

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07971

研究課題名(和文) クローン病において制御性B細胞が機能低下に至る新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism leading regulatory B cells dysfunction of in Crohn's disease

研究代表者

石原 俊治 (Ishihara, Shunji)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：80263531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私共は、傷害組織で産生されるアデノシン三リン酸(ATP)に着目し、「クローン病(CD)では、ATP刺激に依存して制御性B細胞(Breg)の機能低下が誘発され、その結果として腸炎が増悪する」という仮説を検証した。マウスの脾臓B細胞のIL-10産生におけるATPの影響を検討し、ATP刺激濃度に依存してIL-10産生が抑制されることが示された。また、ATP受容体P2X7の欠損マウスのB細胞では、ATP刺激によるB細胞からのIL-10産生低下が回復することが明らかとなった。本メカニズムは炎症組織でのBreg機能低下に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、様々な自己免疫疾患において、CD同様にBregの機能異常が病態に関わる示されてきた。しかし各々の疾患で「なぜBregの機能が低下しているのか？」という疑問を解明する研究はおこなわれていない。今回、私共が着目した「細胞外ATPによるBregの機能減弱」に関する報告は国内外を通じて皆無である。Bregの機能低下機序を明らかにし、そのメカニズムが特異的にCDの病態に関わること、あるいは本メカニズム深く関わるCDのポピュレーションが存在すること検証できれば、本研究の成果は、これまでと異なる視点からの新知見となり、将来の新規治療開発につながっていくと思われる。

研究成果の概要(英文)：Regulatory B cells (Breg) dysfunction is associated with the pathogenesis of Crohn's disease (CD), but its mechanism is unknown. We focused on extracellular adenosine triphosphate (ATP) produced in colitis tissues and examined its effect on Breg dysfunction in CD patients.

B cells isolated from the spleen of mice were cultured and various concentration of ATP was added to the culture system. The effect of ATP on IL-10 induced by various bacterial antigens was examined, showing that IL-10 production by B cells was suppressed depending on the ATP concentration. We also examined the effect of ATP on IL-10 production by B cells isolated from the mesenteric lymph nodes of ATP receptor P2X7-deficient mice. As a result, the decrease in IL-10 production due to ATP was recovered by P2X7 receptor deficiency in B cells. Thus, ATP reduces IL-10 production via the P2X7 receptor of B cells, suggesting that this mechanism may be involved in Breg dysfunction in association with the pathogenesis of CD.

研究分野：消化器内科

キーワード：制御性B細胞 ATP クローン病 潰瘍性大腸炎 IL-10 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

クローン病 (CD) は腸管の難治性炎症性疾患であり、本邦における患者数の増加は著しい。TNF 阻害剤など様々な抗炎症薬が開発され使用されてきたが、少なからず無効例や効果減弱例が存在し、さらなる CD の病態解明と効果的な新規治療法の開発が急務である。

これまでに私共は、CD をはじめとした腸管炎症の病態研究を継続的におこなってきた。中でも制御性サイトカイン IL-10 を産生する制御性 B 細胞 (Breg) に着目し、腸管炎症の病態における Breg の役割とその破綻による腸炎惹起機序を解析してきた。(Immunology. 2010, Inflamm Bowel Dis. 2014, Inflamm Bowel Dis. 2014, Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2015)。それらの結果から、腸管炎症で誘導される Breg は、IL-10 産生を介して CD の病態に深く関わっており、その機能不全によって腸炎が増悪することが示唆される。しかし、生体内でどのようにして Breg の機能減弱という現象が誘導されるのかは全く不明であった。

近年、傷害組織で産生される細胞外アデノシン三リン酸 (ATP) が、様々な炎症の病態に関与することが示唆されている。この細胞外 ATP の機能は細胞種や病態によって多彩であるが、Breg への関与の報告はない。私共は、ATP 受容体が制御性免疫細胞に高発現しており、ATP 依存性に炎症が増悪するという点に着目した。

2. 研究の目的

Breg 機能の抑制で腸炎が増悪することは明らかであるが、その機能減弱メカニズムは全く不明である。本研究では「炎症粘膜局所で放出される細胞外 ATP の持続暴露によって Breg の機能が低下することを実験的に証明し、その現象が腸炎増悪の原因になるかを検討すること」、さらに「CD 患者だけでなく、潰瘍性大腸炎 (UC) 患者と健常部からの腸管 B 細胞を用いて比較検証することにより、ATP 依存性の腸管 Breg の機能減弱が CD に特異的な現象かを明らかにすること」を目的としている。

3. 研究の方法

研究期間を通じて「細胞外 ATP の持続刺激による Breg の機能低下機構」についての実験を進めてきた。代表者の石原は、研究全体の統括者として、*in vitro*における実験系、モデルマウス作成方法について、分担者の三島と入念に検討しながら研究を施行した。

① 細胞外 ATP の刺激が Breg の機能低下を誘導するか？

慢性炎症局所は持続的に ATP に暴露された環境と想定し、*in vitro*において ATP 処理した腸管 B 細胞に CpG DNA による IL-10 産生を誘導する培養系を作成する。これを用いて腸管 B 細胞の IL-10 産生能とエフェクター T 細胞のサイトカイン制御を指標として Breg 機能を評価する。野生型 (WT) および P2X7 欠損 (KO) マウスの腸間膜リンパ節 (MLN) から分離培養した B 細胞を ATP 処理し CpG DNA で誘導される IL-10 を EIA とフローサイトメトリー (FCM) で解析し ATP 無処理群と比較する。同様に ATP 処理した B 細胞を WT マウス MLN から分離した腸管 CD4+T 細胞と共培養し、CD3/CD28 で刺激後に上清中 IFN γ および IL-17 を測定し、ATP 無処理群と比較する。以上の実験から、腸炎時には、細胞外 ATP が P2X7 を介して Breg の機能を抑制することによりエフェクター T 細胞が抑えきれないという現象が検証可能である。

② ①の結果として腸炎の増悪が誘発されるか？

Rag2^{-/-}マウスに IL-10-KO マウスの T 細胞を移入し慢性腸炎モデルを作成する。このモデルに WT および P2X7-KO マウスの MLN から分離した B 細胞を共移入し、腸炎の活動性の評価をおこなう。本モデルでは、B 細胞における P2X7 発現の有無で腸炎の活動性が評価できることから、慢性腸炎において、ATP が Breg の機能低下を介して腸炎が増悪する可能性を評価できる。

4. 研究成果

① WT マウスの脾臓から B 細胞を分離培養し、種々の細菌抗原によって誘導される IL-10 について、培養系に ATP を添加する実験をおこなった。本実験では、ATP 濃度に依存して B 細胞からの IL-10 産生が抑制されることが明らかとなった。また、ATP 受容体 P2X7 の欠損マウスの MLN から分離した B 細胞を培養し、IL-10 産生における ATP の関与を検討した。その結果、P2X7 受容体欠損によって ATP による IL-10 産生低下が回復した。以上から、ATP は B 細胞の P2X7 受容体を介して IL-10 産生を低下させることが明らかとなり、本メカニズムが炎症組織での Breg 機能低下に関わる可能性が示唆された。エフェクター T 細胞に関する実験は現在施行中である。

② Rag2^{-/-}マウスを用いたモデルマウスの樹立を施行中である。Rag2^{-/-}マウスに IL-10 欠損マウスの T 細胞を移入して慢性腸炎モデルを作成し、本マウスに野生型あるいは P2X7 受容体欠損マウスから分離した B 細胞を共移入するモデルを各々樹立した。本マウスは経時的に腸炎を発症するが、腸炎の発症時期や重症度と与える B 細胞の P2X7 受容体欠損の有無の影響を検討中である。本実験によって、CD をはじめとした慢性腸炎発症において、ATP が P2X7 受容体依存性に Breg 機能低下を誘導するメカニズムが検証できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kataoka Masatoshi, Saitoh Tsukasa, Kawashima Kousaku, Yazaki Tomotaka, Sonoyama Hiroki, Okimoto Eiko, Oka Akihiko, Mishima Yoshiyuki, Mishiro Tsuyoshi, Oshima Naoki, Shibagaki Kotaro, Tobita Hiroshi, Moriyama Ichiro, Ishimura Norihisa, Nagase Mamiko, Hirahara Noriyuki, Tajima Yoshitsugu, Ishihara Shunji	4. 巻 -
2. 論文標題 Primary Extragastrintestinal Stromal Tumor of Greater Omentum with Intraperitoneal Bleeding: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6519-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshima Naoki, Mishima Yoshiyuki, Shibagaki Kotaro, Kawashima Kousaku, Ishimura Norihisa, Ikejiri Fumiyoshi, Onishi Chie, Okada Takahiro, Inoue Masaya, Moriyama Ichiro, Suzumiya Junji, Kinoshita Yoshikazu, Ishihara Shunji	4. 巻 21
2. 論文標題 Differential gene expression analysis of dasatinib-induced colitis in a patient with chronic myeloid leukemia followed for 3?years: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-020-01584-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe C, Nagahori M, Fujii T, Yokoyama K, Yoshimura N, Kobayashi T, Yamagami H, Kitamura K, Takashi K, Nakamura S, Naganuma M, Ishihara S, Esaki M, Yonezawa M, Kunisaki R, Sakuraba A, Kuji N, Miura S, Hibi T, Suzuki Y, Hokari R	4. 巻 66
2. 論文標題 Non-adherence to Medications in Pregnant Ulcerative Colitis Patients Contributes to Disease Flares and Adverse Pregnancy Outcomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 577 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-020-06221-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mishima Yoshiyuki, Ishihara Shunji	4. 巻 21
2. 論文標題 Molecular Mechanisms of Microbiota-Mediated Pathology in Irritable Bowel Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8664 ~ 8664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakase Hiroshi, Matsumoto Takayuki, Matsuura Minoru, Iijima Hideki, Matsuoka Katsuyoshi, Ohmiya Naoki, Ishihara Shunji, Hirai Fumihito, Wagatsuma Kouhei, Yokoyama Yoshihiro, Hisamatsu Tadakazu	4. 巻 4
2. 論文標題 Expert Opinions on the Current Therapeutic Management of Inflammatory Bowel Disease during the COVID-19 Pandemic: Japan IBD COVID-19 Taskforce, Intractable Diseases, the Health and Labor Sciences Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000510502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto Kenichi, Kawashima Kousaku, Fukunaga Mai, Kotani Satoshi, Sonoyama Hiroki, Oka Akihiko, Mishima Yoshiyuki, Oshima Naoki, Ishimura Norihisa, Ishikawa Noriyoshi, Maruyama Riruke, Ishihara Shunji	4. 巻 60
2. 論文標題 Intermittent Purpura Development Associated with Leukocytoclastic Vasculitis Induced by Infliximab for Crohn's Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 385~389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5340-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mishima Yoshiyuki, Sonoyama Hiroki, Ishihara Shunji, Oshima Naoki, Moriyama Ichiro, Kawashima Kousaku, Kinoshita Yoshikazu	4. 巻 100
2. 論文標題 Interleukin-33 delays recovery of mucosal inflammation via downregulation of homeostatic ABCG5/8 in the colon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 491~502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0329-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Shunji, Kawashima Kousaku, Fukuba Nobuhiko, Tada Yasumasa, Kotani Satoshi, Mishima Yoshiyuki, Oshima Naoki, Kinoshita Yoshikazu	4. 巻 99
2. 論文標題 Irritable Bowel Syndrome-Like Symptoms in Ulcerative Colitis Patients in Clinical Remission: Association with Residual Colonic Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 46~51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000494412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sonoyama Hiroki, Kawashima Kousaku, Ishihara Shunji, Kotani Satoshi, Fukuba Nobuhiko, Oka Akihiko, Kusunoki Ryusaku, Tada Yasumasa, Mishima Yoshiyuki, Oshima Naoki, Moriyama Ichiro, Yuki Takafumi, Onishi Koji, Kinoshita Yoshikazu	4. 巻 64
2. 論文標題 Capabilities of fecal calprotectin and blood biomarkers as surrogate endoscopic markers according to ulcerative colitis disease type	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 265 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-92	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡明彦、川島耕作、園山浩紀、三島義之、石原俊治
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の治療目標は組織学的治癒か？ - 長期臨床的寛解維持予測における内視鏡的完全治癒と組織学的治癒の比較検討 -
3. 学会等名 第113回日本消化器病学会中国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大嶋直樹、川島耕作、石原俊治
2. 発表標題 高齢潰瘍性大腸炎患者に対するタクロリムス投与における腎機能障害の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三島 義之 (Mishima Yoshiyuki) (30397864)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------