

## 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 25 年 8 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591486

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患患者における Th17 分化誘導異常の解析と制御法に関する研究

研究課題名（英文） Research for the mechanisms of induction and differentiation of mucosal immune cells in the patients with inflammatory bowel diseases

研究代表者

水島 恒和（MIZUSHIMA TSUNEKAZU）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00527707

研究成果の概要（和文）：

炎症性腸疾患（IBD）患者の炎症部では、マクロファージ様の形態を呈し、単球系マーカーの CD14 と樹状細胞マーカーの CD11c 両者が陽性である CD14+CD11c+細胞が増加していた。IBD 患者の非炎症部において、CD14+CD11c+細胞は非 IBD 患者と著変を認めなかった。CD14+CD11c+細胞は、腸管粘膜固有層において CD14-CD11c+細胞、CD14-CD11c-細胞に比し、有意に Th17 細胞を誘導していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In the inflammatory site of inflammatory bowel diseases (IBD) patient, CD14+CD11c+ cells, which showed the morphology of macrophage and were double positive for a marker of monocyte (CD14) and a dendritic cells (CD11c), has significantly increased. In the non-inflammatory site, the population of CD14+CD11c+ cells was not significantly different from that in non-IBD patient. In lamina propria, Th17 cells were significantly induced by CD14+CD11c+ cells rather than CD14-CD11c+ cells and CD14-CD11c- cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：炎症性腸疾患

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（IBD）である潰瘍性大腸炎、クローン病は 10-20 歳代の若年層に好発する腸管の難治性慢性炎症性疾患である。IBD の発症には遺伝的素因と環境的要因が関与していると考えられているが、その病因は未だ明らかではない。近年の研究では、消化管における腸内細菌叢に対する免疫応答の異常が、IBD の病因に重要な役割を果たしている

ことが明らかになりつつある (Coulombe F. Lancet, 2009)。近年発見されたヘルパー T 細胞の新しいサブセットである Th17 細胞は、IL-6, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン産生を誘導する IL-17 を産生し、ある種の細胞外病原体に対する生体防御機構や、多発性硬化症や関節リウマチなど自己免疫が関与する疾患との関連が注目されている (Bettelli E. Nature 2008, Becker C. J Clin Invest, 2003,

Hue S. J Exp Med, 2006). 消化管では Th17 細胞は恒常的に存在し、獲得免疫の初期段階を担っていると考えられており、IBD においてもその重要性が報告されつつある (Abraham C. Inflamm Bowel Dis, 2009). われわれは IBD モデルマウスを用いて、IBD の病因の解明やそれに基づく新規治療法開発のために、以下のような研究を行ってきた。

1. Th2 型 IBD モデルマウスである TCR $\alpha$  鎖欠損 (TCR $\alpha$   $-/-$ ) マウスにおいては、成分栄養 (Elemental Diet; ED) による腸炎発症抑制に、腸内細菌の変化と消化管粘膜固有層 (LP) の抗体産生細胞数減少が関与している (Kishi D. J Immunol, 2000).
2. TCR $\alpha$   $-/-$  マウスと同様の Th2 型 IBD モデルマウスである common  $\gamma$  chain 欠損マウスにおいては、IL-6 が腸炎発症に重要な役割を果たしており、抗 IL-6 受容体抗体の投与により病態が改善される (Kai Y. Gastroenterology, 2005).
3. Th1 型 IBD モデルマウスである IL-10 遺伝子欠損 (IL-10  $-/-$ ) マウスにおいては、新しい免疫調節剤 FTY720, Everolimus, roxithromycin, KRP-203 投与により、LP における病的 CD4 陽性リンパ球数、産生サイトカインの減少、慢性腸炎の病態改善が得られる (Mizushima T. Inflamm Bowel Dis, 2004, Matsuda C. Clin Exp Immunol, 2007, Tamagawa H. Inflamm Bowel Dis, 2007, Song J. J Pharmacol Exp Ther, 2008).

また、共同研究者らは、モデルマウスにおいて通常の TLR を介する経路以外の刺激により活性化される CD70 陽性 CD11c 陽性 DC が腸管特異的に存在することを示した。この DC の活性化には腸内細菌から提供されるアデノシン三リン酸 (ATP) が重要であり、活性化された CD70 陽性 CD11c 陽性 DC により、T 細胞の Th17 細胞への分化が誘導される。また、ATP の投与により、T 細胞依存性の腸炎悪化が確認されている (Atarashi K. Nature, 2008).

2. 研究の目的  
本研究の目的は、ヒトの消化管における Th17 細胞誘導メカニズムと IBD 発症との関連を明らかにすることである。さらには、現在根本的な治療法の確立されていない IBD に対して、その発症に関与する Th17 細胞の制御という新しいコンセプトに基づく治療法も目的とする。
3. 研究の方法  
同意が得られた IBD 患者の手術検体を用いて腸管粘膜免疫担当細胞の解析を行う。
  - ・手術検体より得られた腸管粘膜の digestion を行い、濃度勾配法により腸管粘膜免疫担当細胞 (リンパ球、マクロファージ、DC) を分離する。
  - ・IBD 患者における腸管粘膜免疫担当細胞の

分画につき、細胞数・割合の検討を行う。

- ・表面マーカーを利用した flow cytometry を行う。
- ・腸管粘膜固有層単核細胞の RT-PCR により各種サイトカインなどの遺伝子発現を解析する。

非 IBD 患者の手術検体に関しても同様の解析を行い、IBD 患者との比較を行う。単離された腸管 DC に ATP など各種経路を介する刺激とその阻害剤や ATP 分解酵素を加え、末梢血から単離精製したナイーブ細胞と共培養する。共培養 5 日後に T 細胞を回収し、qPCR により IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17 の発現を解析し Th1, Th2, Th17, Treg 細胞への分化誘導およびそれらの抑制が生じるかを検討する。

4. 研究成果  
最初に非 IBD 患者より腸管粘膜固有層単核球 (リンパ球、マクロファージ、樹状細胞 (DC)) を分離した。FACS により FSC, SSC で展開し、抗原提示細胞分画を解析した。さらに抗原提示細胞分画を単球系マーカーの CD14 と樹状細胞マーカーの CD11c で展開したところ、① CD14+CD11c+, ② CD14-CD11c+, ③ CD14-CD11c- という 3 つのサブポピュレーションに細分化された。これら 3 つのサブポピュレーションの細胞をギムザ染色で検討したところ、① CD14+CD11c+ の細胞集団は細胞質内に空胞を伴いマクロファージ様の形態を呈していた。さらに 3 つのサブポピュレーションのサイトカイン産生を RT-PCR で評価したところ① CD14+CD11c+ の細胞集団で優位に IL-6, IL-23 の mRNA 発現を認めた。

3 つのサブポピュレーションと末梢血由来のナイーブ T 細胞を 4 日間共培養し、T 細胞の分化誘導機能の解析を行った。細胞内サイトカイン染色により IFN- $\gamma$ , IL-17 の産生を評価し、Th1 細胞、Th17 細胞の誘導能を評価したところ、① CD14+CD11c+ の細胞集団は他の 2 群と比較して有意に Th17 細胞を誘導することが明らかになった。

非 IBD 患者検体で確認された Th17 細胞を誘導する① CD14+CD11c+ 細胞集団について IBD 患者で検討を行った所、非炎症部においては非 IBD 患者と著変を認めないが、炎症部に関しては① CD14+CD11c+ 細胞集団の著増を認めた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Inflamm Bowel Dis Lectin-based Immunoassay for Aberrant IgG Glycosylation as the Biomarker for Crohn's Disease. Shinzaki S Kuroki E,

- Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy SE, Takehara T, Miyoshi E. E Department of Molecular Biochemistry and Clinical Investigation, Osaka University Graduate School of Medicine. 19 (2): 321-331 .2013
2. Inflamm Bowel Dis Deficiency of N-acetylgalactosamine in O-linked oligosaccharides of IgA is a novel biologic marker for Crohn's disease. Inoue T Iijima H, Tajiri M, Shinzaki S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Nakajima S, Iwatani H, Nishida T, Mizushima T, Yasui T, Isaka Y, Kanto T, Tsujii M, Miyoshi E, Wada Y, Takehara T. E Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of Medicine .2012
- [学会発表] (計 16 件)
1. Takeyama H. Mizushima T., Nakajima K., Takahashi H., Nishimura J., Takemasa I., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Nezu R., Ito T., Doki Y., Mori M. A case of Crohn's colitis-associated rectal cancer following after sporadic adenocarcinoma in adenoma. 6th Korea-Japan IBD Symposium2012 .1.28(Tokyo)
  2. Takahashi H. Mizushima T., Ito T., Kai Y., Takemasa I., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Bcl-2 retards the development of chronic colitis in interleukin-10 gene-deficient mice. XXIV ISUCRUS Biennial Congress 2010.3.19- 3.23 ( Seoul)
  3. Mizushima T. Nakajima K., Kai Y., Yamamoto H., Ikeda M., Takemasa I., Sekimoto M., Nezu R., Ito T., Doki Y., Mori M. Malignancy in Crohn's disease:The incidence and clinical characteristics in Japan .XXIV ISUCRUS Biennial Congress .2010.3.19-3.23 ( Seoul)
  4. Nakajima K. Hirota M., Mizushima T., Nezu R. Minimally invasive surgery for IBD: an update. Japan-Korea IBD Symposium .2010.10. 2(Seoul)
  5. 水島恒和、中島清一、関本貢嗣、山本浩文、池田正孝、竹政伊知朗、西村潤一、根津理一郎、土岐祐一郎、森正樹 : P0-5-5 クロウン病診療における外科の役割、第 67 回 日本消化器外科学会総会、2012. 7. 18- 7. 20 (富山)
  6. 水島恒和、中島清一、関本貢嗣、山本浩文、池田正孝、竹政伊知朗、西村潤一、根津理一郎、伊藤壽記、土岐祐一郎、森正樹 : PS-077-8 当院におけるクロウン病症例に対する麻酔下肛門周囲検査の現状、第 112 回 日本外科学会定期学術集会、2012.4. 12- 4. 14 (千葉)
  7. 渡辺和宏、佐々木巖、福島浩平、舟山裕士、杉田昭、二見喜太郎、池内浩基、根津理一郎、水島恒和、亀岡信悟、楠正人、吉岡和彦、畠山勝義、藤井久男、渡邊聡明、渡邊昌彦、渡辺守 : クロウン病の手術症例における腸管不全 (短腸症候群) の実態—多施設共同研究—、第 112 回 日本外科学会定期学術集会、2012.4. 12- 4. 14 (千葉)
  8. 廣田昌紀、根津理一郎、中島清一、水島恒和、松並展輝、三方彰喜、清水潤三、金鏞国、森島宏隆、相馬大人、金浩敏、李谷友香子、大澤日出樹、荒木麻利子、松浦雄祐、三宅祐一郎、高島弘幸、長谷川順一 : PS-077-7 クロウン病に対する直腸切断術術後の感染性合併症対策の意義、第 112 回 日本外科学会定期学術集会、2012. 4. 12- 4. 14 (千葉)
  9. 竹山廣志、水島恒和、関本貢嗣、山本浩文、池田正孝、中島清一、竹政伊知朗、西村潤一、土岐祐一郎、森正樹 : PS-078-2 Crohn 病における活動性と凝固線溶系マーカーの検討、第 112 回 日本外科学会定期学術集会、2012.4.12-4.14 (千葉)
  10. 中島清一、根津理一郎、廣田昌紀、水島恒和、関本貢嗣、土岐祐一郎、森正樹 : Crohn's colitis に対する minimally invasive extensive colectomy の意義、第 66 回 大腸肛門病学会、2011. 11.25-11.26 (東京)
  11. 水島恒和、池田正孝、中島清一、西村潤一、竹政伊知朗、甲斐康之、山本浩文、関本貢嗣、土岐祐一郎、森正樹 : クロウン病術後症例に対する合成 Xa 阻害薬の使用経験、第 66 回 日本消化器外科学

会、2011.7.13-7.15 (名古屋)

12. 中島清一、根津理一郎、廣田昌紀、水島恒和、関本貢嗣、伊藤壽記、土岐祐一郎、森正樹：クローン病に対する minimally invasive extensive colectomy の治療成績、第 66 回 日本消化器外科学会、2011.7.13-7.15 (名古屋)
13. 中島清一、根津理一郎、廣田昌紀、水島恒和、関本貢嗣、伊藤壽記、土岐祐一郎、森正樹：炎症性腸疾患に対する用手補助腹腔鏡下手術の意義、第 111 回 日本外科学会、2011.5.26-5.28 (紙上開催)
14. 廣田昌紀、根津理一郎、中島清一、水島恒和、松並展輝、三方彰喜、森島宏隆、金鏞国、西村潤一、相馬大人、長谷川順一：クローン病に対する直腸切断術時の術後感染性合併症対策、第 111 回 日本外科学会、2011.5.26-5.28 (紙上開催)
15. 水島恒和、中島清一、甲斐康之、玉川浩司、松田宙、山本浩文、池田正孝、竹政伊知朗、原口直紹、関本貢嗣、井上善文、根津理一郎、伊藤壽記、土岐祐一郎、森正樹：クローン病長期 HPN 症例の検討、第 96 回 日本消化器病学会総会、2010.4.22-4.24 (新潟)
16. 中島清一、根津理一郎、廣田昌紀、西村潤一、甲斐康之、水島恒和、関本貢嗣、伊藤壽記、土岐祐一郎、森正樹：潰瘍性大腸炎に対する低侵襲手術の標準化-learning curve の解析を通じて、第 110 回 日本外科学会定期学術集会、2010.4.8-4.10 (名古屋)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水島 恒和 (MIZUSHIMA TSUNEKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：00527707

### (2) 研究分担者

伊藤 壽記 (ITOU YOSHINORI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20231152

竹田 潔 (TAKEDA KIYOSHI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20309446

中島 清一 (NAKAJIMA KIYOKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：30432537