

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23年 3月 1日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791003

研究課題名（和文）炎症性腸疾患の病態におけるガレクチンの免疫調節機能とその治療戦略

研究課題名（英文）Galectins in Intestinal Mucosa of Pediatric Inflammatory Bowel Disease.

研究代表者

工藤 孝広 (KUDO TAKAHIRO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90365601

研究成果の概要（和文）：

小児炎症性腸疾患（IBD）腸管粘膜における Galectin (Gal) -1, -3, -9 の発現について検討した。対象は初発 IBD 患児 22 例（Crohn 病：CD 10 例、潰瘍性大腸炎：UC 12 例）と正常対照延べ 24 例。内視鏡検査に CD では回腸末端、UC では S 状結腸、正常対照では両部位の粘膜生検を採取、real time-PCR にて Gal-1, -3, -9 の発現を比較検討した。炎症粘膜における Gal-1, -3 の発現は有意差を認めなかった。Gal-9 の発現は、CD において有意に高かった ($p=0.009$) が、UC では有意差はなかった。Gal-9 は、Tim3 を介して炎症抑制に関わる蛋白である。Gal-9 は Crohn 病の病態に関与し、炎症粘膜において炎症の波及を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated to determine galectin-1 (Gal-1), -3, and -9 expression in the normal and inflamed intestinal mucosa and to define its role in pediatric inflammatory bowel disease (IBD). Twenty two pediatric patients with first attack IBD and 15 normal control patients were enrolled in this study. Ten inflamed terminal ileum mucosa of CD, 12 inflamed sigmoid colon mucosa of UC, and 11 normal terminal ileum mucosa and 13 normal sigmoid colon mucosa of normal control were taken under ileocolonoscopy. We extract cDNA from mucosa and determine Gal-1, Gal-3, Gal-9 and GAPDH expression by real-time PCR. Gal-1 and Gal-3 expression in IBD mucosa were no difference. Gal-9 expression in CD mucosa was significantly increased compared with normal mucosa ($p=0.009$), but no difference in UC. Our results suggest that elevated Gal-9 expression in CD terminal ileum mucosa may reflect inhibits expansion of effector Th1 cells to prevent further tissue inflammation via its receptor Tim3. Therefore, Gal-9 may reduce disease activity of CD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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：小児消化器病学 炎症性腸疾患 ガレクチン Crohn 病 Galectin-9

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（IBD）は、腸管に炎症をき

たし再燃寛解を繰り返す慢性炎症性疾患である。わが国で患者数は増加しており、小児期発症も増加している。原因として遺伝子因子、食餌抗原などの環境因子などが考えられており、それらの因子が絡み合う多因子発症説が有力となっている。これまでは、T細胞を中心とする獲得免疫に関して研究されてきたが、近年の NOD2 遺伝子と Crohn 病との相関が報告されて以来、自然免疫や遺伝的背景の関連が注目されてきている。しかし、未だ原因の特定には至っていないため、IBD の病因追究とそれを反映させた治療の確立が早急に必要であり、そのための病態解明を行いたい。IBD は、IL-12 により分化する Th1 細胞、IL-23 により分化する Th17 細胞、IL-4 により分化する Th2 細胞、IL-13 などにより分化する NK 細胞などの獲得免疫と、腸内細菌叢や食餌抗原への初期免疫反応を行う樹状細胞 (DC) やマクロファージなどの抗原提示細胞をはじめとする自然免疫の両者が複雑に絡み合って IBD の発症に関与していると報告されている。

Galectin は糖を認識するドメインを持つ蛋白であるレクチンの一種で、哺乳類では現在のところ 15 種類判明している。近年の研究から Galectin が免疫調節活性や炎症誘発活性を有し、マクロファージや好中球などの自然免疫系細胞と T 細胞などの獲得免疫細胞の両者に関与している蛋白であることが報告されている。また、Galectin-3 (Gal-3) が IBD の腸管粘膜における炎症を調節していると報告され、Galectin と IBD 発症の関連性が示唆される。自然免疫と獲得免疫の両者に関連する抗炎症性蛋白である Galectin-1 (Gal-1)、炎症誘発性蛋白である Gal-3 と IBD の関連についての報告は未だ 1 つのみであり、IBD 病態発症と Galectin との関連についてさらなる検討が必要である。

2. 研究の目的

小児期の IBD (潰瘍性大腸炎、クローン病) 患児と健康小児の血液および内視鏡的生検組織 (大腸病変部粘膜、パイエル板粘膜) を採取し、それぞれ単核球まで分離する。無添加、ガレクチン 1、3 を添加したもの、抗ガレクチン 1、3 抗体を添加したもの、陽性対照として PMA 添加の計 6 条件を設定、48 時間の細胞培養を行う。その後の上清中の炎症性サイトカインである IL-6、Th1 サイトカインである IL-12、IFN γ 、TNF- α 、Th2 サイトカインである IL-4、IL-5、Th17 サイトカイン

ンである IL-17、IL-23、調節性 T 細胞のサイトカインである IL-10、TGF- β 、単球系の分化に必要な GM-CSF、MCP-1 の種々のサイトカインを ELISA を用いて各条件で測定する。また、血球成分中の転写因子としての Th1 細胞は T-bet、Th2 細胞は GATA3、調節性 T 細胞は Foxp3、Th17 細胞は ROR γ t などのシグナル分子の発現を real-time PCR を用いそれぞれ解析する。これら分子の血液中と組織局所の発現と上清中のサイトカイン濃度とが関連しているか、それがガレクチン添加や阻害でどのように変化するのかなどを各条件で比較する。これにより IBD の粘膜へ浸潤している炎症性細胞のサイトカイン発現がガレクチン添加/阻害することで起こる変化を検討することで、IBD の病態とガレクチンとの関連性について解析し、IBD の病態を明らかにする。

3. 研究の方法

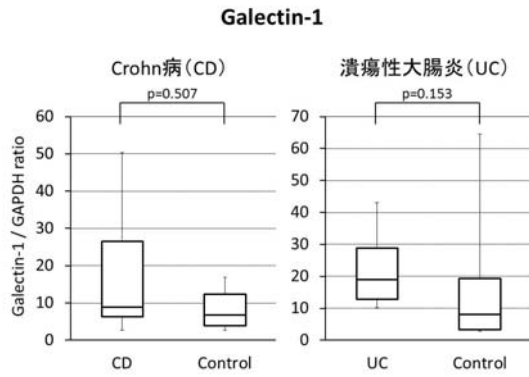
対象は初発 IBD 患児 22 例、Crohn 病 (CD) 10 例、潰瘍性大腸炎 (UC) 12 例であった。正常対照は 15 例、延べ 24 検体であった。下部消化管内視鏡検査中の粘膜生検にて、Crohn 病では回腸末端の炎症部位、潰瘍性大腸炎では S 状結腸の炎症部位、正常対照では両部位の粘膜を採取した。生検した粘膜から cDNA を抽出し、real time-PCR にて Gal-1、Gal-3、Gal-9、GAPDH の発現を測定、比較検討した。症例の詳細を下表に示した。

Patients

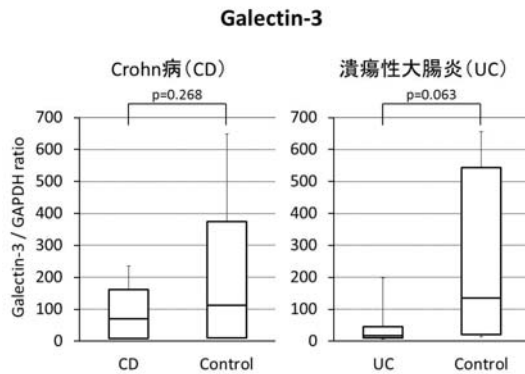
	Crohn病		潰瘍性大腸炎		正常対照
症例数	10		12		15(延べ24)
平均年齢	12歳5か月 6歳0か月-15歳0か月		12歳4か月 7歳6か月-15歳1か月		12歳2か月 6歳11か月-15歳6か月
男/女比	5/5		5/7		11/4
病型	小腸大腸型 8例 大腸型 2例 小腸型 0例	全大腸炎型 9例 左側大腸炎型 3例 直腸炎型 0例	過敏性腸症候群 12例 若年性ホリープ 1例 裂肛 1例 直腸粘膜脱症候群 1例		
重症度	IOIBD 3.1±1.85 PCDAI 30.5±9.63	PUCAI 52.5±17.65			

4. 研究成果

炎症粘膜における Gal-1 の発現は、Crohn 病、潰瘍性大腸炎において、両者とも発現増加傾向であったが、正常対照と比較し有意差を認めなかった (CD; p=0.507, UC; p=0.153, 下図)。



Gal-3 の発現は、Crohn 病、潰瘍性大腸炎において、両者とも発現低下傾向であったが、正常対照と比較し有意差を認めなかった (CD; $p=0.268$, UC; $p=0.063$, 下図)。



Gal-9 の発現は、Crohn 病において有意に高かった ($p=0.009$) が、潰瘍性大腸炎において差はなかった ($p=0.244$, 下図)。

Gal-3 は炎症性腸疾患の上皮細胞において発現が低下していたとの報告があるが、本検討では有意差を認めなかった。Gal-9 は、Tim3 の介して過剰な Th1 細胞や好酸球を抑制しており、炎症抑制に関わる蛋白であることが報告されているが、今回の検討では CD の回腸末端粘膜において Gal-9 の発現が有意に高かった。炎症が惹起されている局所粘膜において、さらなる炎症の波及を抑制している可能性がある。Gal-9 は Crohn 病の病態に関与しており、Gal-9 が CD の活動性を抑制することが示唆され、今後治療法の選択肢の 1 つになる可能性があると考えられた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

工藤孝広 小児炎症性腸疾患の腸管粘膜における Galectin についての検討 第 8 回日本消化管学会総会 2012 年 2 月 11 日 仙台国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 孝広 (KUDOU TAKAHIRO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90365601