

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590949

研究課題名(和文)炎症性腸疾患の基盤的免疫学から臨床免疫内視鏡学の創成

研究課題名(英文)Research of Inflammatory Bowel Disease Based on Clinical Immunology and Endoscopy

研究代表者

岩男 泰 (Iwao, Yasushi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40168547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はCD4+CD45RBhigh移入腸炎モデルを用いてRORgt+T細胞を介した新たなTh1(alternative Th1)への分化経路を明らかにした。このalternative Th1が腸炎惹起性を有し制御性T細胞はこの分化経路を抑制した。さらにClostridium butyricumがマウス腸炎モデルにおいて単菌で腸炎抑制効果を発揮することを見出し、その機序が制御性T細胞からではなく腸管マクロファージからのIL-10産生誘導によるものであることを示した。これらの結果は腸炎発症機序に新たな知見を与え、C. butyricumのプロバイオティクスとしての可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In CD4+CD45RBhigh adoptive transfer colitis model, we demonstrated that RORgt+ Th17 and Th17/Th1 cells become colitogenic alternative Th1 cells in vivo. Treg cells suppressed this pathway and development of intestinal inflammation. In addition, we found that Clostridium butyricum, which produces butyrate, suppress intestinal inflammation in mice colitis models. Interestingly, C. butyricum promoted IL-10 production by intestinal macrophage, but not Treg cells. Fecal 16S rRNA analysis, C. butyricum was decreased in the patients with IBD. Our findings provide the new insight into the mechanism of colitogenic T cell development in vivo and suggests the potential of Clostridium butyricum as a novel probiotics.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 alternative Th1 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

(1)申請者のグループは炎症性腸疾患の原因として炎症惹起性メモリーT細胞が腸内細菌及び、腸管を抗原と認識し炎症を誘導する病態であると考えている。

(2)近年、炎症性腸疾患に対しTh17細胞が関与している可能性が示唆されており、申請者は腸炎発症には古典的な炎症惹起性のTh1細胞のみならず ROR γ t+T-bet+Th17/Th1 precolitogenic T細胞というこれまで言われていたTh1と異なった分化経路をとる細胞集団が腸炎発症の一翼を担っている可能性を発見した。

2. 研究の目的

腸炎抑制系モデルを用いて、腸炎の発症抑制に制御性T細胞がどのように関わっているのかを検討し「Treg/Th17/Th1 バランス関与、腸炎発症の規定要因解明」という本研究プロジェクトを立案した。

3. 研究の方法

(1) ROR γ t GFP $^{-/-}$ マウスの腸管より採取したCD3+CD4+GFP陽性細胞をRAG2KOマウスに移入する adoptive transfer を行い、腸炎発症に際して移入細胞がどのような phenotype になるかを検討する。

(2) CD4+CD45 RBhi adoptive transfer model (CD45RBhiマウス)とCD4+CD25+T細胞を共移入した腸炎抑制系モデルを使用し、Th1/Th17/Tregのバランスを検討する。

(3) adoptive transferの系において腸炎発症、腸炎抑制における腸内細菌叢の変化を経時的にTh1/Th17バランスとともに検討し、ヒトにおいても治療介入で変化を認めるかを検討する。

4. 研究成果

(1)ROR γ t GFP $^{+/+}$ マウスおよびROR γ t KOマウスのnaïve T細胞(CD4+CD45RBhigh)をRAG2欠損マウスに移入する adoptive transfer colitisモデルにおいてROR γ t陽性Th17細胞を介したTh1細胞分化経路が存在すること(alternative Th1)を証明し(Fig.1-4)、このalternative Th1が強力な腸炎惹起性を有していること、制御性T細胞がこの経路を抑制することを明らかにした(Figure.5-6) (Sujino et al. Gastroenterology 2011;141:1014-23.)。

(2)さらに従来のclassical Th1細胞もROR γ t陽性細胞存在下で腸炎惹起性を有することも明らかにしつつある(論文準備中)。さらに腸内細菌叢のなかで酪酸産生菌Clostridium butyricumが予想されたTreg細胞でなく腸管マクロファージからのIL-10産生を促すことで強力な腸炎抑制効果を有することも明らかにした。ヒト炎症性腸疾患患者糞便を用いたフロー解析の結果からもIBD患者でのClostridium butyricumの減少を確認しており臨床応用が期待できる。

Figure1.

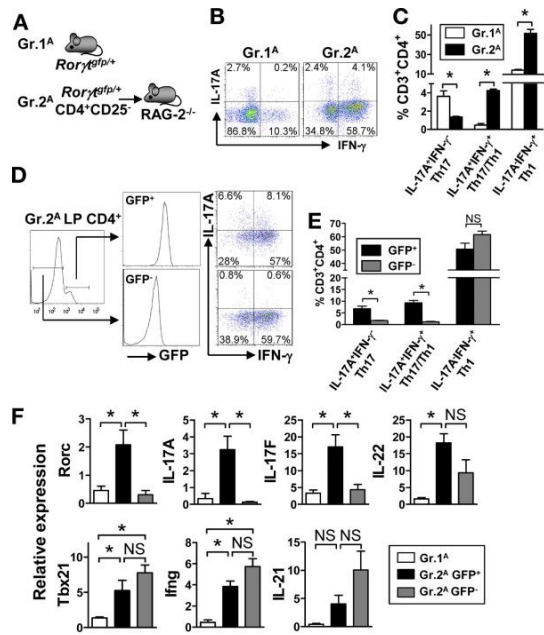


Figure2.

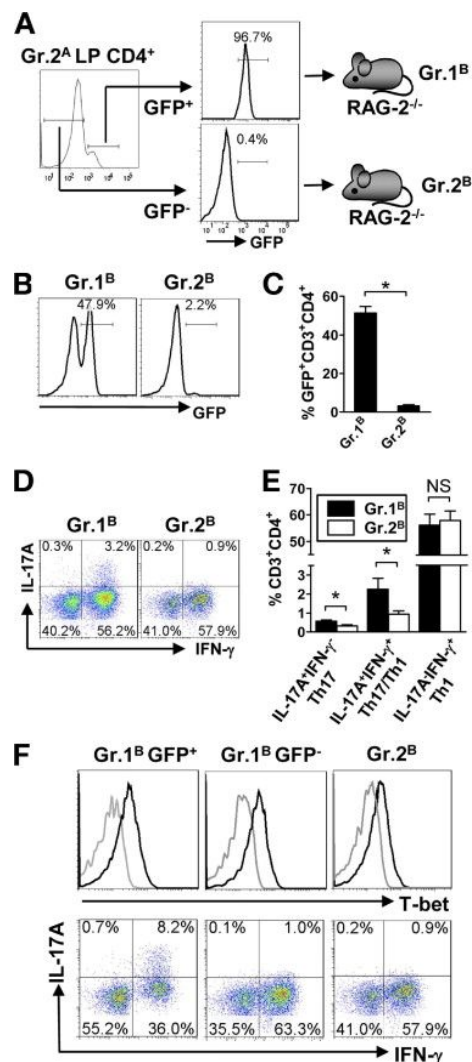


Figure3.

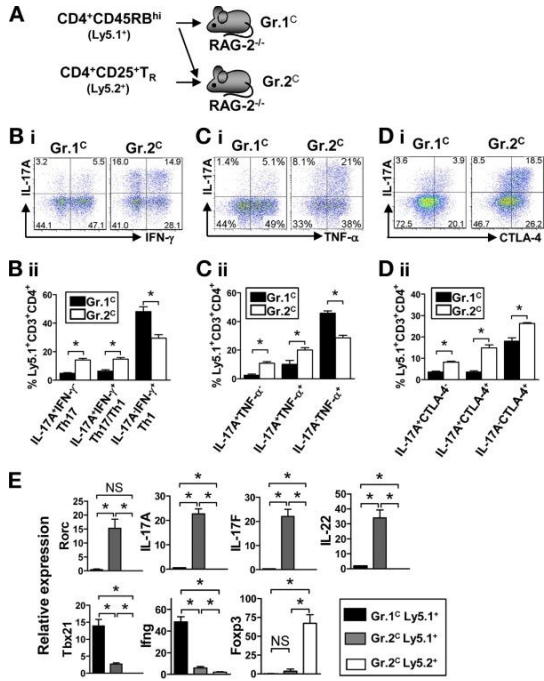


Figure4.

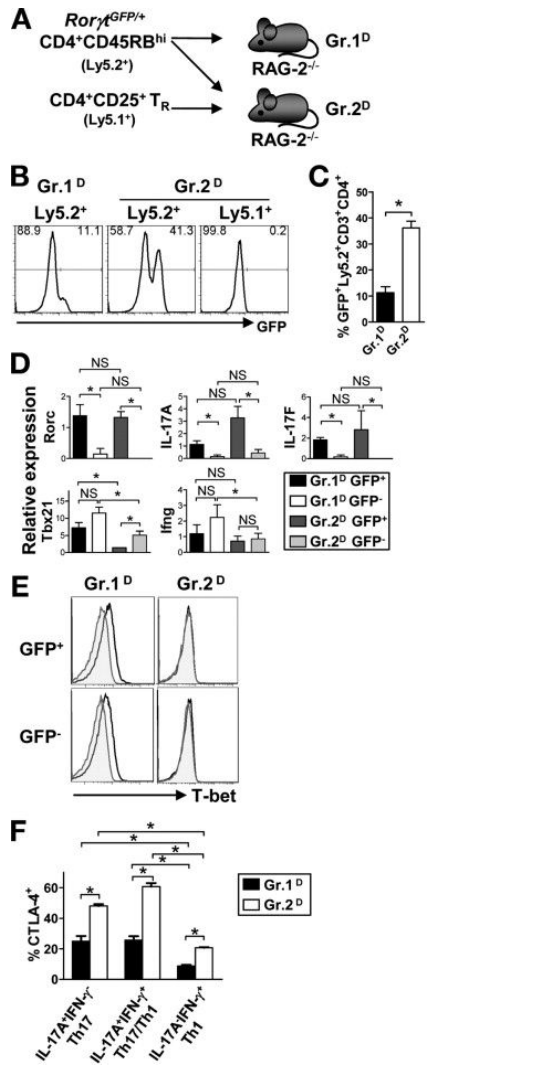


Figure5.

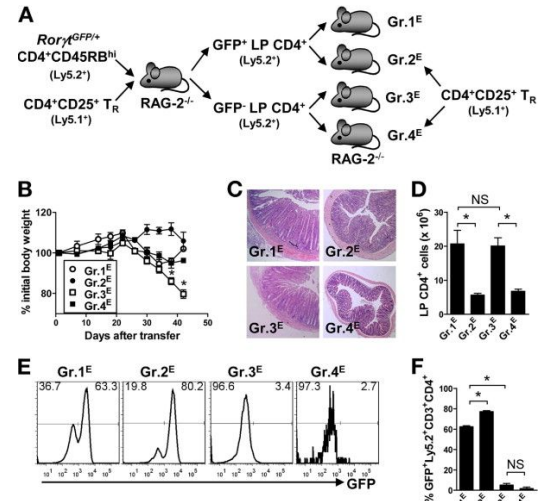
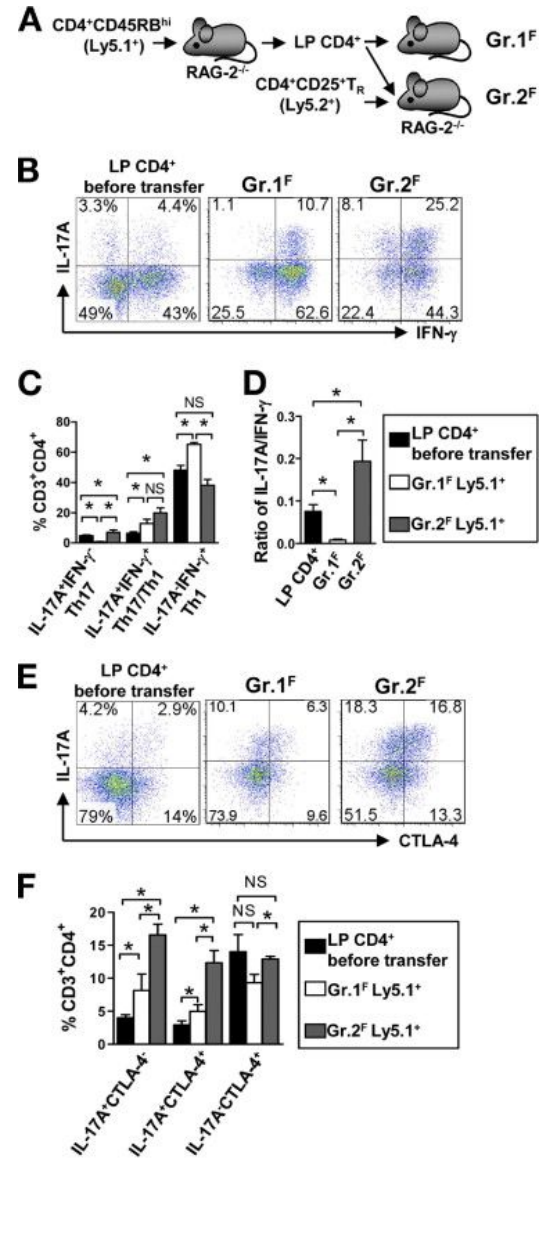


Figure6.



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1) Sakuraba A, Iwao Y, Matsuoka K, Naganuma M, Ogata H, Kanai T, Hibi T. Endoscopic and pathologic changes of the upper gastrointestinal tract in Crohn's disease. Biomed Res Int, peer review, 89, 2014, e610767. doi:10.1155/2014/610767.
- 2) Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. PLoS One, peer review, 9, 2014, e84619. doi:10.1371/journal.pone.0084619.
- 3) Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A single strain of Clostridium butyricum induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. Cell Host Microbe, peer review, 13, 2013, 711-22. doi:10.1016/j.chom.2013.05.013.
- 4) Miyoshi J, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Ichikawa R, Yajima T, Okamoto S, Naganuma M, Sato T, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Mucosal healing with oral tacrolimus is associated with favorable medium- and long-term prognosis in steroid-refractory/dependent ulcerative colitis patients. J Crohns Colitis, peer review, 7, 2013: e609-14. doi:10.1016/j.crohns.2013.04.018.
- 5) Handa T, Kanai T, Sato T, Mikami Y, Sujino T, Hayashi A, Mizuno S, Matsumoto A, Hisamatsu T, Hibi T. Dendritic cells administered intrarectally penetrate the

intestinal barrier to break intestinal tolerance via Th2-mediated colitis in mice. Immunol Lett, peer review, 150, 2013, 23-9. doi:10.1016/j.imlet.2013.01.010.

- 6) Takayama T, Kanai T, Matsuoka K, Okamoto S, Sujino T, Mikami Y, Hisamatsu T, Yajima T, Iwao Y, Ogata H, Hibi T. Long-term prognosis of patients with ulcerative colitis treated with cytopheresis therapy. J Crohns Colitis, peer review, 7, 2013, e49-54. doi:10.1016/j.crohns.2012.05.005.
- 7) Kimura K, Kanai T, Hayashi A, Mikami Y, Sujino T, Mizuno S, Handa T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Sato T, Hibi T. Dysregulated balance of retinoid-related orphan receptor t-dependent innate lymphoid cells is involved in the pathogenesis of chronic DSS-induced colitis. Biochem Biophys Res Commun, peer review, 427, 2012, 694-700. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.091.
- 8) Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Littman DR, Hibi T. Regulatory T cells suppress development of colitis, blocking differentiation of T-helper 17 into alternative T-helper 1 cells. Gastroenterology, peer review, 141, 2011, 1014-23. doi:10.1053/j.gastro.2011.05.052.

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) Hayashi A, et al, A Single Strain of Clostridium Butyricum Suppresses Intestinal Inflammation by Converting Activated Lamina Propria Cd11b+CD11cInt Macrophages to IL-10-Producing Regulatory Macrophages, American Gastroenterology Association, 2012.05.21, San Diego, USA.

2) Sujino T, et al, Intestinal Microbiota is Essential for Both the Initiation and the Maintenance of Colitis, and Dysbiosis of IBD Patients, The 98th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology, 2012.04.20, Tokyo

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩男 泰 (IWA0, Yasushi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40168547

(2) 研究分担者

金井 隆典 (KANAI, Takanori)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40245478