

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893122

研究課題名(和文) クロウン病腸管線維化におけるHSP47の役割とその制御に基づいた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular based analysis of HSP47 and novel therapies development in intestinal fibrosis of Crohn's disease

研究代表者

本澤 有介 (HONZAWA, Yusuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：90737884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病(CD)腸管線維化において、多くの線維化疾患に関連しているHeat shock protein (HSP)47に着目し、ヒト及びマウスの細胞株及び腸管組織の検討を行った。結果、CD腸管組織ではHSP47以外に、コラーゲンやIL-17Aの発現亢進を認めた。さらに、ヒト筋線維芽細胞株(CCD-18Co)及びマウス線維芽細胞株(NIH3T3)ではIL-17A刺激によりHSP47及びコラーゲンの産生亢進を確認した。また、このIL-17Aを介したHSP47の発現にはJNK経路が関与していた。この事は、IL-17Aを介した線維化メカニズムがCDの腸管線維化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of intestinal fibrosis related to Crohn's disease (CD), we focused heat shock protein (HSP) 47 associated with several fibrotic disease in human and mouse intestinal tissues samples and cell lines. Expressions of HSP47, collagen, IL-17A were elevated in intestinal tissues of patients with CD. Additionally, IL-17A enhanced HSP47 and collagen production in human myofibroblast cell line (CCD-18Co) and mouse fibroblast cell line (NIH3T3). IL-17A-induced HSP47 expression associated with JNK pathway in these cell lines. These results suggested that the mechanisms of IL-17A-induced HSP47 contributed to the pathology of intestinal fibrosis of CD.

研究分野：消化器内科

キーワード：クローン病 炎症性腸疾患 heat shock protein 47 腸管線維化

1. 研究開始当初の背景

近年、生物学的製剤をはじめとした薬物治療の進歩により、炎症性腸疾患(IBD) 患者 Quality of life(QOL)は向上してきた。しかしながら、抗炎症治療による治療を継続しているにもかかわらず、IBD 患者特にクローン病(CD)患者においては小腸及び大腸の狭窄が生じる場合が少なくない。その結果、患者は外科的に腸管切除あるいは腸管狭窄形成を余儀なくされ、また、頻回の手術に伴う短腸症候群をきたす場合もある。従って、CD における腸管線維化の機序解明とそれに基づいた治療を開発することは患者 QOL の向上に貢献するものと考えられる。

臓器線維化に関わるサイトカインとして TGF- 1 が注目されてきたが、同サイトカインは強い抗炎症作用を有し、加えて上皮細胞の再構成にも関与する事から、腸管炎症の制御ならびに上皮再生には必須の分子である。これらの点をふまえ、IBD における腸管抗線維化療法の開発の為に、TGF- 1 以外の線維化に直接関与する分子に着目し、その制御が重要であると考えてきた。

Heat shock protein(HSP)47 は小胞体に局在するストレス蛋白質であり、各種コラーゲンに対する基質特異性を有する。HSP47 をノックアウト(KO)したマウスでは胎生 11.5 日目まで致死となり、発生には必須の遺伝子である事が報告されている。この HSP47KO マウスでは、コラーゲン分子に異常がみられ、コラーゲン線維がほとんどみられなくなり、基底膜は分断される。また、HSP47 の発現は常にコラーゲン産生細胞に認められ、コラーゲンの発現と共役している。

近年、コラーゲンの蓄積を特徴とする各種線維化疾患では HSP47 が極めて強く誘導される事が報告されている。従って、HSP47 の発現制御は、線維化疾患治療において極めて重要と考えられるが、CD 腸管線維化における HSP47 については未だ十分な研究が行われていない。

2. 研究の目的

コラーゲン産生に必須の分子である HSP47 に着目し、腸管局所の HSP47 発現制御機構の解明及び HSP47 局所制御による CD 腸管抗線維化療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)ヒト IBD 患者の腸管組織における HSP47 への関与の検討：

ヒト IBD 患者の手術検体(炎症・非炎症部位)を用いて mRNA を抽出、cDNA を作成し

た。その後、この cDNA を用いて HSP47、コラーゲン、IL-10、TGF- 1、IL-17A、TNF-、IFN-、IL-13 といった各種サイトカインの遺伝子発現を real-time RT-PCR 法によって比較検討した(正常検体はヒト大腸癌手術検体の正常部位を使用した)。また、同時に同検体におけるコラーゲン量について定量も行った。

さらに、同検体における HSP47 の発現の有無や局在について蛍光免疫染色にて検討した。

(2)マウス及びヒト線維芽細胞における HSP47 発現メカニズムの検討：

マウス線維芽細胞株(NIH3T3)、ヒト筋線維芽細胞株(CCD-18Co)を用いて、方法(1)にて発現亢進が確認されたサイトカインによる刺激を行い HSP47、コラーゲンの発現について Western blotting 法にて解析し、またその発現経路について各種阻害剤を用いて検討した。

(3)マウス及びヒト線維芽細胞における HSP47 制御の検討：

マウス線維芽細胞株(NIH3T3)、ヒト線維芽細胞株(CCD-18Co)を用いた HSP47 の発現に関与する経路について検討し、さらに HSP47shRNA を作成し、その制御についても検討を行った。

(4) HSP47 レポーターアッセイの検討：

NIH3T3 細胞において HSP47 遺伝子のプロモーター領域に GFP を組み込んだ細胞を作成し、IL-17A 刺激による GFP の発現を検討した。

4. 研究成果

(1)ヒト IBD 患者の腸管組織における HSP47 への関与の検討：

IBD 手術検体の中でも CD 患者の腸管炎症部位にて HSP47 が CD 腸管非炎症部位、潰瘍性大腸炎(UC)、control と比較して有意に発現亢進を認めた。また、同部位ではコラーゲン及び IL-17A の発現亢進も認められた。一方、線維化に関与するとされる TGF- 1 の遺伝子発現においては IBD 間に差は認められなかった。この結果から、IL-17A と HSP47 の関与の可能性が示唆された。

腸管コラーゲン量についても CD 腸管炎症部位は非炎症部位、UC、control に比較して有意に増加を認めた。さらに蛍光免疫染色における検討でも CD 炎症部位で有意に HSP47 陽性細胞数の増加を認めた。加えて、免疫染色にて筋線維芽細胞に発現している -smooth muscle(SMA)と HSP47 が蛍光免疫染色にて多数 merge することも確認され、HSP47 は腸管では筋線維芽細胞に多く発現していることが明らかとなった。こ

のことより腸管の筋線維芽細胞に発現したコラーゲンが線維化に關与している可能性が考えられた。

(2) マウス及びヒト線維芽細胞における HSP47 発現メカニズムの検討：

マウス NIH3T3 及びヒト CCD-18Co 細胞株に IL-17A による刺激を行ったところ (0, 12, 24 時間後に解析)、HSP47 及びコラーゲンの発現亢進を蛋白レベルで確認した (Western blotting 法)。

さらに IL-17A 経路 (STAT3, NF- κ B, p38, ERK, JNK) の各種阻害剤を用いて HSP47 の発現を検討したところ JNK の阻害にて HSP47 及びコラーゲンの発現が抑制されることを確認し、IL-17A を介した HSP47 の発現には JNK が關与していることが明らかとなった。

(3) マウス及びヒト線維芽細胞における HSP47 制御の検討：

マウス及びヒト HSP47shRNA を作成し、マウス NIH3T3 及びヒト CCD-18Co 細胞株に投与後に IL-17A 刺激を行ったが、HSP47 及びコラーゲンの発現亢進は認められなかった。

(4) HSP47 レポーターアッセイの検討：

NIH3T3 細胞において HSP47 遺伝子のプロモーター領域に GFP を組み込んだ細胞を作成し IL-17A による刺激を行ったところ GFP の発現亢進を確認した。この実験系が樹立されたことより、HSP47 を介したコラーゲンの発現についてサイトカイン以外の物質についても検討が容易になりうることを期待された。

以上より HSP47 を介したコラーゲンの発現には IL-17A の JNK 経路が關与していることが明らかとなった。さらに、HSP47shRNA によりコラーゲンの制御が可能であったことより、将来的な線維化治療の可能性が示唆された。

今後、IBD モデルマウスに対して HSP47shRNA 投与や HSP47 発現に關与するサイトカインの抗体を用いた実験系を検討しており、腸管局所の制御についてさらなる研究を行う予定である。

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 10 件)

Yamada S, Koshikawa Y, Minami N, Honzawa Y, Matsuura M, Nakase H. Ileal follicular lymphoma with atypical endoscopic findings. *Endosc Int Open*. 査読有 2016 ;4 :E323-5.

doi: 10.1055/s-0042-100721.

Koshikawa Y, Nakase H, Matsuura M, Yoshino T, Honzawa Y, Minami N, Yamada S, Yasuhara Y, Fujii S, Kusaka T, Manaka D, Kokuryu H. Ischemic enteritis with intestinal stenosis. *Intest Res*. 査読有 2016; 14: 89-95.

doi: 10.5217/ir.2016.14.1.89.

Hiejima E, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Higuchi H, Saida S, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Izawa K, Kawai T, Yasumi T, Nishikomori R, Heike T. Diagnostic Accuracy of Endoscopic Features of Pediatric Acute Gastrointestinal Graft-versus-host Disease. *Dig Endosc*. 査読有 2016. Epub ahead of print.

doi: 10.1111/den.12604.

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*. 査読有 2015;2:e000021.

doi: 10.1136/bmjgast-2014-000021.

Toyonaga T, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Yoshino T, Honzawa Y, Itou A, Namba K, Minami N, Yamada S, Koshikawa Y, Uede T, Chiba T, Okazaki K. Osteopontin Deficiency Accelerates Spontaneous Colitis in Mice with Disrupted Gut Microbiota and Macrophage Phagocytic Activity. *PLoS One*. 査読有 2015 ; 14;10:e0135552.

doi: 10.1371/journal.pone.0135552.

Yoshino T, Matsuura M, Minami N, Yamada S, Honzawa Y, Kimura M, Koshikawa Y, Madian A, Toyonaga T, Nakase H. Efficacy of Thiopurines in Biologic-Naive Japanese Patients With Crohn's Disease: A Single-Center Experience. *Intest Res*. 査読有 2015;13:266-73.

doi: 10.5217/ir.2015.13.3.266.

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*. 査読有 2015;13:250-8.

doi: 10.5217/ir.2015.13.3.250.

Nakase H, Honzawa Y, Toyonaga T, Yamada S, Minami N, Yoshino T, Matsuura M. Diagnosis and treatment of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection:

importance of controlling mucosal inflammation to prevent cytomegalovirus reactivation. *Intest Res.* 査読有 2014;12:5-11. doi: 10.5217/ir.2014.12.1.5.

Yamada S, Yoshino T, Matsuura M, Minami N, Toyonaga T, Honzawa Y, Tsuji Y, Nakase H. Long-term efficacy of infliximab for refractory ulcerative colitis: results from a single center experience. *BMC Gastroenterol.* 査読有 2014;14:80. doi: 10.1186/1471-230X-14-80.

Honzawa Y, Nakase H, Shiokawa M, Yoshino T, Imaeda H, Matsuura 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. 査読有 2014 ;63:1902-12. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305632.

[学会発表](計12件)

本澤 有介, 越川 頼光, 仲瀬 裕志. MEFV 遺伝子変異を有する炎症性腸疾患における内視鏡所見の検討. 第95回消化器内視鏡学会近畿地方会, 大阪, 2015.11.7
日衛嶋 栄太郎, 仲瀬 裕志, 樋口 浩和, 本澤 有介, 吉野 琢哉, 松浦 稔, 梅田 雄嗣, 平松 英文, 足立 壮一, 河合 朋樹, 八角 高弘, 西小森 隆太, 平家 俊男. 小児期における急性消化管 GVHD の内視鏡所見の検討. JDDW2015, 東京, 2015.10.9
南 尚希, 越川 頼光, 山田 聡, 本澤 有介, 吉野 琢哉, 松浦 稔, 仲瀬 裕志, 堀内 久徳. 腸管炎症における Ra1 の役割. 第52回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2015.7.31

Yamada S, Koshikawa Y, Minami N, Honzawa Y, Matsuura M, Nakase H. Factors associated with therapeutic outcome of ulcerative colitis patients undergoing tacrolimus induction therapy. The 3rd AOCC, Beijing, 2015.6.18

Koshikawa Y, Nakase H, Minami N, Yamada S, Toyonaga T, Honzawa Y, Matsuura M, Chiba T. The characteristics and clinical outcomes of ulcerative colitis patients with concomitant cytomegalovirus infection. The 3rd AOCC, Beijing, 2015.6.18

Minami N, Koshikawa Y, Yamada S, Honzawa Y, Matsuura M, Nakase H. T cell derived osteopontin regulates acute graft-versus-host disease. The 3rd AOCC, Beijing, 2015.6.18

本澤 有介, 松浦 稔, 仲瀬 裕志. 寛解期潰瘍性大腸炎における定量的内視鏡下炎症粘膜評価法の開発. 第89回消化器内視鏡学会総会, 名古屋, 2015.5.30

Koshikawa Y, Nakase H, Minami N, Yamada S, Toyonaga T, Honzawa Y, Matsuura M, Chiba T. The characteristics and clinical outcomes of ulcerative colitis patients with concomitant cytomegalovirus infection. DDW2015, Washington, 2015.5.17

本澤 有介, 越川 頼光, 仲瀬 裕志. 小腸病変を有するクローン病における MEFV 遺伝子変異の意義. 第101回消化器病学会総会, 仙台, 2015.4.23

本澤 有介, 松浦 稔, 仲瀬 裕志. IL-17A によって誘導される HSP47 はクローン病腸管線維化に關与する. 第101回消化器病学会総会, 仙台, 2015.4.24

本澤 有介, 松浦 稔, 仲瀬 裕志. MEFV 遺伝子変異を有する炎症性腸疾患における腸管病変の検討. JDDW2014, 神戸, 2014.10.23

山田 聡, 吉野 琢哉, 越川 頼光, 南 尚希, 本澤 有介, 松浦 稔, 仲瀬 裕志. 難治性潰瘍性大腸炎に対するチオプリン製剤の粘膜治癒および長期寛解維持効果の検討. 第100回消化器病学会総会, 東京, 2014.4.26

6. 研究組織

(1)研究代表者

本澤 有介 (HONZAWA, Yusuke)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号: 90737884

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし