

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15747

研究課題名(和文) サイトメガロウイルス感染合併炎症性腸疾患における重症化、難治化機構の解明

研究課題名(英文) Roles of cytomegalovirus in refractory inflammatory bowel disease

研究代表者

山本 修司 (Yamamoto, Shuji)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：00789638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、T細胞受容体 鎖欠失マウスにマウスサイトメガロウイルス (murine cytomegalovirus, murine CMV) を感染させた炎症性腸疾患CMV感染マウスモデルを用いて炎症性腸疾患におけるCMV感染による難治化機構を解析した。その結果、マウスモデルにおいてもヒトと同様にCMV感染により腸炎がステロイド治療に対して難治化することが示された。その機序に関しても、CMV感染により腸管炎症におけるT細胞分化に変化をきたすことが明らかとなった。本研究に用いたマウスモデルにより難治性炎症性腸疾患におけるCMVの役割の更なる解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, IBD) には治療に難渋する重症例、治療抵抗例が存在する。サイトメガロウイルス(cytomegalovirus, CMV) は、IBD、特に潰瘍性大腸炎における重症化、難治化の要因の1つと考えられているが、その機序については明らかでない。本研究では、ヒトIBD患者におけるCMV再活性化例と類似した治療抵抗性を示すCMV感染合併IBDマウスモデルを確立することに成功した。このマウスモデルを使用することでIBDにおける難治化のメカニズムを詳細に検討することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Our objective was to elucidate the roles of cytomegalovirus (CMV) in refractory inflammatory bowel disease (IBD), using T cell receptor knock out mice infected with murine CMV.

We found 1) the mouse model we used replicated phenotypes of human refractory IBD with CMV reactivation and 2) the infection of murine CMV altered Th2 dominant T cell differentiation in the inflamed colonic mucosa toward Th1/17 dominant one in T cell receptor knock out mice. Our mouse model could be useful for further elucidation of the mechanism by which CMV infection influences the response to medical therapies in patients with IBD.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 サイトメガロウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1)炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) は腸管の慢性炎症を特徴とする原因不明の難治性疾患である。その患者数は若年者を中心に急激に増加しているが、原因は未だ不明で、根本的治療は確立されていない。近年、IBD に対する新規治療薬が次々に開発され、内科的治療で病状のコントロールが可能な症例も増加している。しかし、依然として内科的治療に反応せず外科的治療を要する重症例、難治例が数多く存在する。

(2)IBD 重症化、難治化の要因の 1 つとして考えられているのが、ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV) 感染である。HCMV はヘルペスウイルス科の 2 本鎖 DNA ウィルスで、多くの症例で幼少期に感染し、一旦感染すると終生潜伏感染する。日本では成人の 60-90% で感染を認める。

HCMV は骨髄単球系前駆細胞に潜伏感染する。HCMV が潜伏感染した単球が TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインの刺激で活性化すると、それに伴い HCMV も再活性化する。このため、IBD では、まず腸管の病変部で HCMV の再活性化が惹起されると考えられている。

(3)IBD、特に潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) の重症例・難治例で HCMV 再活性化を認める頻度が高く、HCMV 陽性例は陰性例と比較してステロイド治療反応性が悪いというメタ解析や、HCMV 感染合併 UC では抗ウイルス治療のみで腸炎が改善するとの報告がある。これらの報告から、HCMV の IBD 重症化、難治化への関与が疑われている。

その一方で、HCMV 再活性化例でも、抗ウイルス治療は行わず UC に対する治療のみで HCMV が自然消失するとの報告や、抗ウイルス療法の有無では UC の治療成績が変わらないとの報告もある。つまり、CMV は炎症粘膜で再活性化しているのみで IBD の病状に影響しない“by stander”なのか、IBD を悪化させる“pathogenic”なのかは明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、T 細胞受容体 $\alpha$  鎖欠失 (T cell receptor  $\alpha$  knock out, TCR $\alpha$  KO) マウスにマウスサイトメガロウイルス (murine CMV, MCMV) を感染させた CMV 感染 IBD マウスモデルを用いて IBD における CMV 感染による難治化のメカニズムの解明することである。

## 3. 研究の方法

申請者の所属する研究室では自然腸炎を発症する TCR $\alpha$  KO マウスに MCMV を出生早期に感染させる CMV 感染合併 IBD マウスモデルを確立している (Inflamm Bowel Dis, 2013)。このマウスモデルでは、幼少期に感染させた MCMV は一旦潜伏感染し、腸炎発症に伴い腸管で再活性化するという、ヒトにおける HCMV 感染合併 IBD と極めて類似した経過を示す。MCMV 感染マウスは非感染マウスと比較して有意な腸炎の悪化を認めており (Inflamm Bowel Dis, 2013)、このマウスモデルに治療介入することで、難治性 IBD における CMV 再活性化の役割を検討した。

### (1) MCMV 感染 TCR $\alpha$ KO マウスにおけるステロイド反応性の検討

TCR $\alpha$  KO マウスを、MCMV を感染させない MCMV 非感染群 (MCMV(-)) と、1 週齢で MCMV を感染させる MCMV 感染群 (MCMV(+)) に分け、この 2 群に腸炎発症後の 16 週齢から 2 週間 PBS もしくはデキサメタゾン (dexamethasone, Dex) を腹腔内に隔日投与した。18 週齢で大腸を回収し、病理学的腸炎スコアを MCMV(-) と MCMV(+) で比較検討した。さらに得られた大腸組織から cDNA を作成し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を RT-PCR 法で評価し、MCMV(-) と MCMV(+) で比較検討した。

### (2) MCMV 感染 TCR $\alpha$ KO マウスにおける各種免疫担当細胞におけるステロイド反応性の検討

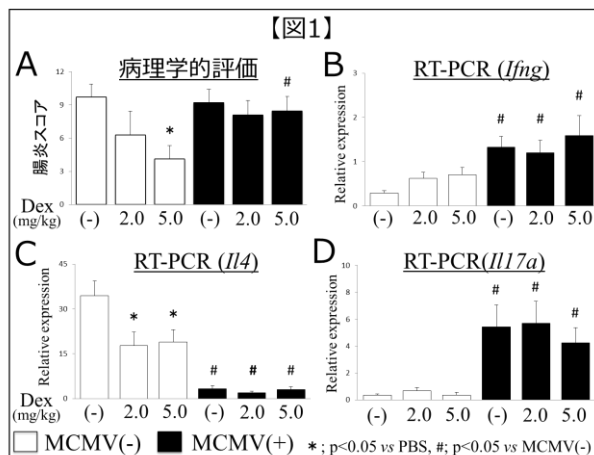
MCMV(-)、MCMV(+) の腸管粘膜固有層単核細胞 (lamina propria mononuclear cells, LPMC) から単離した T 細胞や、骨髄由来マクロファージ (bone marrow derived macrophage, BMDM) を用いて、*ex vivo* で刺激実験を行った。T 細胞刺激には抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体や PMA+Ionomycin を用い、BMDM 刺激には LPS を使用した。

各種細胞を刺激する際の Dex 投与の有無による活性化状態、炎症性サイトカイン産生、グルココルチコイド誘導遺伝子の発現の変化を RT-PCR、ELISA などで検討し、MCMV 感染においてどの細胞集団でステロイド抵抗性が認められるのかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MCMV 感染 TCR $\alpha$ KO マウスにおけるステロイド反応性の検討

TCR $\alpha$  KO マウスに Dex による治療実験を行った。MCMV 非感染マウスでは Dex で腸炎が改善したが、MCMV 感染マウスは Dex で腸炎が改善しなかった(図 1 A)。MCMV 感染マウスの大腸組織の遺伝子発現は Th2 から Th1/17 優位に変化していた(図 1 B-D)。

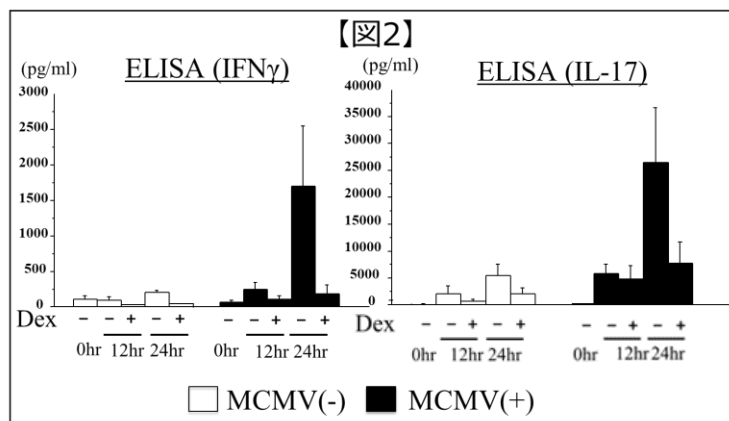


##### (2) MCMV 感染 TCR $\alpha$ KO マウスにおける各種免疫担当細胞におけるステロイド反応性の検討

(a) TCR $\alpha$  KO マウスから作成した骨髄由来マクロファージに対して LPS 刺激実験を行ったが、炎症性サイトカイン産生は MCMV 感染の有無で差異は認められなかった。

TCR $\alpha$  KO マウスの大腸組織での IL7 やケモカイン産生を評価したが、MCMV 感染の有無で差異を認めなかった。

(b) TCR $\alpha$  KO マウスから単離した LPMC を用いて *ex vivo* で T 細胞刺激を行ったところ MCMV 感染マウスの方が MCMV 非感染マウスよりも IFN $\gamma$ 、IL-17A の産生が増加していた。Dex による大腸 LPMC の *ex vivo* での T 細胞活性抑制効果、グルコルチコイド誘導遺伝子の発現は MCMV 感染マウスと MCMV 非感染マウスで差を認めなかった(図 2)。



本研究では、マウスモデルにおいてもヒトと同様に CMV 感染により腸炎が難治化することが示された。その機序に関しても、CMV 感染により腸管炎症における T 細胞分化に変化をきたすことが明らかとなった。今後は CMV 感染が T 細胞分化に影響を及ぼすメカニズムを解明していく予定である。

##### <引用文献>

Matsumura K, Nakase H, Kosugi I, et al. Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection: in vivo identification of cytomegalovirus persistent infected cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Aug;19(9):1951-63.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakiuchi Nobuyuki, Yoshida Kenichi, Uchino Motoi, Kihara Takako, Akaki Kotaro, Inoue Yoshikage, Kawada Kenji, Nagayama Satoshi, Yokoyama Akira, Yamamoto Shuji, et al	4. 巻 577
2. 論文標題 Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 260 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1856-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto Noriko, Takanashi Megumi, Yokoyama Kotoko, Yonezawa Atsushi, Denda Masaya, Hashimoto Motomu, Tanaka Masao, Ito Hiromu, Matsuura Minoru, Yamamoto Shuji, Honzawa Yusuke, Matsubara Kazuo, Shimada Takashi	4. 巻 472
2. 論文標題 Multiplexed monitoring of therapeutic antibodies for inflammatory diseases using Fab-selective proteolysis nSMOL coupled with LC-MS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Methods	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jim.2019.06.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kagebayashi Sumika, Yamamoto Shuji, Seno Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Jejunal diaphragm disease associated with cytomegalovirus infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endoscopy International Open	6. 最初と最後の頁 E533 ~ E536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-0848-8172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitamoto H, Kataoka T, Yamamoto S.	4. 巻 156
2. 論文標題 Multiple polypoid lesions in the ileum after treatment for primary ileal follicular lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 552-553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2018.08.048.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sogabe Y, Yamamoto S, Kodama Y.	4. 巻 88
2. 論文標題 Unusual cause of a pancreatic mass.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastrointest Endosc	6. 最初と最後の頁 770-771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gie.2018.06.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto S, Matsumura K, Seno H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Segmental Xanthomatosis of the Ileum.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cgh.2018.01.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto S, Yamada M, Matsumura K.	4. 巻 154
2. 論文標題 Mimicking small intestinal anisakiasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 e9-e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2017.08.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 北本博規、山本修司、妹尾浩
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎治療の変化がCMV感染合併例の臨床転帰に及ぼす影響について
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北本博規、山本修司、本澤有介、妹尾浩
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎におけるチオプリン製剤最適化の指標に関する検討
3. 学会等名 日本消化器病学会近畿支部 第112回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Okabe, Minoru Matsuura, Hiroki Kitamoto, Satoshi Yamada, Yusuke Honzawa, Shuji Yamamoto, Hiroshi Seno, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa
2. 発表標題 HYA, A Metabolite of Linoleic Acid by the Commensal Bacteria, Ameliorates Colonic Inflammation in IL-10-deficient Mice Through the Alteration of Macrophage Function
3. 学会等名 Digestive disease week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Shuji Yamamoto, Yusuke Honzaawa, Hiroki Kitamoto, Makoto Okabe, Minoru Matsuura, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Risk factors of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus reactivation in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis
3. 学会等名 The 7th Annual Meeting of AOCC (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田聡 山本修司 本澤有介 妹尾浩
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における上部消化管病変の検討
3. 学会等名 第102回 日本消化器内視鏡学会 近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Shuji Yamamoto, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Reactivation of Epstein-Barr virus in the colonic mucosa of active ulcerative colitis
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Shuji Yamamoto, Yusuke Honzawa, Yuki Hayashi, Hiroki Kitamoto, Makoto Okabe, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Reactivation of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus behaves differently in pathophysiology of ulcerative colitis
3. 学会等名 15th congress of ECCO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Honzawa, Shuji Yamamoto, Makoto Okabe, Hiroki Kitamoto, Satoshi Yamada, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Efficacy and safety of tacrolimus therapy for elderly patients with ulcerative colitis
3. 学会等名 The 7th Annual Meeting of AOCC (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本澤有介、山本修司、妹尾浩
2. 発表標題 クローン病狭窄例に対する経鼻内視鏡を用いた小腸内視鏡の試み - よりよい内視鏡評価を目指して -
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北本博規、松浦稔、岡部誠、山田聡、本澤有介、山本修司、妹尾浩
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第9回日本炎症性腸疾患研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北本博規、松浦稔、山本修司、妹尾浩
2. 発表標題 当院における難治性潰瘍性大腸炎に対するGolimumabの使用経験
3. 学会等名 日本消化器病学会近畿支部 第110回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitamoto H, Yamamoto S, Matsuura M, Honzawa Y, Yamada S, Okabe M, Seno H
2. 発表標題 Advance of medical therapies may improve the outcome of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection
3. 学会等名 14th Congress of ECCO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okabe M, Matsuura M, Kitamoto H, Yamada S, Honzawa Y, Yamamoto S, Seno H
2. 発表標題 Efficacy and safety of thiopurine and allopurinol cotherapy in thiopurine-naive Japanese UC patients
3. 学会等名 The 6th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Kitamoto H, Yamamoto S, Matsuura M, Honzawa Y, Yamada S, Okabe M, Seno H
2. 発表標題 Impact of advance in medical therapies on clinical outcome in patients with ulcerative colitis concomitant cytomegalovirus infection
3. 学会等名 The 6th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Honzawa Y, Matsuura M, Kitamoto H, Okabe M, Yamada S, Yamamoto S, Seno H
2. 発表標題 Endoscopic findings to predict therapeutic efficacy of anti-TNF agents on patients with ulcerative colitis
3. 学会等名 The 6th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院医学研究科・消化器内科学ホームページ  <a href="http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/gastro.html">http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/gastro.html</a>          京都大学大学院医学研究科・消化器内科学ホームページ  <a href="http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/gastro.html">http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/gastro.html</a></p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------