

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09223

研究課題名(和文) 肛門病変検体を用いたT細胞不活化によるクローン病新規免疫療法探求

研究課題名(英文) Searching new immunotherapy for Crohn's disease by T cell inactivation using anal canal specimens

研究代表者

久下 博之 (Kuge, Hiroyuki)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30801774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：具体的な研究成果を創出することができなかった。その原因として小腸瘻孔狭窄形成症例、CD病関連発癌手術症例が主で、肛門病変手術が数例と少なく、肛門検体採取に至ることが出来なかったことが挙げられる。レミケードなどの生物学的製剤による肛門病変病勢制御率が高くなり肛門疾患専門病院におけるCD肛門病変手術症例は減少傾向にあることも理由として挙げられる。CDの臨床データベース作成を同時に行うことができ臨床学的重症度(10IBD, CDAI)や臨床病理情報対比が迅速に行える用になったことは成果と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性炎症性腸管障害クローン病は長期間の慢性経過を辿り再燃寛解を繰り返す原因不明の炎症性腸疾患で若年発症例が多い。クローン病肛門病変特異的かつ新規治療法開発はクローン病に悩む患者にとって福音となる。

研究成果の概要(英文)：It was not possible to create concrete research results. The leading causes are small intestinal fistula stenosis and CD disease-related carcinogenic surgery, and the number of anal lesion surgery was small, and it was not possible to collect anal samples. Biologics such as Remicade. The reason is that the control rate of anal lesions is increasing and the number of cases of CD anal lesion surgery in the hospital specializing in anal disease is decreasing. The clinical database of CD can be created at the same time, and the clinical severity (10IBD, CDAI) and clinical information can be compared quickly.

研究分野：大腸肛門外科

キーワード：クローン病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省指定難治性炎症性腸管障害クローン病は長期間の慢性経過を辿り再燃寛解を繰り返す原因不明の炎症性腸疾患で関節リウマチ類縁疾患とされる。近年治療目標は抗 TNF- 抗体 (infliximab, adalimumab) に代表される生物学的製剤での「長期間の深い寛解維持」となっているが、根本的治療方法は確立しておらず、根治療法開発は急務である。今回 PD-1 抗体の副作用を起点に T 細胞 Negative pathway を標的とした新規免疫療法に着目した。検体取得法として腸管切除手術や消化器内視鏡検査という侵襲的処置を行わずとも採取できるクローン病肛門病変を検討対象とした。治療抵抗性癌消化器癌における T 細胞不活化阻害についての研究結果をクローン病に応用することでクローン病肛門病変における T 細胞系免疫学的動態探求、最終的にクローン病肛門病変特異的かつ独創的新規治療法開発を目的とする。その成果はクローン病に悩む患者にとって福音となる。

### 2. 研究の目的

クローン病に冒され悩む患者 QOL のさらなる向上を主眼として、実験的検証によるクローン病肛門病変特異的な免疫学的動態探求、最終的にクローン病肛門病変特異的かつ独創的新規治療法開発を目的とする。腫瘍領域においてはヒト型抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体の有用性が既に臨床において報告されている。この T 細胞 Negative Pathway をクローン病変においても応用し、検証を行う。既知の T 細胞不活化分子以外にもクローン病免疫機構において重要な役割を担当する新規分子が存在する可能性を検証する。CD 肛門病変特異的治療開発は全世界において永久人工肛門造設回避による QOL 維持手法として待ち望まれている治療である。

### 3. 研究の方法

肛門病変生検検体、腸管切除手術症例については手術検体を用いて組織学的検討を行う。クローン病診断基準である非乾酪性類上皮性肉芽腫細胞陽性率を検討する。また免疫組織染色により、浸潤 T 細胞 (CD4, CD8, CD34, CD25 等), NK 細胞, DC, マクロファージ等免疫担当細胞の浸潤程度と組織学的障害度を比較する。さらに凍結標本から抽出した RNA を用いて、cDNA を作成し、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-23 等のサイトカイン, RANTES, MCP-1, MIP-1, CCR5, CXCR3 等のケモカインおよびケモカイン受容体, さらには E-selectin, ICAM-1 等の接着因子の発現を Real-time PCR 法で検討を行い、免疫細胞浸潤の多寡と肛門病変臨床経過との相関を検討する。これら T 細胞系免疫応答タンパク免疫染色とフローサイトメトリーから減弱している応答タンパクを解析する。減弱した免疫応答タンパクと合致するサイトカインプロファイルが作動しているか検討する。肛門上皮と小腸大腸腸管上皮における T 細胞系 negative pathway 免疫機構の相違点の詳細を明らかとし、肛門病変特異的新規治療開発に繋がる標的タンパク探索を行う。患者血清を用いて、前述のサイトカイン等を ELISA 法, ELISPOT 法で測定するとともに、血清から分離したリンパ球を用いて、FACS 解析を行うことで全身免疫応答について罹患腸管の組織学的障害度を評価検討し、その結果を当該患者の臨床学的重症度 (IOIBD, CDAI) と比較を行う。その検討により全身免疫活性状態が病勢と腸管上皮粘膜、肛門組織局所免疫と相関するかを検討する。

### 4. 研究成果

具体的な研究成果を創出することができなかった。その原因として小腸瘻孔狭窄形成症例, CD 病関連発癌手術症例が主で、肛門病変手術が数例と少なく、肛門検体採取に至ることが出来なかったことが挙げられる。レミケードなどの生物学的製剤による肛門病変病勢制御率が高くなり肛門疾患専門病院における CD 肛門病変手術症例は減少傾向にあることも理由として挙げられる。CD の臨床データベース作成を同時に行うことができ臨床学的重症度 (IOIBD, CDAI) や臨床病理

情報対比が迅速に行える用になったことは成果と考えている。2022年同種(Allogeneic)から採取した脂肪細胞由来間葉系細胞(Mesenchymal stem cell: MSC, Cx601)のCD肛門病変2次口周囲に単回皮下注射による治療方法開発の報告があり本法でも市場で保険収載された。しかし隅越分類型、型痔瘻に分類される複雑痔瘻ではなく、単純痔瘻が対象となっている。実臨床においてCD肛門病変は複雑かつ、括約筋間や坐骨直腸窩深部におよび、既報による方法では細胞単回注射では投与細胞生存率は短時間で大きく減少していることが予測される。CD肛門病変治療において、細胞治療をTissue Engineering技術で高度に洗練する革新的治療法開発の余地は十分にあると確信する。体内異所移植の深い経験から脂肪細胞は有用な細胞ソースだが、欠点もあると認識している。皮下移植は局所麻酔のみでアセスが容易で繰り返し移植できる大きな利点を有する。しかし皮下では血流供給が少なく、短時間で移植細胞壊死が起こり局所での効果発現維持には新生血管誘導や細胞外マトリックスに代表される足場(scaffold)が必要であることも重要であると考えている。肛門局所、肛門腺における制御性T細胞系免疫学的動態についての研究報告は世界的に認めない。CD肛門病変に対する制御性T細胞系に注目した細胞療法開発は日本から世界に向けてインパクトのある重要な研究成果を発信できると確信する。今後は大腸肛門専門病院複数施設での試験を計画の上CD肛門病変検体集積を継続する。成果が出ればインパクトの強い研究であり、地道かつ持続的に研究継続していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	岩佐 陽介  (Iwasa Yosuke)  (30812317)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員    (24601)	

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