

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460960

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患マクロファージのエピゲノム制御機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of macrophage function in inflammatory bowel disease

研究代表者

小林 拓 (Kobayashi, Taku)

北里大学・北里研究所病院・特任准教授

研究者番号：10424144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患における腸管マクロファージのエピゲノム異常の同定を試みた。74個のIBD関連SNPsがopen chromatinの部位に存在した。IBD関連SNPは、クローン病患者組織中のopen chromatin部位に有意に増加していた。腸管マクロファージをターゲットとしたエピゲノム創薬とそれを実現するための画期的DDSの応用のため、骨髄由来マクロファージにおけるHDAC阻害剤の有用性を検討した上で、急性・慢性DSS腸炎に対しての有効性を検討した。ナノ粒子化HDAC阻害剤Belinostatは、腸炎モデルの炎症を抑制する傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that profiling accessible chromatin where transcription factors bind in intestinal cells from affected and non-affected individuals would identify genetically driven regulatory elements that are relevant to IBD pathology. 74 IBD associated SNPs were found in regions of open chromatin. There was statistically significant enrichment of IBD associated SNPs in regions of open chromatin in CD tissue compared to a set of random selected DNA variants with similar architecture. Drug development based on the epigenetic modification was also attempted. Histone deacetylase inhibitors were tested for cytokine inhibition in bone-marrow derived macrophages. Belinostat showed a tendency to ameliorate acute and chronic DSS-induced colitis models.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患 エピゲノム マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases; IBD)とは、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、主として下部消化管に炎症をきたす、難治性かつ原因不明の疾患であるが、長年の研究により、免疫系の異常、特に本来は腸内細菌などの抗原に対し共存的、寛容的であるはずの腸管マクロファージが、何らかの理由で過剰に反応するようになってしまっていることが病態の中心とみなされるようになってきた。IBDにおける疾患感受性遺伝子が数多く見出されてきたが、先天的・遺伝的なゲノムの異常だけではなく、環境因子をはじめとした後天的要因が遺伝子発現を修飾していること=エピジェネティックな変化により、結果として表現形=疾患の発症を来している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では腸管マクロファージにおけるエピジェネティックなサイトカイン産生制御機構に着目し、ヒト炎症性腸疾患患者腸管マクロファージのエピゲノム異常について、ハイスループット次世代シーケンシングを用いて網羅的に解析する。同時に既にマウスを用いた *in vitro* 実験において抗炎症効果を確認しているヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を副作用なく効果的に投与するために、ナノテクノロジーを利用した画期的 DDS を併用することで、エピゲノム分野の知見を臨床に応用することを試みる。

3. 研究の方法

炎症性腸疾患における腸管マクロファージのエピゲノム異常の同定；外科手術検体を用いてヒト炎症性腸疾患腸管マクロファージを分離抽出し、そのクロマチンプロファイルとアセチル化ヒストンのプロファイルを用いて FAIRE-sequence と ChIP-sequence を用いて同定する。

腸管マクロファージをターゲットとしたエピゲノム創薬とそれを実現するための画期的 DDS の応用；マウスモデルを用い、副作用を回避し有効性を高めたナノ粒子化 HDAC 阻害剤の有効性を検討する。

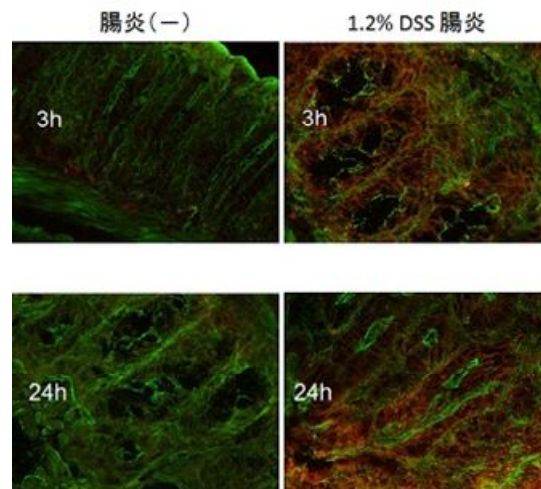
4. 研究成果

炎症性腸疾患における腸管マクロファージのエピゲノム異常の同定；74 個の IBD 関連 SNPs が open chromatin の部位に存在した。IBD 関連 SNP は、クローン病患者組織中の open chromatin 部位に有意に増加していた。対照的に、IBD に関連しない SNP についてはそのような現象は見られなかった。また、腸管を含めたヒトの種々の臓器を FAIRE-seq で解析したところ、

腸管に特異的な regulatory elements が見出された。

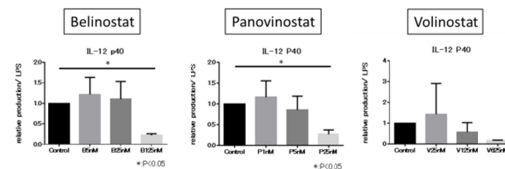
腸管マクロファージをターゲットとしたエピゲノム創薬とそれを実現するための画期的 DDS の応用；まずはじめに、蛍光ラベルした、薬剤を封入していないナノ粒子を用い 1.2%デキストラン硫酸ナトリウム自由飲水にて腸炎作成の上、蛍光ラベルしたナノ粒子を静注し、経時的に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、腸炎マウスに静注したナノ粒子は炎症時に集積が増加した。

腸以外への集積は変わらなかった。以上から、マウス生体において、腸炎を発症すると、静脈内投与したナノ粒子が炎症局所(腸管)に集積しやすく、封入した薬剤の局所へのデリバリーが向上することが期待できると考えられた。



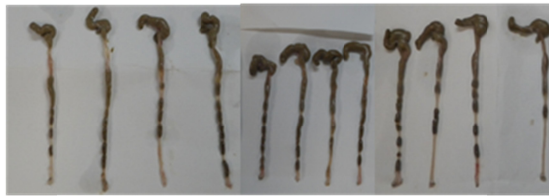
つづいて HDAC 阻害剤を基材としたナノ粒子製剤の検討をおこなった。

・まず骨髓由来マクロファージにおける有用性をはじめに検討した。サイトカイン IL-12p40 産生抑制効果は、Belinostat でもっとも有効であった。(図)



・DSS 腸炎モデルにおける検討

デキストラン硫酸ナトリウムを 6 日間飲水させ、6 日間通常の飲水に戻した上で屠殺し、腸管の状態を確認したところ、ナノ粒子化 Belinostat は急性 DSS 腸炎に対して有効な傾向を認めた(図)。



Control nano Belino DSS DSS + Belino

同様に慢性 DSS モデルにおいても belinostat は有効な傾向を認めている。

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 7 件)

1. Shimizu S, Kobayashi T, Tomioka H, Ohtsu K, Matsui T, Hibi T. Involvement of herbal medicine as a cause of mesenteric phlebosclerosis: results from a large-scale nationwide survey. J Gastroenterol 2016 in press (査読有)
2. Kobayashi T, Suzuki Y, Motoya S, Hirai F, Ogata H, Ito H, Sato N, Osaki K, Watanabe M, Hibi T. First trough level of infliximab at week 2 predicts future outcomes of induction therapy in ulcerative colitis—results from a multicenter prospective randomized controlled trial and its post-hoc analysis. J Gastroenterol 2016 Mar;51(3):241-51. (査読有)
3. Usui S, Hosoe N, Matsuoka K, Kobayashi T, Nakano M, Naganuma M, Ishibashi Y, Kimura K, Yoneno K, Kashiwagi K, Hisamatsu T, Inoue N, Serizawa H, Hibi T, Ogata H, Kanai T. Modified bowel preparation regimen for use in second-generation colon capsule endoscopy in patients with ulcerative colitis. Dig Endosc. 2014 Sep;26(5):665-72 (査読有)
4. Kobayashi T and Hibi T. Ulcerative colitis: Which makes patients happier, surgery or anti-TNF? Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2014 May;11(5):272-3 (査読有)
5. 小林拓 潰瘍性大腸炎とクローン病は何かどう違うのか(1)免疫学的違いは? Medicina 2014.6;51(6):1004-7 (査読有)
6. Steinbach EC, Kobayashi T, Russo SM, Sheikh SZ, Gipson G, Kennedy S, Uno JK, Mishima Y, Borst LB, Liu B, Herfarth H, Ting J, Sartor RB, Plevy SE. Innate PI3K p110 regulates Th1/Th17 development and microbiota-dependent colitis. J Immunol 2014 15;192(8):3958-68 (査読有)
7. Kobayashi T, Steinbach EC, Russo SM, Matsuoka K, Nochi T, Maharshak N, Borst LB, Hostager B, Garcia-Martinez JV, Rothman PB, Kashiwada M, Sheikh SZ, Murray PJ, Plevy SE. NFIL3-Deficient Mice Develop

Microbiota-Dependent, IL-12/23-Driven Spontaneous Colitis. J Immunol. 2014 192(4):1918-27 (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

Kobayashi T. et al. First trough level of infliximab at week 2 predicts future outcomes of induction therapy in ulcerative colitis-A post-hoc analysis of a multicenter prospective randomized controlled trial (Plenary session). ACG Annual scientific Meeting. Honolulu, Hawaii, USA. Oct 20, 2015 (Oral)

Kobayashi T. et al. Usefulness of fecal S100A12 in defining mucosal healing in ulcerative colitis. 3rd AOCC, Beijing, China, June 20, 2015 (Oral)

Weiser M, Raulerson C, Gipson G, Kobayashi T. et al. Genetically driven chromatin organization identifies regulatory SNPs associated with Crohn's disease. Digestive Disease Week 2014, Chicago, USA

Kobayashi T. et al. NFIL3 deficient mice develop IL-12/23 driven spontaneous colitis. 1st AOCC, Tokyo, June 13, 2013. (Oral)

小林拓ほか。IBD 粘膜固有層単核細胞分離技術を応用したエピゲノム、代謝研究とその人種差検討

「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 25 年度第 2 回総会 2015.1.23 (東京)

小林拓ほか。Rising star シンポジウム「炎症性腸疾患感受性遺伝子 NFIL3 の機能とその欠損マウスにおける腸炎の発症機序解明」第 42 回日本臨床免疫学会総会 2014.9.25 (東京)

小林拓ほか。IBD 粘膜固有層単核細胞分離技術を応用したエピゲノム、代謝研究とその人種差検討

「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 25 年度第 1 回総会 2014.7.24 (東京)

小林拓ほか。シンポジウム「IBD の根治的治療を目指して」炎症性腸疾患感受性遺伝子 NFIL3 欠損マウスは自然免疫異常を介し腸炎を自然発症する 第 51 回消化器免疫学会総会 2014.7.11 (京都)

小林拓ほか。NFIL3 欠損マウスにおける自然発症腸炎の免疫学的発症機序 第 100 回日本消化器病学会総会 (東京) 2014.4.26

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 拓 (KOBAYASHI, Taku)
北里大学北里研究所病院・特任准教授
研究者番号：10424144

(2) 研究分担者

中野 雅 (NAKANO, Masaru)
北里大学北里研究所病院・部長 (医師)
研究者番号：50265807

(3) 連携研究者

浅井知浩 (ASAI, Tomohiro)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号：00381731