

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790747

研究課題名 (和文) 小児炎症性腸疾患における免疫学的検討と免疫調節薬の効果

研究課題名 (英文) Immunological examination and efficacy of immunomodulator in pediatric inflammatory bowel disease

研究代表者

藤井 徹 (FUJII TORU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30420855

研究成果の概要 (和文)：近年、炎症性腸疾患の低年齢化が進んでおり、食生活や衛生環境の変化が大きく関与していると考えられている。発達過程である小児領域の炎症性腸疾患の免疫学的変化の検討と免疫調節薬による治療効果を検討した。活動期の潰瘍性大腸炎、クローン病ともに IL-4 と IL-6 の発現が有意に上昇しており、更に活動期の潰瘍性大腸炎では、GATA3 と STAT4 の有意な発現を認め、IL-4 の上昇と GATA3、STAT4 の有意な発現は小児潰瘍性大腸炎の活動期に大きく関与していると考えられた。また、免疫調節薬 6MP は、欧米と比べ少ない投与量で維持されていたが、代謝産物 6TGN は約 1.5 倍高値であり、代謝に関する人種差、他の薬剤との併用による影響が関与していると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：In recent years, the lowering of the age of the inflammatory bowel disease is advanced and it is thought that the change in eating habits and the hygienic environment takes part greatly. The objective of this study was to examine the change in immunity and the efficacy of immunomodulatory agents in pediatric inflammatory bowel disease in developing process. Significant elevation of serum Il-4 and Il-6 levels was detected at the acute phase of pediatric UC and CD patients compared with levels at the remission. The mucosal expression of GATA-3 and STAT-4 were significantly enhanced in the acute phase of pediatric UC patients compared with normal mucosa. These results suggest that IL-4 and its signaling molecule GATA-3, as well as the Th1 signaling molecule STAT-4, are involved in the pathogenesis of acute phase of pediatric UC. The doses of 6-MP need to maintain remission in Japanese children are lower than those reported in Western countries. However, 6-TGN concentrations in this population are higher than those previously reported. It is thought to be affected by the differences in racial metabolizing and the usage of other medicines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：炎症性腸疾患、免疫調節薬、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Th1/Th2 細胞の分化による疾患発症の報告が多くなされており、炎症性腸疾患も同様である。これら Th 細胞を調節するものとして、TGF- $\beta$  や IL-10 などの調節分子と、IL-12 による Th1 細胞への分化、IL-4 による Th2 細胞への分化などとの関連が報告されている。

(2) 近年、IL-17 (Th17 細胞) の関与が指摘され、成人領域では炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病) などの炎症性自己免疫疾患との関連が報告されている。

(3) Th17 細胞は、TGF- $\beta$  と IL-6 などの刺激により IL-17 を産生し、更には、IL-23 の作用により炎症を惹起するとされており、炎症性腸疾患の病態を解明する上で重要な分子である。また、Th17 細胞に関する検討は小児ではほとんど行われおらず、早急な解明が必要と考えた。

(4) 炎症性腸疾患の治療では、ステロイド薬は初期治療として欠かせない。しかしながら、小児は成長過程であることから、ステロイドの長期使用により、成長障害を来すことが問題となることから、免疫調節薬 (アザチオプリン: AZA、メルカプトプリン: 6-MP など) をどのように使用するかが課題である。

(5) 骨髄抑制、脾炎や肝機能異常などの副作用は、TPMT 遺伝子多型の関与が指摘されており、これらを小児期から評価する必要がある。また、代謝産物である 6-TGN の赤血球膜中濃度を測定することで、小児期の副作用との関連を検討することも必要である。

## 2. 研究の目的

(1) 小児期 (乳児、幼児、学童期) の慢性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病) に対する免疫調節薬による影響を解析するため、活動期・非活動期の 6MP の代謝産物である 6-TGN の測定、TPMT 遺伝子多型、白血球、肝機能、脾機能の評価を行った。

(2) 小児期の慢性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病) 患児の活動期・非活動期の血清を用いサイトカインの発現を確認し、Th1 細胞、Th2 細胞、Treg 細胞の発現と役割を検討した。

(3) 活動期・非活動期の粘膜組織を用いて Th1 細胞、Th2 細胞の局所的な発現と役割を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫調節薬 (6MP または AZA) を内服している潰瘍性大腸炎 33 例とクローン病 20 例

を対象に 6MP の代謝産物である 6-TGN 血中濃度と TPMT 遺伝子多型の有無、副作用の発現について検討した

(2) そのうち潰瘍性大腸炎 20 例、クローン病 12 例の活動期と非活動期の血清を用い、IL-6、IL-12、IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-17、IL-23 などのサイトカインの発現を確認し Treg 細胞や Th17 細胞、TNF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  などの Th1 細胞、IL-4、IL-5 などの Th2 細胞の発現と役割を検討した。

(3) 更に、活動期、非活動期の粘膜組織から潰瘍性大腸炎 8 例とクローン病 8 例、対象として内視鏡所見で正常粘膜であった 8 例の生検組織を用いて、転写因子として Th1 細胞は T-bet、STAT4、Th2 細胞は GATA3、STAT6 などのシグナル分子の発現を real time PCR を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 6-TGN 血中濃度は、活動期が  $485.30 \pm 286.63$  と非活動期の  $534.97 \pm 210.72$  と比べて有意な差は認めなかった (Fig1-a)。免疫調節薬 6MP の使用量は、活動期の方は、 $0.895 \pm 0.33 \text{mg/kg/day}$  と非活動期の  $0.743 \pm 0.225 \text{mg/kg/day}$  と比べ有意に多く (Fig1-b)、白血球数は、活動期が  $7707 \pm 3129.3/\cdot 1$  と非活動期の  $5475 \pm 180.4.8/\cdot 1$  と比べ有意に高かった (Fig1-c)。しかし、白血球数と 6-TGN 濃度には相関を認めなかった (Fig2)。

TPMT 遺伝子多型は全例で認めなかった。副作用に関しては、白血球減少が 2 名に認められ、4 名に脾酵素の上昇を認めた。

6-TGN 濃度と 6MP 使用量には相関は認めなかった (Fig3)。6-TGN 血中濃度は、平均  $500.80 \text{pmol}/8 \times 10^8$  と欧米の報告に比べて高値であったが、免疫調節薬 6MP の使用量は低値であった。

Fig 1

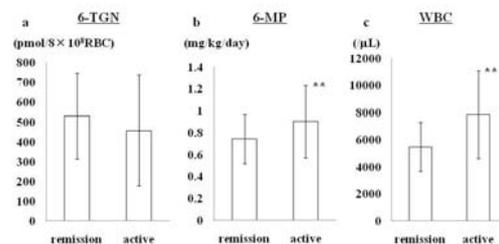


Fig1

- a : 6-TGN 濃度の活動期と非活動期の比較
- b : 6MP 使用量の活動期と非活動期の比較
- c : 白血球数の活動期と非活動期の比較

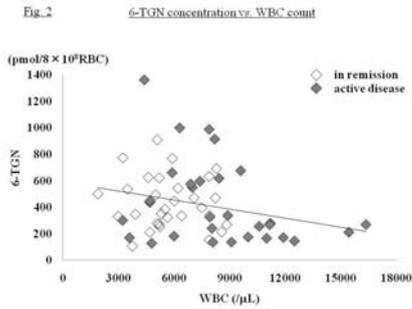


Fig2  
6-TGN 濃度と白血球数の分布

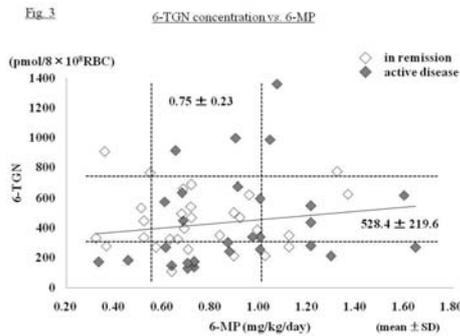


Fig3  
6-TGN 濃度と 6MP 使用量の分布

(2) 潰瘍性大腸炎 (UC) におけるサイトカインの検討 (Fig4) では、活動期と非活動期を比べると、IL-5、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、INF- $\gamma$  においては有意差は認めなかったが、IL-4、IL-6 においてともに活動期で有意に上昇していた。

クローン病におけるサイトカインの検討 (Fig5) でも、活動期と非活動期を比べると、IL-5、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、INF- $\gamma$  においては有意差は認めなかったが、IL-4、IL-6 においてともに活動期で有意に上昇していた。

また IL-6 と CRP との関連を検討したところ、UC、CD ともに相関を認めた (Fig6)。

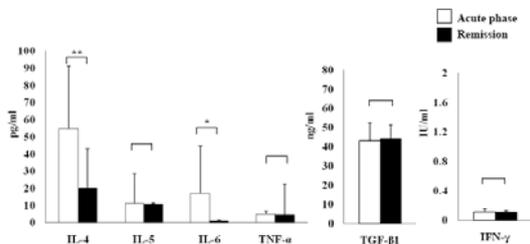


Fig4  
UC の活動期、非活動期の血清サイトカインの比較

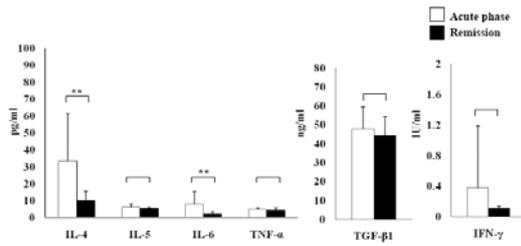


Fig5  
CD の活動期、非活動期の血清サイトカインの比較

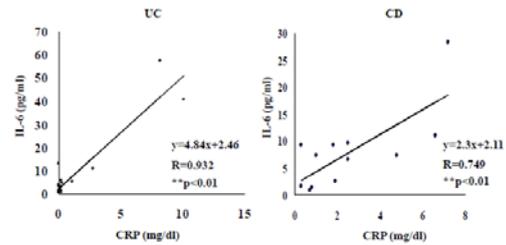


Fig6  
IL-6 と CRP の相関

(3) 転写因子の検討 (Fig7) では、T-bet、STAT-6 においては UC、CD、対象群でいずれも有意差は認めなかった。UC 群は対象群と比べて GATA-3、STAT-4 では、有意に発現が増強されていた。しかし CD 群では、GATA-3、STAT-4 において有意差は認めなかった。

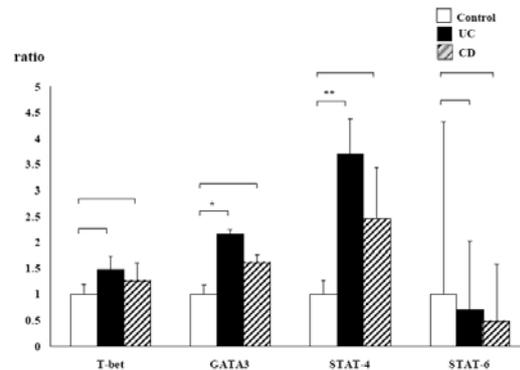


Fig7  
転写因子の比較

## 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 1 件)  
Ohtsuka Y, Fujii T, et al. Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese children and adolescents with inflammatory bowel disease. J Gastroenterol Hepatol 2010 in press

〔学会発表〕(計2件)

(1) 藤井徹、小児炎症性腸疾患における免疫調節薬の検討、第111回日本小児科学会総会、2008年04月25日～27日、東京都、東京国際フォーラム

(2) 藤井徹、当科におけるCrohn病の治療経過、第9回日本小児IBD研究会、2009年02月15日、大阪府、北浜フォーラム

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井徹 (FUJII TORU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30420855

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし