

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：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860562

研究課題名(和文)炎症性腸疾患モデルマウスを用いたTreg移入療法の検証(根本的治療の確立へ)

研究課題名(英文)Therapeutic potential of transferring of Tregs to SAMP1 mice

研究代表者

石川 大(Ishikawa, Dai)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30622675

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)：当研究は、機能保全されたTregをSAMP1に移入することにより、腸炎の発症ならびに病勢への影響を検証することを目的としていたが、移植したTregの移入だけでは小腸炎の改善、過剰免疫の抑制に明らかな影響を与えることはできなかった。そこで、Tregの機能改善に注目し、無菌マウス(GF)と通常環境下マウス(SPF)にDSS溶液を内服させる実験を行った。DSSはGFマウスに有意に激しい炎症を起こすが、GFマウスにSPFマウスの腸内細菌を移入したのちDSSを投与すると6日後には腸炎が抑制された。これは腸内細菌がGFマウスのTreg機能の回復に関わり、炎症性の過剰免疫を抑制した示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：The commensal flora plays an important role in the intestinal inflammation. However, we have recently shown that commensal bacteria are not essential for the development of SAMP1 ileitis. In this study, we demonstrate that cotransfer of SPF CD4+ cells prevent the colitis induced by GF SAMP CD4+ cells. GF nTreg cells indicate lower production of immunoregulatory cytokines in culture stimulation assay and significantly impaired suppressive capacities both in the proliferative responses and in inducing the colitis. GF SAMP mice orally receiving enteric flora from SPF mice develop significant colitis in acute phase due to a defect in nTreg cells, but rapidly expanded Treg cells suppressed later colitis. Furthermore, they prevented developing DSS-induced colitis. Our results provide evidence that the absence of commensal flora lead to impaired functions of nTreg cells, which contributes to the development of colitis but not ileitis in SAMP mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：潰瘍性大腸炎、制御性リンパ球、腸内細菌叢、糞便移植療法、SAMP1マウス、無菌マウス、クローン病モデルマウス、細胞移入療法

1. 研究開始当初の背景

近年生物製剤の登場により IBD 治療は大きく前進したものの 2 次無効例の増加や、長期的には手術を必要とする症例数は減少しておらず、長期予後の改善については未だ不透明である。その理由として、「生物製剤は異常な免疫システムを是正できない。」ということに尽きる。病変局所において炎症、抑制性のケミカルメディエーターや免疫関与細胞が相互に影響しあっている。その複雑な免疫カスケードの末梢である特定の炎症性サイトカインのみを抑制することは、短期的な炎症改善効果はあるものの、根本である異常な免疫バランスは是正されず、永続的な効果は期待できない。生物製剤含め、現在の薬物療法の限界と思われる。

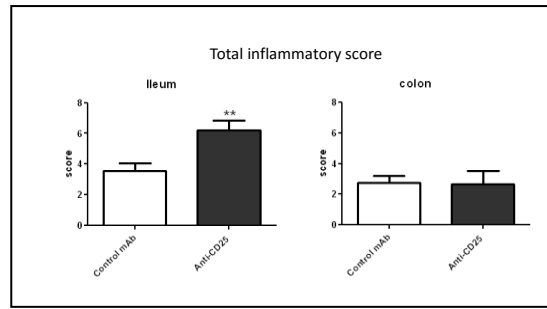
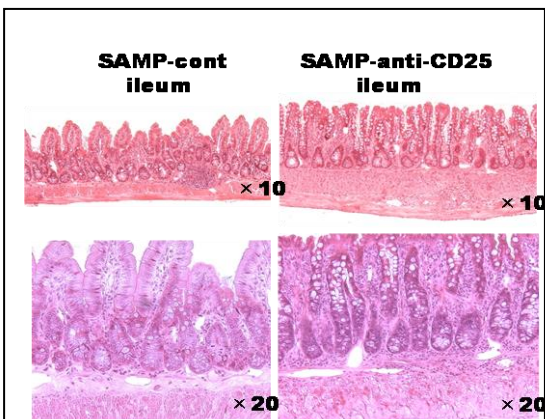
そこで、我々は根本的、永続的治療を目指すべく過剰免疫を寛容する機序に重要な役割を果たしている Treg に注目した。1 型糖尿病、SLE、多発性硬化症などの自己免疫性疾患では Treg 数の低下、機能異常が明らかにされ、1 型糖尿病患者に対して臨床応用が検討されている。

Diabetes. 2012 May;61(5):1180-91. Epub 2012 Mar 8.

これまでに IBD の免疫異常のメカニズムの解明や生物製剤治療の治療効果判定に対して SAMP1 は広く用いられてきた。Inflamm Bowel Dis. 2011 Dec;17(12):2566-84.我々は以下のように SAMP1 の小腸炎の発症や増悪に Treg が関与していることを証明し、さらに生体内において Treg の機能低下を証明し報告した。これは我々が知る範囲では IBD 患者そして、IBD モデルの動物実験を通して Treg の機能低下を証明した初めての知見であり、IBD 患者の Treg が他の自己免疫性疾患の Treg と同様に機能異常が存在することが示唆された。

Mucosal Immunol. 2012 Jul 11. doi: 10.1038/mi.2012.67.

図 1) SAMP1 に抗 CD25 抗体を投与し、生体内で Treg を枯渇させた。6 週間の抗体投与後、病理組織学的に有意差を持って小腸炎が増悪した。Treg が小腸炎の病勢に関与していることを証明した。



SAMP1 の Treg の機能低下を証明するため、炎症性 Tcell 移入により重症の腸炎が生じた SCID マウスに対して二次的に正常コントロールマウス (AKR) と SAMP1 から取り出した Treg (CD4+CD25+cells) を移入する実験を行った。Treg を移入しない全例で激しい下痢、血便の継続により体重減少を認め、40 日後の生存率は 0%であったのに対し、AKR の Treg を移入した群では、体重は順調に回復し、40 日後生存率は 100%であった。一方 SAMP1 の Treg は炎症を十分には抑制できず、移入した群は緩徐に体重減少を認め生存率は 60%であった。

(第 28 日の体重減少率 : AKR +4.3±0.34%、SAMP1 -7.8±0.64%、移入なし -16.3±0.91%)
以上の実験により SAMP1 の生体内での機能低下を証明し、生体内での制御性 T リンパ球の機能低下は小腸炎の発症・増悪に関与していること、そして機能保持された Treg が腸管炎症を改善させる治療効果を持つことを明らかにした。

2. 研究の目的

前述の様に SAMP1 の小腸炎の発症、増悪に病的な Treg が関与していることは明らかであり、機能保持された Treg を移入することは根本から炎症に偏った異常な免疫バランスを是正できると考える。本研究では SAMP1 に正常化した Treg を移入する細胞治療実験を行う。SAMP1 自身から得た CD4+cell をいくつかの薬剤と分離培養することで機能的に保持された大量の Foxp3+Treg を得、これを SAMP1 に定期的かつ長期的に移入し治療効果を検証する。治療効果が十分に得られない場合においては、移入する Treg の質、量を再検討するとともに原因を明らかにする。

本研究は将来的治療戦略である Treg を用いた免疫療法の実用化をめざす。

本研究で使用する SAMP1 は免疫異常システム、粘膜バリアーの脆弱性など多くの病的因子を持つ自然発症の IBD モデルとして広く研究されている。サイトカインを遺伝子操作したり、薬剤により大腸炎を誘発するような特定の因子に局限した IBD モデルとは大きく異なり、病理組織学的にもクローン病と類似点が多く、極めてヒトクローン病に酷似したマウスといえる。局所の炎症の改善のみならず、異常免疫システムの根本的改善を狙う

本研究においては、多因子誘因の SAMP1 モデルが最適と考える。

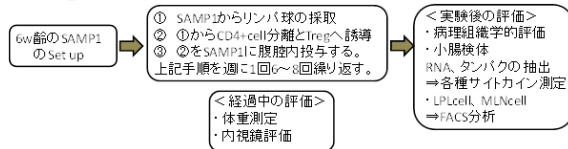
難治性 IBD において、従来の免疫抑制を中心とした治療は効果が非常に乏しく、易感染性、薬剤抵抗性など様々な問題が存在する。生物製剤についても二次無効や経時的な効果減弱例が報告されており、血液悪性腫瘍の発生など長期投与に対する安全性も確立されていない。さらにこれら新規治療法は高額な費用を要することも欠点として挙げられる。

当研究で目指す Treg を用いた細胞免疫療法は患者自身の細胞を用いることで、既存の薬剤治療で問題となるさまざまな副作用は除外され、その安全性は高い。根本的治療の確立は 14 万人を超える難治病患者の渴望するところであり、医療費削減にも多大な貢献となる。また、日本独自の血球除去療法とのコンビネーションセラピーも可能と考えられ、世界に先駆けた新規の治療への発展が大いに期待できる。

3. 研究の方法

SAMP1 の腸管所属リンパ節、脾臓から採取したリンパ球から CD4+cells をレチノイン酸、IL-2、TGF-β を加え分離培養し、多量の機能保持された Treg を得る。この Treg を小腸炎が発症する前の SAMP1 に腹腔内投与を開始し、週 1 回投与を 6 週から 8 週継続する。細胞移入治療経過中は体重変化、内視鏡検査で評価し、実験後は小腸炎を病理組織学的評価、各種サイトカインの分析などから治療効果を多角的に検証する。実験の完遂に向けて研究チームの協力医と定期的に意見交換の場を設け、出来るだけ早期に問題点を解決する。また、SAMP1 を用いた研究で多くの経験を持つ施設と積極的に連携して実験の質の向上を目指す。

我々の施設において SAMP1 マウスは 2008 年よりヤクルト中央研究所より既に提供されており、実験開始は可能である。採択後 Bleeding を開始し 6 週齢雄雌 4, 4 頭を set up した。



Treg の増殖培養

自然発症マウスであるヘルパー CD4+cells から Foxp3+Treg をレチノイン酸、IL-2、TGF-β を加え培養して作り出す方法はすでに報告、確立されている。

Immunity. 2009 Apr 17;30(4):471-2; author reply 472-3.

この方法に基づき

1) SAMP1 の腸管所属のリンパ節、脾臓からリンパ球を採取。

2) FACS(BDR II) または MACS 細胞分離シス

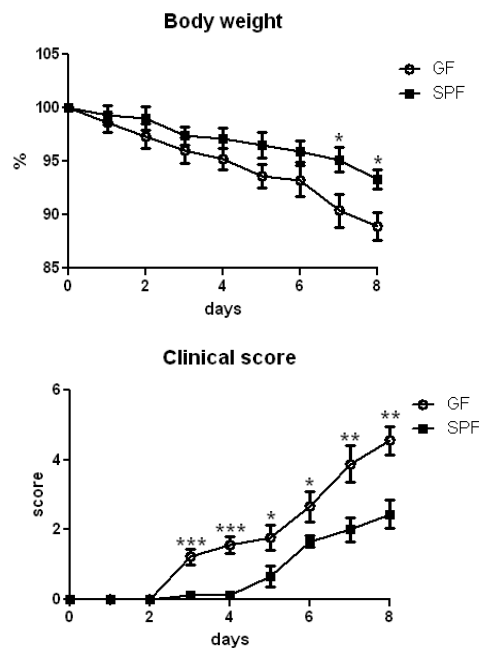
テムを使い CD4+cell を分離する。2×10⁸ 個目標。

3) これを CD3、CD28 の細胞刺激下にレチノイン酸、IL-2、TGF-β を加え培養する。72 時間培養後培養液の状態を確認したのち、24 時間培養追加する。

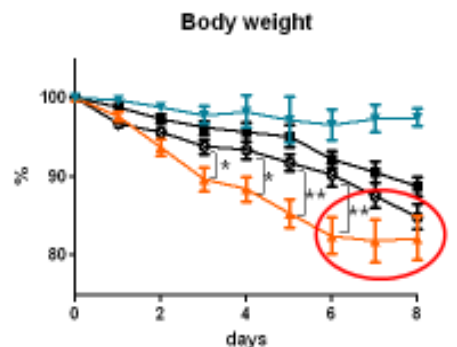
4) 一部の細胞を FACS で Foxp3+ に誘導されているか確認する。

4. 研究成果

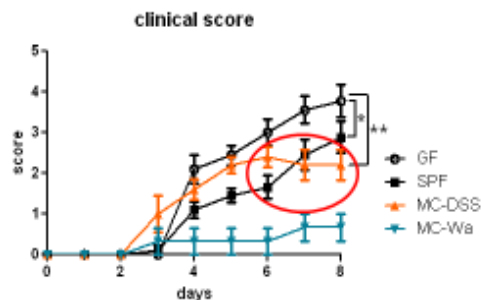
当研究は SAMP1 を用いた多くの研究報告、実績を有する Case Western Reserve University digestive Research Center と共同で遂行した。結果として、移植した Treg の移入では 小腸炎の改善、過剰免疫の抑制に明らかな影響を与えることはできなかった。そこで、SAMP1 マウスの Treg の機能改善に注目し、実験を継続した。無菌 SAMP1 マウス (GF) と通常環境下 SAMP1 マウス (SPF) に腸炎を誘発させる DSS 溶液を内服させると GF マウスが明らかに症状増悪し体重減少する。(図 1) この結果は、無菌状態では Treg 機能不全により、DSS によって誘発された腸炎による過剰な炎症性免疫を抑制できないことを示唆したのであった。



そこで、GF マウスに SPF マウスの腸内細菌を移入したのち DSS を投与する実験を行った。



(図 2)



初めは急激に腸炎が進行するも6日後には体重減少や症状スコアが抑制されることがわかった。(図2中オレンジ線 赤丸囲い)
これは腸内細菌がGFマウスのTreg機能の回復に関わり、炎症性免疫を抑制できたことを示唆するものであり、UC患者へのFMT療法という臨床研究の発想に至った。Dysbiosisの改善は免疫細胞の機能回復に寄与するだけでなく、UCの異常免疫状態に深く関与することが示唆される。UCの腸内細菌-免疫応答メカニズムを解明することが新しい治療の発展に直結するものと思われる。

結論として、Tregを直接移入する細胞移植療法は自然発症IBDモデルマウスで治療効果を証明するのは難しいと思われる。理由として挙げられるのは、SAMP1マウスではすでに異常な免疫バランスがすでに強固な構築されており、外部からの免疫細胞移植だけでは簡単には是正されないと思われる。また、粘膜バリアの脆弱性など、IBDが発症する他の因子があることで、完全にTregに関与する免疫だけをターゲットに絞れないことが挙げられた。

やはり、Treg自体の機能を改善することが最も現実的な臨床応用につながると考え、便移植療法のような間接的に異常免疫を是正し、Treg機能を高める方法に注目すべきと考えた。便移植療法については平成28年基盤Cに採択され、臨床研究をすでに開始し、以下に記載するような、各学会発表、論文掲載、作成を進めている状況である。

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 4 件)

<論文発表>

『腸内細菌と消化器病疾患』消化器疾患に対する糞便移植療法 長田太郎、石川大

消化器病学会雑誌 112 巻 11 号(in press) 2015 査読あり

和文総説

1. 『G.I.Research 特集 糞便微生物移植』炎症性腸疾患に対する FMT 長田太郎、石川大、渡辺純夫 2015 年 1 月

2. 『化学療法の領域 特集 腸内フローラ』潰瘍性大腸炎患者に対する便内腸内細菌移植療法 石川大、長田太郎、渡辺純夫 2015 年 2 月

3. 『実験医学 特集テーマ：腸内環境の制御による疾患の予防・治療戦略』腸疾患に対する便移植療法 石川大、長田太郎、渡辺純夫 in press 2015 年 3 月

<学会発表> (国際学会 計 5 件)

2013 年 7 月 国際粘膜免疫学会
バンクーバー カナダ Regulation of colonic inflammation by commensal flora in SAMP1/YitFc mice

2014 年 2 月 ヨーロッパ炎症性腸疾患学会
コペンハーゲン デンマーク Regulation of colonic inflammation by commensal flora in SAMP1/YitFc mice

2015 年 2 月 ヨーロッパ炎症性腸疾患学会
バルセロナ スペイン Alterations of Intestinal Microbiota in Ulcerative Colitis Patients Treated with Sequential Antibiotic Combination and Faecal Microbiota Transplantation

2016 年 3 月 ヨーロッパ炎症性腸疾患学会
アムステルダム オランダ Therapeutic Potential of Increased Bacteroidetes Abundance Following Combination Therapy of Fresh Fecal Microbial Transplantation and Antibiotics for Ulcerative Colitis

2015 年 7 月 国際粘膜免疫学会
ベルリン ドイツ Alterations of Intestinal Microbiota in Ulcerative Colitis Patients Treated with Sequential Antibiotic Combination and Faecal Microbiota Transplantation

(国内学会)

2015 年 7 月 消化器免疫学会
潰瘍性大腸炎に対する抗菌剤療法後の腸内細菌移植療法における腸内細菌叢の解析

2015 年 10 月 消化器病学会総会潰瘍性大腸炎に対する抗菌剤療法後の腸内細菌移植療法における腸内細菌叢の推移

他 多数

<報告その他>

1. 研究報告 平成 27 年度 IBD 班会議 「潰瘍性大腸炎患者に対する抗菌薬+便移植併用療法」 2015 年 7 月

2. 招待講演 第 3 回 JCHM(Japanese Consortium for Human Microbiome)シンポジウム及び総会

「潰瘍性大腸炎に対する便移植療法～新しい細菌治療の確立を目指して～」 2015 年 11 月

3. 招待講演 第 52 回ヒューマンサイエンス・バイオインターフェース

「潰瘍性大腸炎に対する抗菌剤併用便移植療法の有効性の検討」 2015 年 11 月

4. 研究報告 平成 27 年度第 2 回 IBD 班会議 「潰瘍性大腸炎患者に対する抗菌薬+便移植併用療法」 2016 年 1 月

5. 招待講演 イタリア ミラノ大学
2014 年 6 月 20 日 「Tregs in IBD: Microbiota in IBD」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 大 (ISHIKAWA, Dai)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30622675

(2) 研究協力者

長田 太郎 (OSADA, Taro)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：00338336

佐々木 崇 (SASAKI, Takashi)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：50723897