

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07961

研究課題名(和文) 腸管粘膜透過性を制御するB細胞機能の解析とクローン病の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of B cell functions regulating intestinal mucosal permeability on the pathogenesis of 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、「クローン病においては制御性B細胞(Breg)の異常が腸管粘膜透過性の制御機能を低下させ腸管炎症増悪に関与する」という仮説を検証した。C57BL/6マウスの脾臓からTあるいはB細胞を分離し、Rag2-KOマウスに投与し、腸管粘膜透過性を評価した。本検討では、T細胞に比べてB細胞の移入時に腸管粘膜透過性が低下していた。Trans-wellを用いて大腸上皮(Caco-2細胞)とT細胞あるいはB細胞を共培養するモデルを作成した場合、T細胞よりもB細胞と共培養した際に上皮の透過性が低下することが確認され、本結果はin vivoのマウス移入モデルの結果を反映していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはこれまでの研究において「クローン病(CD)における制御性B細胞(Breg)の機能異常を介した炎症増悪メカニズム」を明らかにしていた。さらに今回の申請課題における「腸管の粘膜透過性制御メカニズムを生体の免疫細胞の機能から解明する」という点は、過去に全く報告のない着眼点であった。これらの新規性の高い二つの視点を組み合わせた本研究は、極めて学術的独自性と創造性に富んだ研究内容であることは言うまでもなく、本研究で検証した「Bregによる粘膜透過性制御メカニズム」は、CDのみならず他の“leaky gut”に関わる疾患に対しても、これまでと異なる視点からの病態解明につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we hypothesized that abnormalities in regulatory B cells (Breg) are associated with reduced regulation of intestinal mucosal permeability (IMP) and exacerbated intestinal inflammations in Crohn's disease. T and B cells were isolated from the spleen of C57BL/6 mice, administered into the abdominal cavity of Rag2-KO mice, and their IMP was assessed. The IMP was reduced during B cell engraftment compared to T cell engraftment. For the in vitro model of intestinal permeability regulation, a model was created in which the colonic epithelium (Caco-2) were cultured on the apical side of the trans-well, and T or B cells were co-cultured on the basolateral side. In vitro study revealed that the permeability of the epithelium was reduced when co-cultured with B cells rather than T cells, reflecting the results of the in vivo mouse transfer model.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸管粘膜透過性 クローン病 制御性B細胞 制御性T細胞 IL-10

1. 研究開始当初の背景

これまで私共は、クローン病 (CD) では、制御性 B 細胞 (Breg) の機能が減弱していること、dysbiosis 環境下では組織の細胞外アデノシン三リン酸 (ATP) が Breg の機能を低下させることの可能性を明らかにしてきた。一方、腸管粘膜透過性は多彩なメカニズムによって担われているが、Breg による粘膜透過性制御に関する報告はこれまでにない。本研究課題では、「CD においては、Breg の異常が腸管粘膜透過性の制御機能を低下させ、腸管炎症増悪に關与する」という仮説を立て、種々の実験モデルを用いてこの仮説を検証することを目的とした。本研究の成果は、CD の病態と “leaky gut syndrome” の病態解明につながる可能性があり、これまでと異なる視点からの診断法や治療法の開発に貢献できると考える。

2. 研究の目的

これまでの Breg に関する研究成果を踏まえて、「Breg において IL-10 産生の低下が認められる CD 患者では、その機能異常によって腸管粘膜透過性の制御機能が低下し、結果的に不可逆的な慢性炎症が誘導されること」を明らかにする。遺伝子操作マウスおよび免疫不全マウスである Rag2-KO を用いた *in vivo* の腸炎モデルの実験系、さらに *in vitro* においては、腸管上皮と免疫細胞の共培養系を樹立し、Breg の機能低下によって上皮の粘膜透過性が低下することを目的として研究を進めている。

3. 研究の方法

(1) マウスモデルを用いたリンパ球による腸管粘膜透過性制御の評価

免疫不全マウスである Rag2-KO マウスを実験に使用した。野生型マウス (C57BL/6) の脾臓から T および B 細胞を分離調整し、Rag2-KO マウスの腹腔内に投与し、投与 4 週間後に腸管粘膜透過性を FITC デキストラン法によって評価した。

(2) *In vitro* モデルによる評価

In vitro における腸管透過性制御モデルは、trans-well の apical 側に大腸上皮である Caco-2 細胞を培養し、basolateral 側に T 細胞と B 細胞を共培養するモデルを作成し、T 細胞と B 細胞が上皮の粘膜透過性に与える影響を検証した。培養上皮の透過性は上皮間電気抵抗を測定することで評価した。

(3) マウスモデルを用いた Breg 特異的な腸管粘膜透過性制御の評価

Rag2-KO マウスにおいて、Breg の有無による粘膜透過性評価が可能な新規モデルを作成する。IL-10-KO マウスの脾臓から分離した B 細胞は IL-10 に依存した免疫抑制機能を失っていることから、本マウスの B 細胞を Rag2-KO マウスへの移入する系を用いて、野生型 B 細胞の移入系と比較することによって腸管粘膜透過性の制御における Breg の関連を明らかとする。

4. 研究成果

(1) マウスモデルを用いた腸管粘膜透過性

Rag2-KO マウスへの T 細胞の移入時に比べて、B 細胞の移入時に腸管粘膜透過性が低下する傾向を認めた。現在は、本メカニズムに Breg の機能が関与するか否かを Breg の移入の有無による新たなモデルによって検証中である。

(2) *In vitro* モデルによる評価

図 1 のように、B 細胞と共培養した際に上皮の透過性が低下することが確認され、その傾向は共培養するリンパ球数に依存していた (図 2)。本結果は *in vivo* のマウス移入モデルの結果を反映する結果であった。

図 1.

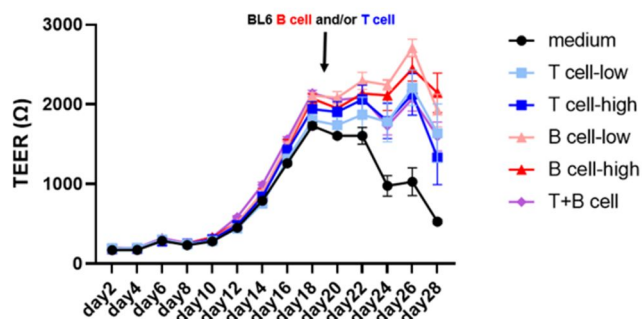
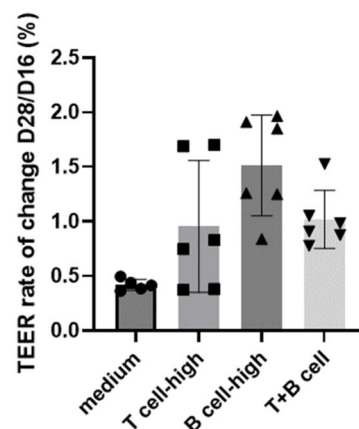


図 2.



(3) 今後の継続的な研究

Rag2-KO マウスにリンパ球を移入して腸管粘膜透過性を評価するモデルは樹立できているので、今後は、さらに Breg の関与を検討していく。現在、私共は IL-10-KO マウスを飼育しており、実験に使用可能な状況である。IL-10-KO マウスの脾臓から分離した B 細胞は IL-10 に依存した免疫抑制機能を失っていることから、本マウスの B 細胞を Rag2-KO マウスへの移入する系を用いて、野生型 B 細胞の移入系と比較することによって腸管粘膜透過性の制御における Breg の関連を明らかとする。また、非炎症時のみならず、B 細胞移入モデルにデキストラン硫酸ナトリウムによって腸炎を惹起し、腸炎誘発時における Breg の粘膜透過性の制御機能を評価する。

In vitro における腸管透過性制御モデルは、これまでと同様に、trans-well の apical 側に Caco-2 を培養し、basolateral 側に B 細胞を共培養する系を用いていく。今後は、野生型と IL-10-KO マウスから分離した B 細胞を各々上皮細胞と共培養する系を作成し、腸管粘膜透過性の制御における Breg の関連を明らかとする。*In vivo* と同様に、TNF-alpha で腸管に傷害を与えることで粘膜透過性を亢進させたモデルも作成し、Breg の影響を検証する。さらに、ヒト CD 患者および健常人から分離した B 細胞を、各々 Caco-2 と共培養し、上皮細胞の透過性亢進に与える影響を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawashima Kousaku, Oshima Naoki, Kishimoto Kenichi, Kataoka Masatoshi, Fukunaga Mai, Kotani Satoshi, Sonoyama Hiroki, Oka Akihiko, Mishima Yoshiyuki, Kazumori Hideaki, Ishikawa Noriyoshi, Araki Asuka, Ishihara Shunji	4. 巻 29
2. 論文標題 Low Fecal Calprotectin Predicts Histological Healing in Patients with Ulcerative Colitis with Endoscopic Remission and Leads to Prolonged Clinical Remission	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammatory Bowel Diseases	6. 最初と最後の頁 359 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izac095	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, Hayashi Yuki, Hirayama Daisuke, 、Ishihara Shunji, et all, J-COSMOS group	4. 巻 57
2. 論文標題 Interim analysis of a multicenter registry study of COVID-19 patients with inflammatory bowel disease in Japan (J-COSMOS)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01851-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakase Hiroshi, Wagatsuma Kohei, 、Ishihara Shunji, et all	4. 巻 58
2. 論文標題 Anxiety and behavioral changes in Japanese patients with inflammatory bowel disease due to COVID-19 pandemic: a national survey	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 205 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01949-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Cha Na, Oshima Naoki, Kishimoto Kenichi, Kotani Satoshi, Okimoto Eiko, Yazaki Tomotaka, Sonoyama Hiroki, Oka Akihiko, Mishima Yoshiyuki, Shibagaki Kotaro, Tobita Hiroshi, Kawashima Kousaku, Ishimura Norihisa, Ishihara Shunji	4. 巻 70
2. 論文標題 Long-lasting renal dysfunction following tacrolimus induction therapy in ulcerative colitis patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 297 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.21-139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukuchi Takumi, Kawashima Kousaku, Koga Hideaki, Utsunomiya Ran, Sugiyama Kohei, Shimazu Keiji, Eguchi Takaaki, Ishihara Shunji	4. 巻 70
2. 論文標題 Induction of mucosal healing by intensive granulocyte/monocyte adsorptive apheresis (GMA) without use of corticosteroids in patients with ulcerative colitis: long-term remission maintenance after induction by GMA and efficacy of GMA re-treatment upon relapse	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 197 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.21-112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakase Hiroshi, Hayashi Yuki, Ohmiya Naoki, Ishihara Shunji, et al (J-COSMOS group)	4. 巻 57
2. 論文標題 Interim analysis of a multicenter registry study of COVID-19 patients with inflammatory bowel disease in Japan (J-COSMOS)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01851-1	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 Suzuki Kaoru, Kakuta Yoichi, Naito Takeo, Takagawa Tetsuya, Ishihara Shunji, et al (MENDEL study group)	4. 巻 28
2. 論文標題 Genetic Background of Mesalamine-induced Fever and Diarrhea in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammatory Bowel Diseases	6. 最初と最後の頁 21 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izab004	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 22
2. 論文標題 Enteric Microbiota-Mediated Serotonergic Signaling in Pathogenesis of Irritable Bowel Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10235 ~ 10235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910235	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 Matsumoto Kenjiro, Takata Kana, Yamada Daisuke, Usuda Haruki, Wada Koichiro, Tada Maaya, Mishima Yoshiyuki, Ishihara Shunji, Horie Syunji, Saitoh Akiyoshi, Kato Shinichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Juvenile social defeat stress exposure favors in later onset of irritable bowel syndrome-like symptoms in male mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95916-5	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 Kobayashi Taku, Motoya Satoshi, Nakamura Shiro, Kitamura Kazuya, Hiraoka Sakiko, Hokari Ryota, Ishihara Shunji, et al	4. 巻 6
2. 論文標題 Discontinuation of infliximab in patients with ulcerative colitis in remission (HAYABUSA): a multicentre, open-label, randomised controlled trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Lancet Gastroenterology & Hepatology	6. 最初と最後の頁 429 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S2468-1253(21)00062-5	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 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

1. 発表者名 川島 耕作 大嶋 直樹 岡 明彦 三島 義之 石原 俊治
2. 発表標題 実臨床における難治性潰瘍性大腸炎に対するウステキスマブの治療成績
3. 学会等名 第115回日本消化器病学会中国支部例会
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)	
研究 分担者	岡 明彦 (Oka Akihiko) (80600600)	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
---------	---------