Yamada S, Koshikawa Y, Seno H, Nakase H, Horiuchi H. Ral activation exacerbates colonic inflammation through the impairment of intestinal barrier function in experimental murine colitis. Asian Pacific Digestive Week 2016. Kobe, 2016.11.3

Koshikawa Y, Matsuura M, Honzawa Y, Minami N, Yamamoto S, Seno H, Nakase H. The characteristics and clinical outcomes of ulcerative colitis patients with concomitant cytomegalovirus infection. Asian Pacific Digestive Week 2016. Kobe, 2016. 11. 3

山本 修司, 松浦 稔, 本澤 有介, 妹尾 浩. 重症潰瘍性大腸炎に対する Rescue 療法としての infliximab および Tacrolimus の治療最適化. 第 105 回日本消化器病近畿支部例会. 大阪, 2016.9.17

⑳山田 聡, 松浦 稔, 本澤 有介, 山本 修司, 南 尚希, 越川 頼光, 妹尾 浩. 寛解期クローン病におけるビタミン K 不足と腸内細菌叢の関連性についての検討. 第 53 回 日本消化器免疫学会総会. 大阪, 2016.7.15

㉑本澤 有介, 松浦 稔, 妹尾 浩. タクロリムス救済療法 (Tacrolimus rescue therapy) が難治性潰瘍性大腸炎の長期経過に与える影響. 第 7 回 日本炎症性腸疾患学会学術集会. 京都, 2016.7.10

㉒Honzawa Y, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Koshikawa Y, Seno H. Clinical impact of Tacrolimus rescue therapy for refractory ulcerative colitis. The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis. Kyoto, 2016.7.9

㉓Koshikawa Y, Matsuura M, Honzawa Y, Minami N, Yamada S, Seno H. A case report of inflammatory bowel disease-like colitis successfully treated with infliximab in a patient with common variable immunodeficiency. The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis. Kyoto, 2016.7.9

㉔南 尚希, 松浦 稔, 本澤 有介, 越川 頼光, 山田 聡, 妹尾 浩. 当院で経験した炎症性腸疾患合併妊娠 23 例の臨床的検討. 第 7 回 日本炎症性腸疾患学会学術集会. 京都, 2016.7.9

㉕Yamada S, Matsuura M, Honzawa Y, Minami N, Koshikawa Y, Nakase H. Differential distribution of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus expression in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis. Kyoto, 2016.7.8

㉖Minami N, Matsuura M, Honzawa Y, Yamada S, Koshikawa Y, Nakase H, Seno H. Management of Japanese pregnant patients with inflammatory bowel disease from our experienced 23 cases. The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis. Kyoto, 2016.7.8

㉗山田 聡, 松浦 稔, 本澤 有介, 南 尚希, 越川 頼光, 仲瀬 裕志. 潰瘍性大腸炎における Epstein-Barr Virus についての検討. 第 102 回日本消化器病学会総会. 東京, 2016. 4.22 [図書] (計 4 件)

本澤 有介, 松浦 稔, 山本 修司, 妹尾 浩, 仲瀬 裕志. 【小腸の炎症性病変を見直す】 炎症性腸疾患における MEFV 遺伝子変異. 日本メディカルセンター, INTESTINE, 2017

松浦 稔, 本澤 有介, 山本 修司, 仲瀬 裕志. 【潰瘍性大腸炎-明日から使える内科治療のコツと最新情報】 治療 タクロリムスとシクロスポリン. 日本メディカルセンター, INTESTINE, 2016

本澤 有介, 松浦 稔, 仲瀬 裕志. 【循環器疾患が引き起こすフォンウィルブランド症候群】 消化管血管異形成 (angiodysplasia) の病態とその対処法. 北隆館, BIO Clinica, 2016

松浦 稔, 本澤 有介, 仲瀬 裕志. 【IBD 治療の critical point-私ならこうする】 潰瘍性大腸炎 CMV 感染合併の診断と対処法 積極的に診断・治療を行う立場から. 日本メディカルセンター, 臨床消化器内科, 2016

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

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、研究者個人に帰属されます。