

平成 21年 3月 3日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 - 2008

課題番号：19590721

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における免疫寛容破綻の分子機序の解明および新規遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文） Mechanism of abrogation of anergy in inflammatory bowel disease

研究代表者 飯島 英樹 (IIJIMA HIDEKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90444520

研究成果の概要：炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎では、食事抗原や腸内細菌に対する免疫寛容の破綻が想定されている。炎症性腸疾患を自然発症する IL-10 ノックアウトマウスでは、免疫寛容を誘導すると言われている E3 ユビキチン・リガーゼが有意に低下しており、疾患の制御に重要な働きをしていることが示唆された。さらに、潰瘍性大腸炎患者の末梢血 T リンパ球の解析により、免疫寛容関連ユビキチン・リガーゼが潰瘍性大腸炎患者の寛解の維持に重要であることが確認され、新たな治療標的となると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器病学（食道、胃、小腸、大腸）、炎症性腸疾患、免疫寛容、粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

クローン病ならびに潰瘍性大腸炎からなる炎症性腸疾患は、主に若年者に発症し、寛解、再燃を繰り返す腸管の炎症性疾患である。炎症性腸疾患患者は、近年急速に増加しているが、病因が不明で根治療法がないため、わが国では特定疾患（いわゆる難病）に指定されている。炎症性腸疾患の原因の一つとして、従来より、腸内細菌や食事成分などの抗原に対する免疫寛容（アナジー）の破綻が考えられてきたが、その機序は明らかではなかった。近年、T細胞のアナジー化においては、アナジー関連 E3 ユビキチン・リガーゼ(以下、E3

リガーゼ)である gene related to anergy in lymphocytes(GRAIL)、Itch、c-Cbl などの分子の発現が誘導され、T細胞シグナル伝達分子がユビキチン化を受けて消費されるため、T細胞の活性化が起こらないということが報告されたが、ヒトの疾患におけるこれらの E3 リガーゼの関与については報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性腸疾患における E3 リガーゼの関与を明らかにすることを目的に、炎症性腸疾患モデルマウスおよび炎症性腸疾患患者の E3 リガーゼを解析し、炎症性腸疾患の

病態における関わりを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) マウスの脾臓白血球およびヒトの末梢血 CD4 陽性 T 細胞を分離し、Ionomycin や抗 CD3 抗体により *in vitro* においてアナジーを誘導し、E3 リガーゼの発現を定量性 RT-PCR 法にて解析した。また CD4 陽性 T 細胞の中の E3 リガーゼ発現を、制御性 T 細胞、ナイーブ、メモリー T 細胞などの T 細胞分画に分けて解析した。
- (2) 炎症性腸疾患モデルマウスである IL-10 ノックアウトマウスの脾臓、小腸、大腸粘膜固有層単核球を回収し、E3 リガーゼの発現を定量性 RT-PCR 法で調べた。
- (3) 活動期および寛解を長期維持している潰瘍性大腸炎患者より末梢血単核球を分離し、磁気ビーズ法にて CD4 陽性リンパ球を分離し、E3 リガーゼの発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。さらにこれらの E3 リガーゼの発現を健常者と比較した。
- (4) 潰瘍性大腸炎患者をステロイドや白血球除去療法により治療し、E3 リガーゼ発現を経時的に解析し治療効果との相関を解析した。

4. 研究成果

- (1) マウスおよびヒト CD4 陽性 T 細胞は、アナジー誘導条件において非誘導条件で培養した細胞よりも有意に E3 リガーゼの発現が高かった。Itch, c-Cbl の発現はナイーブ T 細胞においてメモリー T 細胞に比較して有意に高値であった。E3 リガーゼの発現は制御性、非制御性 T 細胞の間で差が見られなかった。
- (2) 野生型マウスでは、小腸や大腸の単核球において脾臓や腸間膜リンパ節の単核球よりも E3 リガーゼの発現が高く、腸管において恒常的に E3 リガーゼが発現し、経口的に摂取される種々の抗原に対する過度の免疫活性化が抑制されていることが示唆された。一方、炎症性腸疾患を自然発症する IL-10 ノックアウトマウスにおいて腸管での E3 リガーゼの発現が低く、免疫寛容の破綻の原因になっていることが示唆された。
- (3) 寛解期の潰瘍性大腸炎患者の末梢血の CD4 陽性 T リンパ球においては、活動期の潰瘍性患者や健常対象者と比較して有意に GRAIL の発現が高かった。また、GRAIL 以外の E3 リガーゼである Itch や c-Cbl も同様の傾向を認めた。
- (4) 活動性潰瘍性大腸炎患者に対し、白血球除去療法やステロイドにより治療した場合、ほとんどの症例で GRAIL の発現が治療

後に増加したが、治療が奏功しなかった症例では GRAIL の増加は認められなかった。さらに寛解導入療法後に経過観察できた症例では GRAIL 発現が高値である症例の方が長期に寛解が維持される傾向を認めた。

- (5) 以上の結果のように、我々はマウスおよびヒトにおいて炎症性腸疾患の経過に E3 リガーゼを介した免疫寛容の誘導が関与することをはじめて明らかにした。この結果は、マウスにおいて研究されてきた免疫寛容のメカニズムのヒトの疾患における関与を明らかにした点で非常に重要であり、免疫寛容メカニズムに基づいた新たな治療法の開発につながると考えている。このような現象は炎症性腸疾患にとどまらず、他の自己免疫疾患、アレルギー疾患などにも共通する現象である可能性があり、今後の検討が待たれる。現在のところ T 細胞への E3 リガーゼ遺伝子導入効率が低く遺伝子導入による E3 リガーゼの炎症性腸疾患治療研究が進んでいないが、E3 リガーゼを中心とした免疫寛容のメカニズムの更なる解明により新たな治療法の確立を目指し検討を続ける予定である。

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 9 件)

1. Satoshi Egawa, Hideki Iijima, Shinzaki, S., Nakajima, S., Wang, J., Kondo, J., Ishii, S., Yoshio, T., Irie, T., Nishida, T., Kakiuchi, Y., Yasumaru, M., Yoshihara, H., Kanto, T., Tsuji, M., et al. Upregulation of GRAIL is Associated with Remission of Ulcerative Colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295, G163-G169, 2008, 査読有
2. Shinichiro Shinzaki, Hideki Iijima, et al. IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 103, 1173-81, 2008, 査読有
3. Hayashi, Y., Tsuji, S. Tsuji, M., Nishida, T., Ishii, S., Iijima, H., et al. Topical Implantation of Mesenchymal Stem Cells has Beneficial Effects on Healing of Experimental Colitis in Rats. J Pharmacol Exp Ther 326, 523-31, 2008, 査読有

4. Hayashi, Y., Tsuji, S., Tsujii, M., Nishida, T., Ishii, S., Iijima, H., et al. Topical transplantation of mesenchymal stem cells accelerates gastric ulcer healing in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G778-786, 2008、査読有
 5. Nishida, T., Tsuji, S., Tsujii, M., Ishii, S., Yoshio, T., Shinzaki, S., Egawa, S., Irie, T., Kakiuchi, Y., Yasumaru, M., Iijima, H., et al. Cultured bone marrow cell local implantation accelerates healing of ulcers in mice. *J Gastroenterol* 43, 124-135, 2008、査読有
 6. 西田勉, 辻晋吾, 山本克己、飯島英樹、他 糖尿病におけるGERD:定量的末梢知覚試験からの検討 *Progress in Medicine* 28, 706-709, 2008. 査読無
 7. 中島佐知子、飯島英樹 抗TNF α 抗体を用いた炎症性腸疾患の治療 *Clinician* 574, 1195-1198 2008. 査読無
 8. 西田勉、山本克己、筒井秀作、疋田隼人、飯島英樹、他 CEA高値で発見された非症候性膵グルカゴノーマの一例 *膵臓* 23, 140-145, 2008 査読有
 9. Irie, T., Tsujii, M., Tsuji, S., Yoshio, T., Ishii, S., Shinzaki, S., Egawa, S., Kakiuchi, Y., Nishida, T., Yasumaru, M., Iijima, H., et al. Synergistic antitumor effects of celecoxib with 5-fluorouracil depend on IFN-gamma. *Int J Cancer* 121 (4)878-83, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 35 件)
1. 近藤純平、飯島英樹、辻晋吾 Crohn病の診断と治療におけるダブルバルーン小腸内視鏡の有用性 JDDW2008 2008/10/3 東京
 2. 中島佐知子、飯島英樹、林紀夫 ビタミンK欠乏と炎症性腸疾患活動性との関連について JDDW2008 2008/10/3 東京
 3. 井上隆弘、飯島英樹、他 クロウン病術後に対する小腸内視鏡検査の有用性と問題点 JDDW2008 2008/10/3 東京
 4. 柄川悟志、飯島英樹、他 マウス炎症性腸疾患におけるT細胞の免疫寛容の関与についての検討 第36回日本潰瘍学会総会 2008/9/2 札幌
 5. Shinzaki S, Iijima H., et al. Alterations in IgG fucosylated oligosaccharides are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease. JHUP0 conference 2008 2008/7/29 大阪
 6. 柄川悟志、飯島英樹、他 潰瘍性大腸炎患者におけるT細胞アナジの検討 第45回日本消化器免疫学会総会 2008/7/4 京都
 7. Masahiko Tsujii, Shingo Tsuji, Hiroshi Eguchi, Shusaku Tsutsui, Hideki Iijima, et al. Chemical intervention reverses oxidative stress-induced epigenetic alterations in colon cancer cells: Clues for new chemopreventive measures against aging and carcinogenesis. Digestive disease week 2008/5/21 San Diego, USA
 8. Hideki Iijima, et al. Agalactosyl IgG observed in inflammatory bowel disease is associated with enhancement of antibody-dependent phagocytosis in human monocytic cell line Digestive disease week 2008/5/20 San Diego, USA
 9. Satoshi Egawa, Hideki Iijima, et al. Upregulation of E3 ubiquitin ligases related to T cell anergy in CD4+ T cells isolated from patients with ulcerative colitis in remission. Digestive disease week 2008/5/20 San Diego, USA
 10. Jumpei Kondo, Shingo Tsuji, Hideki Iijima, et al. Indications And Diagnostic Yield Of Double Balloon Enteroscopy In A Tertiary Care Setting: An Analysis Of 527 Cases With Suspected Small Bowel Diseases. Digestive disease week 2008/5/20 San Diego, USA
 11. Shuji Ishii, Shingo Tsuji, Masahiko Tsujii, Jumpei Kondo, Sachiko Nakajima, Toshiyuki Yoshio, Shinichiro Shinzaki, Satoshi Egawa, Tsutomu Nishida, Yoshimi Kakiuchi, Kenji Watabe, Hideki Iijima, et al. Bone-marrow cells are able to develop Interstitial Cells of Cajal: Morphologic Evidences in W/Wv mice. Digestive disease week 2008/5/20 San Diego, USA
 12. Toshiyuki Yoshio, Tsuyoshi Morita, Masahiko Tsujii, Jumpei Kondo, Sachiko Nakajima, Shuji Ishii, Shinichiro Shinzaki, Sato shi Egawa, Tsutomu Nishida, Yoshimi Kakiuchi, Hideki Iijima, et al. Caldesmon suppresses cancer cell invasion by

- regulating podosome/invadopodium formation. Digestive disease week 2008/5/19 San Diego, USA
13. Sachiko Nakajima, Hideki Iijima, et al. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with inflammatory bowel disease. Digestive disease week 2008/5/19 San Diego, USA
 14. Jun Wang, Masahiko Tsujii, Shingo Tsuji, Toru Nakamura, Hiroshi Eguchi, Shusaku Tsutsui, Hideki Iijima, et al. Possible roles of let-7 microRNA expression in the Cytotoxin-associated gene A (CagA) associated pathogenesis. Digestive disease week 2008/5/19 San Diego, USA
 15. Hideki Iijima, Shinichiro Shinzaki, et al. Agalactosyl IgG observed in inflammatory bowel disease is associated with enhancement of antibody-dependent phagocytosis in human monocytic cell line. Digestive disease week 2008/5/18 San Diego, USA
 16. Yujiro Hayashi, Shingo Tsuji, Masahiko Tsujii, Tsutomu Nishida, Shuji Ishii, Hideki Iijima, et al. Mesenchymal Stem Cells Transplantation Accelerates Gastric Ulcer Healing in Rats Digestive disease week 2008/5/18 San Diego, USA
 17. 飯島英樹、他 炎症性腸疾患に見られるガラクトース欠損 IgG によるマクロファージ機能への影響の解析 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 18. 石井修二、辻晋吾、辻井正彦、近藤純平、中島佐知子、由雄敏之、新崎信一郎、柄川悟志、西田勉、垣内佳美、渡部健二、飯島英樹、林紀夫 骨髄移植モデルを用いた消化管運動障害の改善に関する検討 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 19. 由雄敏之、森田剛、辻井正彦、近藤純平、中島佐知子、石井修二、新崎信一郎、柄川悟志、山本克己、渡部健二、西田勉、垣内佳美、飯島英樹、他 Caldesmon は invadopodium/podosome の形成を阻害する癌細胞浸潤の抑制因子である 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 20. 垣内佳美、辻晋吾、辻井正彦、筒井秀作、飯島英樹、他 低用量アスピリンによる上部消化管粘膜障害:病変予測因子の検討 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 21. 新崎信一郎、飯島英樹、林紀夫炎症性腸疾患における免疫寛容分子 GRAIL の関与における IgG 糖鎖構造の変化—血清マーカーとしての可能性 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 22. 井上隆弘、飯島英樹、他 クロウン病における悪性腫瘍合併症例の検討第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 23. 柄川悟志、飯島英樹、他 マウス炎症性腸疾患における T 細胞の免疫寛容の関与についての検討 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 24. 中島佐知子、飯島英樹、他 炎症性腸疾患患者における骨密度および骨代謝マーカーの検討 第 94 回日本消化器病学会総会 2008/5/8 福岡
 25. Shinichiro Shinzaki, Hideki Iijima, Takatoshi Nakagawa, Satoshi Egawa, Sachiko Nakajima, Jumpei Kondo, Shuji Ishii, Tatsuya Kanto, Masahiko Tsujii, et al New diagnostic marker in Crohn's disease based on IgG oligosaccharide analysis. The 2nd Korea-Japan IBD symposium 2007/12/1 東京
 26. Satoshi Egawa, Hideki Iijima, Masahiko Tsujii, et al. Upregulation of GRAIL, an E3 ubiquitin ligase for induction of T cell anergy, in CD4+ T cells of patients with ulcerative colitis in remission state. 13th International congress of mucosal immunology 2007/7/10 東京
 27. Shinichiro Shinzaki, Hideki Iijima, Takatoshi Nakagawa, Satoshi Egawa, Sachiko Nakajima, Tatsuya Kanto, Masahiko Tsujii, et al. New serologic marker for IBD based on the oligosaccharide analysis. 13th International congress of mucosal immunology 2007/7/10 東京
 28. Satoshi Egawa, Hideki Iijima, Shinichiro Shinzaki, Sachiko Nakajima, Jumpei Kondou, Shuji Ishii, Toshiyuki Yoshio, Takanobu Irie, Yoshimi Kakiuchi, Tsutomu Nishida, Masakazu Yasumaru, Masahiko Tsujii, et al. Expression of Grail, An E3 Ubiquitin Ligase for Induction of T Cell Anergy, in CD4+ T Cells of Patients with Ulcerative Colitis. DDW2007 5/17/2007 Washington DC, USA
 29. Shinichiro Shinzaki, Hideki Iijima,

- Satoshi Egawa, Sachiko Nakajima, Shuji Ishii, Toshiyuki Yoshio, Takanobu Irie, Yoshimi Kakiuchi, Tsutomu Nishida, Masakazu Yasumaru, Tatsuya Kanto, Masahiko Tsujii, et al. Cyclooxygenase-2 Regulates Toll-Like Receptor (TLR) 2 Expression and TLR2-Mediated Chemokine Production in Intestinal Epithelial Cells DDW2007 5/17/2007 Washington DC, USA
30. Yujiro Hayashi, Shingo Tsuji, Masahiko Tsujii, Tsutomu Nishida, Shuji Ishii, Masato Komori, Takanobu Irie, Hideki Iijima, et al. Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorated 2, 4, 6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)-Induced Colitis in Rats. DDW2007 5/17/2007 Washington DC, USA
31. Takanobu Irie, Masahiko Tsujii, Shingo Tsuji, Toshiyuki Yoshio, Shuji Ishii, Shinichiro Shinzaki, Satoshi Egawa, Yoshimi Kakiuchi, Tsutomu Nishida, Masakazu Yasumaru, Hideki Iijima, et al. Interferon-Gamma-Dependent Tumor-Suppressive Mechanisms of a COX-2 Inhibitor in Combination with 5-Fluorouracil. DDW2007 5/17/2007 Washington DC, USA
32. Masahiko Tsujii, Shingo Tsuji, Shusaku Tsutsui, Hideki Iijima, et al. DNA Damage-Related Hypomethylation Induced Not Senescence Nor Apoptosis, But Aberrant Hypermethylation in CpG Island Methylator Phenotype-High Colon Cancer Cells Via Aberrant ERK / AKT Activation and Enhanced DNA Methyltransferase Activity DDW2007 5/17/2007 Washington DC, USA
33. 柄川悟志、飯島英樹、新崎信一郎、中島佐知子、考藤達哉、辻井正彦、他 潰瘍性大腸炎の緩解維持に T 細胞のアナジーが関与する 第 93 回日本消化器病学会総会 2007/4/19 青森
34. 飯島英樹、新崎信一郎、林紀夫 レクチンを介した自然免疫系制御による炎症性腸疾患治療の可能性 第 93 回日本消化器病学会総会 2007/4/19 青森
35. 新崎信一郎、飯島英樹、中島佐知子、柄川悟志、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、他 糖鎖解析に基づく炎症性腸疾患の新たな血清マーカー 第 93 回日本消化器病学会総会 2007/4/19 青森

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 英樹 (IIJIMA HIDEKI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号:90444520

(2) 研究分担者

辻井 正彦 (TSUJII MASAHIKO)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号:40303937

(3) 連携研究者

なし