

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：74314

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860532

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた炎症性腸疾患の病態解明

研究課題名(英文) The investigation of pathophysiology of inflammatory bowel disease with induced pluripotent stem cells

研究代表者

吉野 琢哉 (YOSHINO, Takuya)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第4研究部・研究員

研究者番号：10588875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患( IBD )の発症にepigeneticな変化が関与していると考えられる。そこでIBD患者の腸管組織より抽出したマクロファージと、iPS細胞由来のマクロファージの機能およびDNA methylationを網羅的に比較検討することにより、IBDの病態におけるepigeneticな変化の関与について検討を行った。十分な症例の蓄積は困難であったが、IBD患者からiPS細胞の樹立に成功した。iPS細胞より分化誘導したマクロファージと組織由来のマクロファージのDNAメチル化解析を行ったところ、幾つかの候補遺伝子が見つかった。現在、更なる症例の蓄積およびこれら遺伝子の機能解析に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：Epigenetics would play an important role in the etiology of inflammatory bowel disease (IBD). Therefore, we evaluate the function and DNA-methylation of macrophages derived from iPS cells comparing with those of intestinal macrophages. iPS cells derived from patients with IBD could be established, although the accumulation of sufficient case has been difficult. We found several candidate gene by evaluating DNA-methylation analysis between macrophage derived from iPS cells and intestinal macrophages. At present, we are working on accumulation of further cases and functional analysis of these genes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症性腸疾患 iPS細胞 マクロファージ エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎は再発再燃を繰り返す炎症性腸疾患 (IBD) である。その原因は未だ不明であり、根本的治療法は開発されておらず、病態に基づいた新規治療法の開発が待たれている。海外では家系内発症が多く、遺伝的要因が IBD 発症において重要な役割を果たしていると考えられる。一方、本邦の IBD の家系内発症は海外の報告に比べると非常に低い。また NOD2 に代表されるような、欧米で見いだされた IBD の遺伝子多型の多くは本邦では認められていない。このことから本邦における IBD の病因は遺伝子多型のみで説明することは困難であると考えられる。

ヒトゲノム解析の結果、遺伝子配列異常が原因である疾患は一部に過ぎず、多くは epigenetic な変化によることが分かってきている。本邦における IBD の疫学的調査の結果、1950 年以降、食生活の欧米化に伴い IBD の罹患率は増加の一途を辿っており、IBD の発症には epigenetic な変化が大きく関与していると考えられる。

これまで申請者らは、活性化マクロファージにおける細胞内シグナルを制御することが実験的腸炎の改善につながることを報告してきた。また IBD 患者では炎症性サイトカインを大量に産生する異常なマクロファージが炎症粘膜内に存在し、IBD の病態に深く関与していることも報告されている。このことから epigenetic な変化がマクロファージの機能異常をもたらし、その結果、IBD の発症につながる可能性が高いと考えた。そこで同一 IBD 患者の腸管組織より抽出したマクロファージと、皮膚生検より作製した iPS 細胞由来のマクロファージのゲノムは同じであることから、両者の機能および DNA methylation を網羅的に比較検討することにより、IBD の病態における epigenetic な変化の関与について検討を行うことができると

考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 本邦における IBD 患者から iPS 細胞を樹立し、(2) iPS 細胞から分化誘導されたマクロファージと腸管内マクロファージの機能比較解析による IBD の病態解明を目指すものである。

## 3. 研究の方法

- (1) IBD 患者から皮膚生検を行い、その生検組織を用いてヒト iPS 細胞を樹立する。京大医学部附属病院消化器内科外来通院中の研究参加同意が得られた IBD 患者より皮膚組織を採取し、京大 iPS 細胞研究所 (CiRA, 青井貴之教授御協力) にてヒト iPS 細胞を樹立する。
- (2) 作製したヒト iPS 細胞からマクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞に分化誘導を行う。
- (3) 同一の IBD 患者の炎症腸管粘膜より内視鏡下に組織生検を行い、その生検組織よりマクロファージや樹状細胞を分離抽出する。
- (4) ヒト iPS 細胞由来並びに炎症腸管生検組織由来の免疫担当細胞の機能解析、遺伝子発現について比較検討を行う。
- (5) ヒト iPS 細胞由来並びに炎症腸管生検組織由来の免疫担当細胞におけるエピゲノム解析について次世代シーケンサー等を用いてゲノム網羅的メチル化解析を行う。

## 4. 研究成果

- (1) iPS 細胞の樹立について：iPS 細胞樹立について非常に難渋した。本研究開始時、すでにクローン病患者より小腸部分切除術時に皮膚切開部より皮膚生検を行い、京都大学 iPS 細胞研究所にて iPS 細胞を作成、継代し凍結保存していた。よ

り多くの炎症性腸疾患患者および健康人を対象に、iPS 細胞を樹立することが本研究を遂行するために重要な課題であった。しかしながら皮膚生検は患者に苦痛を伴う検査であり、そのため本研究に参加していただける症例を集めることが困難であった。末梢血から iPS 細胞樹立は、皮膚生検組織に比べると効率が劣るものの樹立が可能であり、末梢血からの iPS 細胞樹立を試みた。結果、さらに 1 名のクローン病患者より iPS 細胞樹立に同意をいただくことができ、iPS 細胞樹立、継代し凍結保存することに成功することができた。

- (2) iPS 細胞からマクロファージや樹状細胞への分化誘導について：マクロファージに分化誘導するために、iPS 細胞を 10% FCS, 5% Horse serum, M-CSF 100ng/ml, 2ME を添加した RPMI-1640 を用いて培養を行った。また樹状細胞に分化誘導するためには、10% FCS, GM-CSF 1000U/ml, 2ME を添加した RPMI-1640 を用いて培養を行った後、完全に iPS 細胞由来樹状細胞に分化誘導するために、10% FCS, GM-CSF 1000U/ml, IL-4 10ng/ml, TNF- $\alpha$  5ng/ml, 抗 CD40 抗体 10 $\mu$ g/ml を添加した RPMI-1640 を用いて培養を行った。培養後、Flow Cytometry にて各種細胞表面マーカーの発現を確認したが、マクロファージへの分化誘導は確認できたが、樹状細胞への分化誘導は確認できなかった。また各種条件を変更し、繰り返し実験を行うも分化誘導は非常に困難であった。CiRA に指導を頂きながら、分化誘導を試みる予定である。
- (3) IBD 患者生検組織から免疫担当細胞抽出：まず手術検体を用いて、炎症粘膜腸管組織よりマクロファージの分離抽出することは可能であった。しかしながら内視鏡下生検組織は、非常に微小である

ため解析を行うのに十分な細胞量の回収が困難であった。従って、対象とする症例を手術症例に絞るべきと考え、現在は iPS 細胞樹立も手術時の皮膚切開部からの皮膚生検組織を用いることを検討している。

- (4) ヒト iPS 細胞由来並びに炎症腸管生検組織由来の免疫担当細胞の機能解析、遺伝子発現：まず健康人および IBD 患者の炎症腸管組織を用いて、マクロファージの機能異常に関与していると考えられる新規遺伝子発現について比較検討を行った。その結果、健康人、潰瘍性大腸炎患者に比べクローン病患者腸管組織の  $\alpha$ -SMA 陽性膠原繊維細胞において IL-34 遺伝子発現が増強していた。IL-34 は、近年発見された分子で、マクロファージの分化・増殖に関与していることが分かっている。マウス線維芽細胞に、IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ による刺激を行った結果、TNF- $\alpha$ のみが用量および時間依存的な IL-34 の発現を誘導した。これらの結果から、クローン病病態の中心的な役割を担うサイトカインの一つである TNF- $\alpha$  が、腸管線維芽細胞からの IL-34 の誘導に関与することが示唆された。さらに IL-34 は腸管組織内において単球・マクロファージの分化誘導および維持を促進し、その結果、クローン病の腸管粘膜炎症を増悪させることに繋がることを示唆された。現在、ヒト iPS 細胞由来並びに炎症腸管生検組織由来のマクロファージにおける IL-34 受容体の DNA メチル化について解析検討中である。
- (5) ヒト iPS 細胞由来並びに炎症腸管生検組織由来の免疫担当細胞におけるエピゲノム解析について：同一患者からヒト iPS 細胞由来並びに炎症腸管生検組織由来のマクロファージにおける DNA メチル化解析を行った結果、幾つかの候補遺伝

子が認められた。個々の患者においてメチル化が生じている部位が違うことも分かった。現在、更なる症例の蓄積およびこれら遺伝子の機能解析に取り組んでいる。

## 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14件、すべて査読あり)

- 1) Yoshino T, Yamakawa K, Nishimura S, Watanabe K, Yazumi S. The predictive variable regarding relapse in patients with ulcerative colitis after achieving endoscopic mucosal healing. *Intest Res*:14:37-42:2016 doi: 10.5217/ir.2016.14.1.37.
- 2) Yoshino T, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Honzawa Y, Kimura M, Koshikawa Y, Madian A, Toyonaga T, Nakase H. Efficacy of Thiopurines in Bio-naïve Japanese Patients with Crohn's Disease: A Single-Center Experience. *Intest Res*:13:266-73:2015 doi: 10.5217/ir.2015.13.3.266.
- 3) Nishimura S, Yoshino T, Fujikawa Y, Watanabe M, Yazumi S. A rare case of ulcerative colitis exacerbated by VZV infection. *Clin J Gastroenterol*:8:390-2:2015 doi: 10.1007/s12328-015-0613-8.
- 4) Minami N, Yoshino T, Matsuura M, Koshikawa Y, Yamada S, Toyonaga T, Madian A, Honzawa Y, Nakase H. Tacrolimus or infliximab for severe ulcerative colitis: short-term and long-term data from a retrospective observational study. *BMJ Open Gastroenterol*:2:e000021:2015 doi: 10.1136/bmjgast-2014-000021.
- 5) Toyonaga T, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Yoshino T, Honzawa Y, Itou A, Namba K, Minami N, Yamada S, Koshikawa Y, Ueda T, Chiba T, Okazaki K. Oseteopontin deficiency accelerates spontaneous colitis in mice with disrupted gut microbiota and macrophage phagocytic activity. *PLoS One*:10:e0135552:2015 doi: 10.1371/journal.pone.0135552.
- 6) Yamada S, Yoshino T, Matsuura M, Kimura M, Koshikawa Y, Minami N, Toyonaga T, Honzawa Y, Nakase H. Efficacy and safety of long-term thiopurine maintenance treatment in Japanese patients with ulcerative colitis. *Intest Res*:13:250-8:2015 doi: 10.5217/ir.2015.13.3.250.
- 7) Hiejima E, Kawai T, Nakase H, Tsuruyama T, Morimoto T, Yasumi T, Taga T, Kanegane H, Hori M, Ohmori K, Higuchi T, Matsuura M, Yoshino T, Ikeuchi H, Kawada K, Sakai Y, Kitazume MT, Hisamatsu T, Chiba T, Nishikomori R, Heike T. Reduced numbers and proapoptotic features of mucosal-associated invariant T cells as a characteristic finding in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*:21:1529-40:2015 doi: 10.1097/MIB.0000000000000397.
- 8) Yoshino T, Nakase H. Not the end of the role of anti-viral therapy in ulcerative colitis with cytomegalovirus reactivation. *Aliment Pharmacol Ther*:39:1247:2014 doi: 10.1111/apt.12709.
- 9) Yoshino T, Nakase H, Minami N, Yamada S, Matsuura M, Yazumi S, Chiba T. Efficacy and safety of granulocytes and

- monocytes adsorption apheresis for ulcerative colitis -A Meta-Analysis Study-. Digestive and Liver Disease 46:219-226:2014 doi: 10.1016/j.dld.2013.10.011.
- 10) Nakase H, Yoshino T, Matsuura M. Role in calcineurin inhibitor for inflammatory bowel disease in the biologics era: when and how to use. Inflamm Bowel Dis.20:2151-6:2014 doi: 10.1097/MIB.0000000000000130.
- 11) Yamada S, Yoshino T, Matsuura M, Minami M, Toyonaga T, Honzawa Y, Tsuji Y, Nakase H. Long-term efficacy of infliximab for refractory ulcerative colitis: Results from a single center experience. BMC gastroenterology:14:80:2014 doi: 10.1186/1471-230X-14-80.
- 12) Fukuchi T, Nakase H, Ubukata S, Matsuura M, Yoshino T, Toyonaga T, Shimizu K, Koga H, Yamashita H, Ito D, Ashida K. Therapeutic effect of intensive granulocyte and monocyte adsorption apheresis combined with thiopurines for steroid- and biologics-naïve Japanese patients with early-diagnosed Crohn's disease. BMC Gastroenterol.13:124:2014 doi: 10.1186/1471-230X-14-124.
- 13) Minami N, Yoshino T, Nakase H. Unique endoscopic findings of colitis-associated colorectal cancer in a patient with ulcerative colitis and Lynch syndrome. J Crohns Colitis. 8:336-7:2014 doi: 10.1016/j.crohns.2013.11.009.
- 14) Honzawa Y, Nakase H, Shiokawa M, Yoshino T, Imaeda H, Matusura M, Kodama Y, Ikeuchi H, Andoh A, Sakai Y, Nagata K, Chiba T. Involvement of interleukin-17A-induced expression of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease. Gut:63:1902-12:2014 doi: 10.1136/gutjnl-2013-305632.
- [学会発表](計14件)
- 1) ○Takuya Yoshino, Shyujiro Yazumi: The usefulness of Salazosulfapyridine for patients with ulcerative colitis who were refractory to mesalazine. ECCO 2016 poster session A-1053, Amsterdam Netherland, 16/March/2016, poster presentation
- 2) ○ Takuya Yoshino, Shyujiro Yazumi, Hiroshi Nakase: The predictive factor regarding relapse in patients with ulcerative colitis after achieving endoscopic mucosal healing. Japan Digestive Disease Week 2015 International Session, Tokyo Grand Prince Hotel New Takanawa Japan, 10/Oct/2015
- 3) ○ Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Minoru Matsuura: IL-34 antibody ameliorates experimental colitis by alternating IL-12p40 expression in macrophages. Digestive Disease Week. AGA institute Research Forum, Washington DC USA, 16/May/2015, May, oral presentation
- 4) ○ Kohei Yamakawa, Takuya Yoshino, Satoshi Nishimura, Kotaro Watanabe, Shujiro Yazumi: The predictive factor for relapse of ulcerative colitis in patients with endoscopic mucosal healing. ECCO2015 digital oral session A1616, Barcelona Spain, 19/Feb/2015, February, oral presentation

- 5) Takuya Yoshino, Minoru Matsuura, Hiroshi Nakase: IL-34 antibody ameliorates experimental colitis by alternating IL-12p40 expression in macrophages. ECCO2015 poster session A1146, Barcelona Spain, 20/Feb/2015, February, poster presentation
- 6) Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, Chiba T: Involvement of IL-34 in intestinal inflammation of Crohn's disease. The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis, Seoul Korea, 21/June/2014, June, poster presentation
- 7) Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, Chiba T: Effect of early induction with immunomodulators on long-term clinical remission in bio-naive patients with Crohn's disease, The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis, Seoul Korea, 21/June/2014, June, poster presentation
- 8) Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: The involvement of IL-34 in intestinal inflammation of Crohn's disease. Digestive Disease Week. AGA institute poster session Tu1741, Chicago USA, 6/May/2014, May, poster presentation
- 9) 吉野琢哉 潰瘍性大腸炎における CMV の意義と対策 第 12 回日本消化管学会、東京 京王プラザホテル、2016 年 2 月 26 日 (招待講演)
- 10) 吉野琢哉、八隅秀二郎 5-ASA 治療強化における Salazosulfapyridine の有用性について、第 102 回日本消化器病学会総会、東京 京王プラザホテル、2016 年 4 月 22 日
- 11) 吉野琢哉、仲瀬裕志、粉川隆文 潰瘍

性大腸炎関連腫瘍に関する high risk 因子の京滋多施設共同検討 第 101 回日本消化器病学会総会、仙台 仙台国際センター、2015 年 4 月 23 日

- 12) 吉野琢哉、松浦稔、仲瀬裕志 当院における生物学的製剤導入後クローン病患者の長期予後について 第 101 回日本消化器病学会総会、仙台 仙台国際センター、2015 年 4 月 25 日
- 13) 吉野琢哉、松浦稔、仲瀬裕志 CMV 合併潰瘍性大腸炎における GMA の重要性について 第 35 回アフエレーシス学会、東京 京王プラザホテル、2014 年 9 月 27 日 (ランチョンセミナー)
- 14) 吉野琢哉、松浦稔、仲瀬裕志 抗 TNF-a 抗体製剤不応・不耐クローン病患者におけるタクロリムスの有用性について 第 100 回日本消化器病学会総会、東京 東京国際フォーラム、2014 年 4 月 2 日

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 吉野琢哉 他、羊土社、IBD 治療薬の選び方・使い方、184-192
- 2) 吉野琢哉 他、文光堂、消化器内視鏡のお悩み相談室、120-148

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 琢哉 (YOSHINO Takuya)

公益財団法人田附興風会

医学研究所 第 4 研究部 研究員

研究者番号：10588875