

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591595

研究課題名(和文) 潰瘍性大腸炎とT細胞機能とくに OSTEOPONTIN との関係

研究課題名(英文) T cell function in ulcerative colitis, particularly relationship between osteopontin and ulcerative colitis

研究代表者

増田 英樹 (MASUDA HIDEKI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40173752

研究成果の概要(和文)：研究当初は、潰瘍性大腸炎(UC)のT細胞機能に注目し、osteopontin(OPN)との関連性を検討したが、有意な関連性を見い出すことができなかった。その後、UCとCrohn病(CD)患者の血中OPNの測定や各種サイトカインの測定を行った。その結果、両疾患ともOPN値が臨床的活動指数と正の相関を示した。また、UCでは多種類のサイトカインがOPN値と強く相関したが、CDではIL-8のみであった。以上より、OPNはUCとCDの病態生理の違いを反映する重要物質である可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)： We simultaneously examined plasma OPN levels and 17 cytokines. In UC patients, significant relationships were observed between plasma OPN levels and cytokines including IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IFN- γ , TNF- α and GM-CSF. In the CD patients, we observed a remarkable correlation solely between OPN and IL-8. In conclusion, we posit the importance of OPN in reflecting the distinct pathophysiologies of UC and CD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化管外科学

キーワード：潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、オステオポンティン

1. 研究開始当初の背景

(1) UC患者の大腸粘膜では、OPNがm-RNAと蛋白レベルで著しく増強されていた(文献1,2)。

(2) OPNはT細胞機能に密接な関係があり(文

献3)、CDに関連したTh1優位免疫に関与している(文献4)。以上よりUCとT細胞機能、とくにOPNとの関連性を検討することは、UCの病態・病因解明に有意義と考え、enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT)

により検討したが、UC の T 細胞機能や OPN との関連性で有意な結果が得られなかった。
 (3) CD や UC の血中 OPN レベルと臨床的活動度との相関性についてはすでにいくつかの異なる結果の報告がある(文献 4, 5, 6)。

2. 研究の目的

(1) CD や UC の血中 OPN レベルと他の炎症性サイトカインとの関連、相関性を検討する。
 (2) CD や UC の血中レベルと臨床的活動度との相関性を再検討。

3. 研究の方法

(1) UC 患者 24 名、CD 患者 17 名、健常人 23 名より血液を採取、OPN の測定や Bio-Plex アッセイによる各種サイトカインの測定に用いた。なお、UC 患者 24 名中、7 名は大腸全摘後の患者であった。

(2) 血中 OPN の測定は、anti-human OPN 抗体を含む Human Osteopontin Assay Kit (IBL, Takasaki, Gunma, Japan) を用い、サンドウィッチ法による Enzyme Immuno Assay により求められた。

(3) OPN 以外のサイトカインは、Bio-Plex プレミックスアッセイパネルの中から

Bio-Plex Human 17-plex Panel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い Bio-Plex suspension array system にて、同時に 17 種類のサイトカイン量を測定した。

(4) UC や CD の臨床的活動度指標としては、UC は clinical activity index (CAI) (文献 7) と ulcerative colitis activity index (UCAI) (文献 8) を用い、CD については Crohn's disease activity index (CDAI) (文献 9) と index of inflammatory bowel disease (IOIBD) (文献 10) を使用した。

(5) 研究内容は倫理委員会で承認され、個々の患者様に研究内容を説明し承諾書を得ている。

(6) 統計学的処理: Welch の t test を用いたが、相関関係の統計処理については Pearson の correlation coefficient test を使用し、p 値 0.05 未満を有意とした。

4. 研究成果

(1) 研究成績

① CD 症例 (17 例) の血中 OPN 値は 543.7 ± 316.7 ng/ml、UC 症例 24 例の血中 OPN 値は 423.8 ± 202.0 ng/ml であり、ともに健常コントロールの 254.7 ± 131.9 ng/ml より有意に上昇していた ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。一方、UC 24 症例のうち、大腸全摘を施行した 7 例については、血中 OPN が 269.2 ± 80.8 ng/ml と健常コントロール (254.7 ± 131.9 ng/ml) と有意差は認められなかった。

② UC (17 例)、CD (17 例)、健常人 (23 例) の血中サイトカインレベル (単位 pg/ml) を示す。UC 17 例には大腸全摘の 7 例は含まれていない。

(表-1)

	クローン病(n=17)		潰瘍性大腸炎(n=17)		健常コントロール(n=23)	
IL-1 β	1.26	± 0.22 p<0.01	1.13	± 0.20 p<0.05	0.51	± 0.10
IL-2	N.D.		N.D.		N.D.	
IL-4	2.42	± 0.23 p<0.01	2.15	± 0.21 p<0.01	0.97	± 0.20
IL-5	2.34	± 0.33 p<0.05	2.24	± 0.31 p<0.05	1.26	± 0.24
IL-6	13.84	± 3.21 p<0.01	6.87	± 0.91 p<0.01	2.78	± 0.54
IL-7	10.82	± 1.41 p<0.01	8.06	± 0.94 p<0.01	4.90	± 0.40
IL-8	34.05	± 6.79 p<0.01	24.95	± 3.70 p<0.01	11.94	± 2.95
IL-10	1.27	± 0.34 p<0.05	0.93	± 0.23	0.43	± 0.13
IL-12(p70)	22.91	± 2.74 p<0.01	17.44	± 1.95 p<0.01	6.40	± 1.44
IL-13	8.03	± 0.78 p<0.05	7.58	± 0.66 p<0.01	3.53	± 0.64
IL-17	5.49	± 1.87	7.23	± 2.33 p<0.05	1.52	± 0.66
G-CSF	6.07	± 0.84 p<0.01	5.05	± 0.94 p<0.01	2.20	± 0.29
GM-CSF	25.26	± 4.69 p<0.01	20.58	± 4.27 p<0.05	8.69	± 2.51
IFN- γ	126.88	± 10.48 p<0.01	113.89	± 9.33 p<0.01	49.81	± 10.80
MCP-1	31.44	± 4.12	31.78	± 3.77	23.24	± 2.64
MIP-1 β	167.41	± 20.53	174.16	± 27.37	126.87	± 15.73
TNF- α	13.36	± 3.80 p<0.05	10.26	± 2.38 p<0.05	4.56	± 1.08

CD や UC 群では、17 種類のサイトカインのうち、14 種類のサイトカインが健常コントロールより有意に高値であった。

③ CD (n=17)、UC (n=17) と OPN および臨床的指標との相関関係を示す (表 2)。表に示す r は相関係数、p 値は Pearson の correlation coefficient test による検定。

表2-A

CD	OPN		IOIBD		CDAI		CRP		WBC	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
IOIBD	0.7970	0.0001	0.8690	<0.0001						
CDAI	0.5750	0.0001	0.6900	0.0012	0.6490	0.0048				
CRP	0.5310	0.0281	0.7160	0.0012	0.6490	0.0048	0.7200	0.0011	0.6550	0.0043
WBC	0.4970	0.0425	0.6130	0.0089	0.7000	0.0018	0.7200	0.0011	0.6550	0.0043
IL-1 β	0.2500	0.3320	0.5080	0.0374	0.3860	0.1260	0.7960	0.0001	0.6550	0.0043
IL-4	0.2920	0.2550	0.4940	0.0468	0.3550	0.1270	0.7420	0.0006	0.5590	0.0041
IL-5	0.0891	0.7340	0.3900	0.1220	0.3360	0.1870	0.6480	0.0049	0.6730	0.0031
IL-6	0.5160	0.0340	0.5990	0.0110	0.6400	0.0056	0.8730	0.0000	0.7720	0.0003
IL-7	0.3070	0.2310	0.5610	0.0192	0.4260	0.0879	0.7850	0.0002	0.6240	0.0074
IL-8	0.6230	0.0075	0.6920	0.0021	0.5930	0.0122	0.8130	0.0001	0.5790	0.0151
IL-10	0.1310	0.7370	0.3960	0.2910	0.0722	0.8530	0.4170	0.2650	0.2130	0.5830
IL-12(p70)	0.4280	0.0863	0.4970	0.0422	0.5920	0.0122	0.6710	0.0032	0.5100	0.0385
IL-13	0.4960	0.0430	0.5180	0.0331	0.5270	0.0297	0.7500	0.0005	0.6920	0.0021
IL-17	0.2510	0.2916	0.5600	0.0766	0.4540	0.2100	0.7450	0.0134	0.5980	0.0680
G-CSF	0.5130	0.0353	0.6170	0.0083	0.6090	0.0095	0.7900	0.0002	0.6890	0.0022
GM-CSF	0.3490	0.2660	0.5810	0.0474	0.5820	0.0472	0.7840	0.0025	0.7500	0.0049
IFN- γ	0.1550	0.5540	0.4530	0.0678	0.3490	0.1700	0.7150	0.0013	0.6590	0.0040
MCP-1(MCAF)	0.2770	0.2920	0.3400	0.1820	0.1990	0.4430	0.5000	0.0394	0.4410	0.0767
MIP-1 β	0.2540	0.3250	0.3110	0.2250	0.3040	0.2380	0.5180	0.0331	0.2640	0.3070
TNF- α	0.1850	0.5090	0.3960	0.1440	0.2980	0.2810	0.6880	0.0048	0.5010	0.0570

表2-B

UC	OPN		CAI		UCAI		CRP		WBC	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
CAI	0.9240	<0.0001	0.9660	<0.0001						
UCAI	0.9220	<0.0001	0.9660	<0.0001	0.5850	0.0027	0.2210	0.2980	0.5370	0.0083
CRP	0.5420	0.0062	0.6200	0.0012	0.5850	0.0027	0.5340	0.0087	0.5370	0.0083
WBC	0.2610	0.2180	0.3220	0.1250	0.2910	0.1670	0.5340	0.0087	0.5370	0.0083
IL-1 β	0.7190	0.0001	0.7350	0.0001	0.6300	0.0013	0.5340	0.0087	0.5370	0.0083
IL-4	0.6580	0.0005	0.5530	0.0051	0.5160	0.0068	0.4190	0.0417	0.3010	0.1217
IL-5	0.6450	0.0007	0.5860	0.0026	0.5010	0.0127	0.4650	0.0222	0.4150	0.0456
IL-6	0.6620	0.0004	0.5850	0.0027	0.4870	0.0158	0.3620	0.0824	0.4920	0.0147
IL-7	0.5910	0.0023	0.5610	0.0043	0.4540	0.0258	0.4320	0.0351	0.3440	0.1000
IL-8	0.4230	0.0396	0.3900	0.0598	0.3140	0.1360	0.4170	0.0425	0.4110	0.0462
IL-10	-0.2100	0.5610	-0.2870	0.4220	-0.3840	0.2730	-0.5790	0.0795	-0.3740	0.2870
IL-12(p70)	0.3550	0.0883	0.3830	0.0644	0.2590	0.2210	0.2570	0.2260	0.2490	0.2400
IL-13	0.6320	0.0009	0.5460	0.0058	0.4900	0.0150	0.4510	0.0269	0.4440	0.0298
IL-17	0.5400	0.0170	0.3940	0.2800	0.3180	0.3710	0.1720	0.6330	-0.0646	0.8590
G-CSF	0.4900	0.0362	0.3810	0.0831	0.2950	0.1810	0.4050	0.0495	0.3200	0.0922
GM-CSF	0.5990	0.0086	0.5870	0.0104	0.4640	0.0525	0.4060	0.0950	0.5310	0.0234
IFN- γ	0.6330	0.0009	0.5960	0.0021	0.5190	0.0093	0.4440	0.0298	0.5510	0.0052
MCP-1(MCAF)	0.5460	0.0355	0.6290	0.0010	0.5240	0.0071	0.3200	0.1270	0.2050	0.3370
MIP-1 β	0.5710	0.0036	0.5550	0.0049	0.4590	0.0242	0.3840	0.0642	0.0668	0.9750
TNF- α	0.6550	0.0043	0.6470	0.0050	0.5300	0.0285	0.6100	0.0093	0.3980	0.1140

CD において臨床的活動度を表す CDAI や IOIBD が OPN に対して強く相関関係を示しているが ($p < 0.01$)、サイトカインの中では、IL-8 のみが OPN と強く相関した (表 2-A)。一方、UC においては、臨床的活動度を表す CAI や UCAI と OPN は強く相関関係をもっているが ($p < 0.01$)、多くの種類の炎症性サイトカイン、すなわち、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF にも OPN は強い相関関係を示した ($p < 0.01$, 表 2-B)。CD においては CRP や白血球数と相関関係を示すサイトカインが多種類であったが (表 2-A)、UC においては、CRP や白血球数と相関関係を示すサイトカインは数種類であった (表 2-B)。
 ④ UC で大腸全摘術を受けた 7 例と健常コントロール 23 例では、血中 OPN 値と他の炎症性

サイトカイン値との間に、有意な相関関係は成立しなかった。

(2) 考察

炎症性腸疾患 (IBD) とは狭義の意味で潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) をさす。この2つの疾患は主に消化管に発生し原因不明であり、慢性に経過し免疫学的異常が関連しているといわれており、この点では共通のバックグラウンドを有していると考えられている。しかしながら、臨床的にも病理学的にもさまざまな相違点も有している (文献 11)。今回の研究において、血中の OPN 値を測定し、各種炎症性サイトカインや臨床的活動指数のマーカースとの相関性を検討したところ、OPN と相関するサイトカインにおいて、UC と CD では著しく異なっていたので、この点は2つの疾患の病態の相違を解明する意味で重要なポイントになりうると考えた。

血中 OPN レベルと臨床的活動度との関係についてはこれまでも報告がなされているが、CD の活動度と血中 OPN 値が相関し、UC ではその相関関係がみられないとする報告 (文献 4) や逆に UC の活動度と血中 OPN が相関するという論文 (文献 6) もみうけられた。今回のわれわれの検討では、血中 OPN レベルと UC や CD の臨床的活動度とは強い正の相関関係を示した。ただし、UC においては臨床的活動指数として UCAI (文献 8) や CAI (文献 7) を、CD においては CDAI (文献 9) や IOIBD (文献 10) を使用した。

また、血中 OPN 値と他の炎症性サイトカインの相関関係については、同時に 17 種類のサイトカイン量を測定できる Bio-Plex Human 17-plex Panel を用い検討したところ、UC において強く相関関係を示したサイトカインは 9 種類におよんだが、CD では IL-8 のたった 1 種類であった。一方、CD では CRP や白血球数と多くのサイトカインが正の相関を示したのに対し、UC では CRP や白血球数と相関関係を示すサイトカインは数種類にとどまった。このことから、血中 OPN レベルは CRP や白血球数などの一般的炎症マーカーより UC の活動性をより多く反映していると考えられる。

炎症性腸疾患では血中 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IL-18、IL-10 などが活動期に上昇すると報告されている (文献 12, 13)。さらに以前の報告では、CD は Th1 優位の疾患であり、UC は Th2 優位の疾患であるといわれている (文献 14)。われわれの今回の結果からは、UC、CD とともに Th1 に関係するサイトカインや Th2 に関係するサイトカインが血中で健常コントロールより上昇しているため、UC や CD を Th2 優位とか Th1 優位ということで分類することは簡略化しすぎて却って誤解をまねくものであると現時点では解釈している。

UC においては、今回の検討で血中 OPN 値は

健常コントロールより上昇し、さらに OPN 値と多くの種類のサイトカインが強い相関関係を示した。また、血中 OPN 値は大腸全摘後の UC では上昇していない。したがって、こうした結果は、UC では OPN は炎症の場で生産され、病態生理によく相関していることを示唆している。実際、われわれは過去において UC 大腸には mRNA レベルでも蛋白レベルでも OPN の発現が強度になっていることを報告している (文献 1, 2)。われわれの報告や他の報告 (文献 4, 6) を考慮すると、UC の病態に OPN が重要な役割を担っており、UC の臨床的活動性を表すマーカーとして役立つものと考えられる。

以上より、OPN は IBD の中でも UC の臨床的マーカーとして有望である。CD も臨床的マーカーとして用いることが可能と思われるが、血中 OPN 値と他の炎症性サイトカインとの相関関係においては、UC と CD で大きな違いが認められた。このことは、今後 UC や CD の病態の違いを検討する上で、OPN が重要な鍵をにぎる可能性があると考えられる。

<文献>

1. Masuda H, Takahashi Y, Asai S et al. Distinct gene expression of osteopontin in patients with ulcerative colitis. *J Surg Res* 2003;111:85-90.
2. Masuda H, Takahashi Y, Asai S et al. Osteopontin expression in ulcerative colitis is distinctly different from that in Crohn's disease and diverticulitis. *J Gastroenterol* 2005; 40:409-13.
3. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000; 287:860-4.
4. Sato T, Nakai T, Tamura N et al. Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. *Gut* 2005; 54:1254-62.
5. Agnholt J, Kelsen J, Schack L et al. Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand J Immunol* 2007;65:453-60.
6. Mishima R, Takeshima F, Sawai T et al. High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2007;41:167-72.
7. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* 1994;330:1841-5.
8. Talstad I, Gjone E. The disease activity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1976; 2:403-8.
9. Best WR, Beckel JM, Singleton JW et al.

Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. Gastroenterology 1976; 70:439-44.

10. de Dombal FT, Softley A. IOIBD report no 1: Observer variation in calculating indices of severity and activity in Crohn's disease. International Organization for the study of inflammatory bowel disease. Gut 1987;28:474-481.

11. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology 1998; 115:182-205.

12. Mahmud N, O'Connell MA, Stinson J et al. Tumor necrosis factor-alpha and microalbuminuria in patients with inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995; 7:215-9.

13. Hanai H, Iida T, Yamada M et al. Effects of adacolumn selective leukocytapheresis on plasma cytokines during active disease in patients with active ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2006; 12 : 3393-9.

14. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 2003;3:521-33.

なお、上記内容は、plasma osteopontin levels in inflammatory bowel disease: remarkable correlation with disease activity and cytokine levels というタイトルで、Shihoko Komine-Aizawa, Hideki Masuda, Satoshi Hayakawa, Tadatoshi Takayama の Author で Disease of Colon & Rectum に投稿中である。

(3)本研究期間中にわれわれはOPNとIBDについて別の観点から検討を行ってきた。OPNと脂質代謝は密接な関係にあるといわれていることから、IBDの脂質代謝に影響を及ぼすマーカーとして、総コレステロール値、中性脂肪値、HDLコレステロール値、LDLコレステロール値などを設定し、集団観察研究 (retrospective cohort study)を行った。その結果、脂質代謝に関するいくつかの指標は、潰瘍性大腸炎とクローン病で相違がみられたが、IBD全体としては高血圧症や動脈硬化症合併例との相関が示唆された。今後、さらなる統計学的処理を施し、IBDにおける薬物使用の種類と脂質代謝について、詳細な検討を行う予定である。

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2件)

① 増田英樹:潰瘍性大腸炎の治療-外科医の立場から、日大医誌、69巻、2010、pp.99-105

② Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, Hayakawa S, Yamamoto S. Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis, Clin Vaccine Immunol vol.17, 2010, pp.1500-1506

[学会発表] (計2件)

① 増田英樹、大亀浩久、間崎武郎、林 成興、高山忠利:炎症性腸疾患とサイトカインとくにオステオポンチンとの関連性. 第65回日本大腸肛門病学会学術集会, 浜松、2010.11.26

② 万本 潤、増田英樹、石井敬基、間崎武郎、大亀浩久、林 成興、高橋泰夫、浅井 聡、森山光彦、高山忠利:炎症性腸疾患と脂質代謝に関する集団観察研究. 第64回日本大腸肛門病学会学術集会, 福岡、2009.11.6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田英樹 (MASUDA HIDEKI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 40173752

(2) 研究分担者

早川 智 (HAYAKAWA SATOSHI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 30238084

高橋泰夫 (TAKAHASHI YASUO)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 30339329

(3) 連携研究者

相澤志保子 (AIZAWA SHIHOKO)
日本大学・医学部・助手
研究者番号: 30513858