

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009-2011

課題番号：21590810

研究課題名（和文）炎症性腸疾患におけるサイトメガロウイルスの再活性化およびその感染成立機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of cytomegalovirus reactivation and infection in inflammatory bowel disease.

研究代表者

仲瀬 裕志 (NAKASE HIROSHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：60362498

研究成果の概要（和文）：(1) CMV感染によるマクロファージ (MΦ) の機能変化：CMV感染MΦは、CMV感染のないMΦと比し、炎症性サイトカイン産生が増強した。CMV感染MΦでは、TGF-βによるSmad シグナルが抑制され、炎症性サイトカイン産生制御は認められなかった。(2) CMV腸管内感染機構：炎症部位でCMV受容体であるPDGFR等の発現増強が確認された。免疫染色結果から、CMVは腸管間質細胞に潜伏すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：(1) **Analysis of function of macrophages infected with cytomegalovirus (CMV).** Macrophages, in which CMV was reactivated, strongly produced more pro-inflammatory cytokines in comparison with macrophages with no CMV reactivation. TGF-β did not inhibit pro-inflammatory cytokine production from macrophages with CMV reactivation because Smad signal transduction was blocked in those cells. (2) **Elucidation of mechanism of CMV infection in intestine of IBD.** Gene expressions of PDGFR, etc., which could be entry site of CMV, were up-regulated in inflamed colonic mucosa in comparison with non-inflamed colonic mucosa. Interestingly, immunohistochemistry study revealed that CMV is mainly infected in mesenchymal cells of intestine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器内科

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：炎症性腸疾患、サイトメガロウイルス、マクロファージ、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: 以下 IBD) は腸管特異的に炎症が生じ、生涯治療の継続が必要とされる原因

不明の難治性疾患である。本邦において、近年炎症性腸疾患患者は増加の一途をたどっている。近年、IBDの代表的疾患である潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: 以下 UC) の難治化の要因の1つとしてサイ

トメガロウイルス (Human Cytomegalovirus: 以下 HCMV) 感染が注目されている。CMV 感染合併 UC 症例はステロイドを始めとする免疫抑制剤使用例および高齢者に多く、時として重症化し、最終的に手術に至る症例も少なからず存在する。このような観点から、IBD 患者難治例における HCMV 感染早期診断はきわめて重要である。HCMV antigenemia 陰性の難治性 UC 患者例では、粘膜生検組織中の DNA を用いた Real time PCR 法を用いることにより、大腸腸管粘膜組織中で HCMV 再活性化が確認されることが多く、さらにその再活性化は炎症粘膜でのみ認められることを我々は報告してきた。従って、通常の日和見感染患者における HCMV の再活性化機構の場合と、難治性 UC 患者における CMV 再活性化機構とは大きく異なることが推測される。このことから、IBD 患者における腸管局所での HCMV 再活性化機構を解明するためには、(1)炎症性腸疾患患者および健常人におけるマクロファージや樹状細胞中の HCMV の再活性化の差異、および各種サイトカインの HCMV 再活性化におよぼす影響、(2) HCMV の再活性化による樹状細胞やマクロファージの機能変化、(3) HCMV 粒子の腸管局所粘膜における感染成立機序、を解明することがきわめて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患における HCMV 再活性化およびその感染成立機構の解明

3. 研究の方法

(1) IBD 患者における HCMV 再活性化機構の機序の解明：潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者、健常人の末梢血から単球を単離、サイトカインに加えて LPS 刺激による樹状細胞 assay 系を樹立させる。この assay 系を用いることにより、炎症性腸疾患患者群および健常人の樹状細胞における HCMV 再活性化の差異について検討する。また、各種サイトカインによる刺激後の HCMV 再活性化の差異についても検討する。HCMV 活性化に関しては、ウイルス増殖の引き金となる前初期遺伝子の発現が

必要であるため、この発現の制御に関与するサイトカインの同定を行う。

- (2) HCMV 再活性化に伴う樹状細胞やマクロファージの機能変化の解析：上記で記載された樹状細胞を LPS 刺激により分化させ (樹状細胞内の HCMV-DNA が増加する)、その後 TGF- β による刺激を加え、各種サイトカインの産生について検討する。分化前と分化後で TGF- β 受容体の発現および Smad pathway について比較検討する。
- (3) HCMV 再活性化後の腸管内感染成立機構の解明：HCMV の再活性化後の局所腸管粘膜における HCMV 粒子の感染成立の機序の解明を行う。線維芽細胞や血管内皮細胞は HCMV 粒子の主たる標的細胞とされている。そこで各種炎症性腸疾患の腸管炎症部位と非炎症部位において、HCMV 受容体とされる EGFR および integrin $\alpha v \beta 3$ の発現の差異について組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) IBD患者におけるHCMV再活性化機構の機序

の解明：潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者、健常人の末梢血から単球を単離、サイトカインに加えてLPS刺激による樹状細胞 assay系を樹立させ、このassay系を用いて実験を継続している。TNF- α はCMVの再活性化促進に、IFN- γ はCMV再活性化抑制に作用すること証明された。さらに、CMV再活性化されたマクロファージからは、CMV感染のないマクロファージと比較し、TNF- α 、IL-12、IL-6の産生が増強されることが明らかとなった。CMV感染マクロファージはM1typeの性質を有することが証明された。

(2) HCMV再活性化に伴う樹状細胞やマクロファージの機能変化の解析

上記で記載された樹状細胞やマクロファージをTNF- α 刺激により分化させ、その後TGF- β による刺激を加えた。その結果、CMVが再活性化された樹状細胞やマクロファージにおいては、TGF- β による炎症性サイトカイン産生抑制が認められなかった。その原因として、CMV再活性化による細胞内でのSmad シグナルの抑制が確認された。Smad シグナル

の抑制はNF- κ Bのinhibitorにより、回復することが証明された。

- (3) HCMV再活性化後の腸管内感染成立機構の解明: HCMVの再活性化後の局所腸管粘膜におけるHCMV粒子の感染成立の機序の解明を行う。線維芽細胞や血管内皮細胞はHCMV粒子の主たる標的細胞とされている。平成22年後の検討から、炎症部位でHCMV受容体とされるEGFR, integrin α v β 3, およびPDGFの発現の増強が認められた。さらに、腸管炎症部位組織の免疫染色による検討から、CMVは腸管間質細胞に主として潜伏し、再活性化するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文 10 件: すべて査読あり)

- ① **Nakase H**, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* with TNF- α production from Macrophage -possible link between MAP and immune response in Crohn's disease- Inflammatory Bowel Disease. 2011;17:E140-2. doi: 10.1002/ibd.21750.
- ② **Nakase H**, Uza N, Matsuura M, Chiba T. Importance of CXCL16 as a biomarker for granulocytapheresis in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2011;17:2211-2. doi:10.1002/ibd.21657.
- ③ **Nakase H**, Matsuura M, Chiba T. Potential role of granulocyte/monocyte adsorptive apheresis for ulcerative colitis with concomitant CMV infection. Aliment Pharmacol Ther 2011; 33: 497-8. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04552.
- ④ **Nakase H**, Uza N, Matsuura M, Chiba T. Tacrolimus suppresses IL-12/IL-23p40 in Crohn's disease and heals fistulae refractory to anti-TNF- α therapy. Aliment Pharmacol Ther 2011;33:979-80. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04587.
- ⑤ Uza N, **Nakase H**, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Shimaoka T, Kume N, Minami M, Yonehara S, Ikeuchi H, Chiba T. SR-PSOX/CXCL16 plays a critical role in the progression of colonic inflammation. Gut 2011;60:1494-505. doi:10.1136/gut.2010.221879
- ⑥ Yoshino T, **Nakase H**, Matsuura M, Matsumura K, Honzawa Y, Fukuchi T, Watanabe K, Murano M, Tsujikawa T,

Fukunaga K, Matsumoto T, Chiba T. Effect and Safety of Granulocyte-Monocyte Adsorption Apheresis for UC Patients Positive for Cytomegalovirus in Comparison with Immunosuppressants. Digestion 2011; 84:3-9.

doi: 10.1159/000321911

- ⑦ **Nakase H**, Yamamoto S, Matsuura M, Chiba T. Tacrolimus: rescue therapy or experimental drug for severe ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther 2011;33:413-4. author reply 414-5. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04532.
- ⑧ **Nakase H** Yoshino T, Matsumura K, Honzawa Y, Yamamoto S, Matsuura M, Chiba T. Positive finding of Colonic PCR for CMV-DNA is not false positive but warning for treating patients with UC refractory to immunosuppressive therapies Inflammatory Bowel Disease 2011;17:E13-4. doi: 10.1002/ibd.21401
- ⑨ **Nakase H**, Chiba T. TNF α is an important pathogenic factor contributing to reactivation of cytomegalovirus in inflamed mucosa of colon in patients with ulcerative colitis. -lesson from clinical experiences-. Inflammatory Bowel Disease 2010;16:550-551. doi: 10.1002/ibd.21047
- ⑩ Yoshino T, **Nakase H**, Honzawa Y, Matsumura K, Yamamoto S, Takeda Y, Ueno S, Uza N, Masuda S, Inui K, Chiba T. Immunosuppressive effects of tacrolimus on macrophages ameliorate experimental colitis. Inflammatory Bowel Disease 2010;16 :2022-33. doi: 10.1002/ibd.21318.

[学会発表] (計 12 件: すべて査読あり)

(International meeting)

- ① Matsuura M, **Nakase H**, Honzawa Y, Yamamoto S, Matsumura K, Uza N, Chiba T. Characteristics of colonoscopic features in patients with ulcerative colitis concomitant with cytomegalovirus reactivation. DDW, Chicago, 2011.5.9.
- ② Honzawa Y, **Nakase H**, Matsumura K, Yamamoto S, Uza N, Matsuura M, Chiba T. IL-17 promotes HSP47 expression and intestinal fibrosis in Crohn's disease. DDW, Chicago, 2011.5.8.
- ③ Honzawa Y, **Nakase H**, Matsumura K, Yamamoto S, Uza N, Matsuura M, Chiba

- T. Serum level of heat shock protein 47 could be a useful marker for intestinal fibrosis in patients with Crohn's disease. Gut 2010;59(Suppl III) A38. UEGW, Barcelona, 2010. 10. 26.
- ④ Honzawa Y, **Nakase H**, Matsumura K, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Uza N, Chiba T. Measurement of serum diamine oxidase (DAO) activity can be a predictive factor of disease onset of human IBD. DDW, New Orleans, 2010. 5. 5.
- ⑤ Honzawa Y, **Nakase H**, Matsumura K, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Uza N, Chiba T. Role of Heat shock protein 47 in the pathogenesis of patients with Crohn's disease. DDW, New Orleans, 2010. 5. 4.
- ⑥ Yoshino T, **Nakase H**, Chiba T. Novel immunomodulating effect of tacrolimus: induction of apoptosis on macrophage attenuates immune-mediated colitis. DDW, New Orleans, 2010. 5. 3.
- ⑦ Takeda Y, **Nakase H**, Honzawa Y, Matsumura K, Yamamoto S, Yoshino T, Uza N, Ueno S, Chiba T. Role of osteopontin in acute graft-versus-host disease. DDW, New Orleans, 2010. 5. 2.
- ⑧ **Nakase H** Use of tacrolimus in inflammatory bowel disease. The 4th Korea-Japan Inflammatory bowel disease Symposium Japan, 2010. 1. 23.
- ⑨ Yoshino T, **Nakase H**, Matsumura K, Yamamoto S, Takeda Y, Ueno S, Uza N, Chiba T. Suppression of LPS-induced NF- κ B and p38MAPK activation by FK506 ameliorates murine colitis. 14th international congress of mucosal immunology, Boston, 2009. 7. 5.
- ⑩ Ueno S, **Nakase H**, Chiba T. Activation of Innate immune response by osteopontin prevent onset of spontaneous colitis. DDW, Chicago, 2009. 6. 2.
- ⑪ Yoshino T, **Nakase H**, Matsumura K, Yamamoto S, Takeda Y, Ueno S, Uza N, Chiba T. Regulation of activate macrophages by FK506 attenuates immune-mediated colitis. DDW, Chicago, 2009. 6. 1.
- ⑫ Uza N, **Nakase H**, Chiba T. The Critical role of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor in the pathogenesis of inflammatory bowel

disease. DDW, Chicago, 2009. 5. 31.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲瀬 裕志 (NAKASE HIROSHI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：60362498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし