

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590951

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎におけるIgG形質細胞の病態関与の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Mucosal IgG plasma cell as a novel therapeutic target in the pathogenesis of ulcerative colitis .

研究代表者

久松 理一 (Hisamatsu, Tadakazu)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60255437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：UC患者の腸管粘膜局所にIgG産生形質細胞が増加していることは臨床病理学的特徴の一つとして知られている。我々は潰瘍性大腸炎患者腸管粘膜に浸潤しているIgG産生形質細胞は通常腸管粘膜に存在するIgA産生形質細胞とは異なりCXCL12-CXCR4 axisによって腸管に浸潤していること、IgG産生形質細胞は免疫複合体の産生により腸管マクロファージを刺激し潰瘍性大腸炎の病態形成に関与していることを世界で初めて明らかにした。Fcγ受容体を介した免疫複合体からの刺激は細菌刺激による経路とは独立した因子として炎症惹起に関与していることも明らかとなり、新たな創薬の標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation characterized by IgG-producing plasma cell infiltration of colonic mucosa is a histological hallmark of ulcerative colitis (UC). IgG plasma cells that were markedly increased in number in the inflamed mucosa of UC patients showed a distinct expression profile (CCR10 low/CXCR4 high) compared with IgA plasma cells (CCR10 high/CXCR4 low). IgG-immunocomplex(IC) stimulation activated intestinal CD14+ macrophages that were increased in number in the inflamed mucosa of UC patients via FcγR, and induced the extensive production of pro-inflammatory cytokines. IgG-IC may promote inflammatory response in CD14+ macrophages independent from signaling pathway in bacteria stimulation. IgG-IC signaling via FcγR and IgG plasma cell could be novel therapeutic targets for UC.

研究分野：消化器内科学。特に炎症性腸疾患の病態解明と治療。粘膜免疫学

キーワード：潰瘍性大腸炎 IgG産生形質細胞 ケモカイン受容体 免疫複合体

#### 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(以下 UC)は慢性に経過する難治性大腸炎で患者数は増加し 13 万人を超えた。しかし原因ははまだ解明されておらず病態解明とそれに基づいた治療法の開発が急務である。UC 患者の腸管粘膜局所に IgG 型形質細胞が増加していることは臨床病理学的特徴の一つとして知られているが、その病態への関与は未解明のままである。我々はこの形質細胞浸潤が病態に関与していると想定しそのメカニズムを追究することで UC の病態解明を目指す。

#### 2. 研究の目的

今回の研究計画では以下を目的とする。(1)IgG 型形質細胞が腸管粘膜で増加するメカニズムの解明、(2)IgG 型形質細胞の病態への関与の証明、(3)形質細胞を標的とした新たな治療標的分子の同定、を目標とする。

#### 3. 研究の方法

UC 粘膜の IgG 型形質細胞の characterization (マイクロアレイ解析、flowcytometry)、病態への関与メカニズム(ケモカイン受容体を介したホーミング機構、Fc $\gamma$ 受容体シグナルを介した他の細胞との相互作用)、新たなモデルマウスの作成、治療標的分子の探索、を行う。

#### 4. 研究成果

(1)UC 粘膜においては炎症の程度に相関して IgG 型形質細胞浸潤が増加することが確認された。我々は大腸粘膜形質細胞の高純度単離に成功し、正常大腸 IgA 型形質細胞と UC 粘膜 IgG 型形質細胞における遺伝子発現に関してマイクロアレイ解析を行った。発現に変化の認められた遺伝子の解析からケモカイン受容体 CXCR4 の発現が UC 粘膜 IgG 型形質細胞で高いことが判明した。CXCR4 の発現は PCR 法ならびに flow cytometry による解析でも確認された。CXCR4 陽性 IgG 型形質細胞浸潤は UC に特異的であり、病態に関与している可能性を示唆した。これを裏付けるようにリガンドである CXCL12 の発現が UC 粘膜で高いことが報告されている(Dotan I, et al. *Inflamm Bowel Dis.* 2010)。また UC 粘膜の IgG 型形質細胞は CD138+CD38+CD20-CD19+ という plasma blast に近いものであることを突き止めている。マイクロアレイの結果発現の高かった Bcl-6 はその down regulation が形質細胞の最終的な maturation に必要であると考えられており、Bcl-6 の高発現の持続が UC 粘膜 IgG 型形質細胞の機能的特徴に影響している可能性が考えられた。

(2)我々は UC やクローン病患者の病変部にユニークな CD14+マクロファージサブセットが増加し慢性炎症の原因になっていることを世界で初めて報告している(Kamada N, et al. *J Clin Invest.* 2008、Kobayashi T, et al.

*Gut.* 2008)。この CD14+マクロファージサブセットが免疫複合体を認識する Fc $\gamma$ R を発現していることを突き止めた。そこで形質細胞から産生された IgG が対応抗原と免疫複合体を形成し Fc $\gamma$ R を介して CD14+マクロファージを刺激するという仮説をたてた。実際、LPMC あるいは CD14+マクロファージを免疫複合体刺激を mimic した固層化 IgG により刺激すると高濃度の炎症性サイトカインを産生した。そのポテンシャルは菌刺激と同等かつ菌刺激とは independent な経路 (Fc $\gamma$ R -Syk 経路) によるものであり、UC では細菌刺激と免疫複合体刺激の両者が独立して病態に関与している可能性が示唆された。特に Syk 阻害剤は CD14+マクロファージからの炎症性サイトカインの産生を強く抑制し、Fc $\gamma$ R -Syk 経路の阻害が治療標的となりうることが示された。

(3)急性 DSS 腸炎モデルでは IgG 形質細胞浸潤は認めないが慢性 DSS 腸炎モデルでは IgG 形質細胞浸潤が起きることを突き止めた。現在本モデルを用いて骨髄と腸管における IgG 形質細胞の動態を経時的に解析中である。さらに腸管特異的 villin プロモーターを用いて腸管上皮細胞特異的に CXCL12 を発現するマウスの作成に成功した。現在、このマウスが自然経過で腸管に IgG 形質細胞浸潤を合併するか、あるいは腸炎誘発時にどのような現象を認めるかについて解析を開始した。

#### 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 24 件)

##### (1)英文

Wada Y, Hisamatsu T\*, Kanai T, et al. (他 10 名 2 番目) Risk Factors for Decreased Bone Mineral Density in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Cross-Sectional Study. *Clin Nutr.* 2015 Jan 13. doi: 10.1016/j.clnu.2015.01.003. \* corresponding author (査読あり)

Naganuma M, Hisamatsu T, Kanai T, Ogata H. Magnetic resonance enterography of Crohn's disease. *Review Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015 Jan;9(1):37-45. doi: 10.1586/17474124.2014.939631. (査読あり)

Oryoji D, Hisamatsu T, Sasazuki T, et al. (他 7 名, 2 番目) Associations of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease. *Genes Immun.* 2014 Nov 6. doi: 10.1038/gene.2014.61. (査読あり)

Miyoshi J, Hisamatsu T\*, Kanai T, et al. (他 12 名 2 番目) Early intervention with adalimumab may contribute to

favorable clinical efficacy in patients with Crohn's disease. *Digestion* 2014; 90(2): 130-6. doi: 10.1159/000365783. \* corresponding author (査読あり)

Saigusa K, Hisamatsu T\*, Kanai T, et al. (他 8 名, 2 番目) Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR $\gamma$ t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Oct; 20(10):1820-7. doi: 10.1097/MIB.000000000000149. (査読あり) \* corresponding author

Yoneno K, Hisamatsu T\*, Kanai T, et al. (他 18 名 2 番目) Risk and management of intra-abdominal abscess in Crohn's disease treated with infliximab. *Digestion* 2014; 89(3): 201 - 208. doi: 10.1159/000360618. \* corresponding author (査読あり)

Hisamatsu T\*, Ueno F, Hibi T, et al. (他 12 名, 1 番目) The 2nd edition of consensus statements for the diagnosis and management of Intestinal Behçet's Disease -Indication of anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibodies. *J Gastroenterol.* 2014 Jan;49(1):156-62. doi:10.1007/s00535-013-0872-4. (査読あり) \* corresponding author

Hayashi A, Hisamatsu T, Kanai T, et al. (他 9 名, 6 番目) A Single Strain of *Clostridium butyricum* Induces Intestinal IL-10-Producing Macrophages to Suppress Acute Experimental Colitis in Mice. *Cell Host Microbe.* 2013 Jun 12;13(6):711-22. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.013. (査読あり)

Uo M, Hisamatsu T\*, Kitazume MT, Hibi T, et al. (他 9 名, 2 番目) Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through Fc R-mediated CD14+ macrophage activation. *Gut.* 2013 Dec;62(12):1734-44. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303063. (査読あり) \* corresponding author

Yoneno K, Hisamatsu T\*, Kitazume MT, Hibi T, et al. (他 11 名, 2 番目) TGR5 signaling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. *Immunology* 2013 May;139(1):19-29. doi: 10.1111/imm.12045. (査読あり) \* corresponding author

Chang J, Hisamatsu T\*, Kitazume MT, Hibi T, et al. (他 11 名, 2 番目) Activated Hepatic Stellate Cells Mediate the Differentiation of Macrophages. *Hepatol Res.* 2013 Jun;43(6):658-69. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01111.x. (査読あり) \* corresponding author

Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther.* 2013 Mar;137(3):283-97. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.10.008. (査読あり)

Ichikawa R, Hisamatsu T\*, Kitazume MT, Hibi T, et al. (他 9 名, 11 番目) Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology.* 2012 Jun;136(2):153-62. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03554.x. (査読あり) \* corresponding author

## (2)邦文

久松理一, 金井隆典 今後の炎症性腸疾患の新規治療 特集 炎症性腸疾患診療の最前線 日本医師会雑誌 2015 第 144 巻 第 1 号 p67-71 (査読なし)

久松理一, 日比紀文 炎症性腸疾患の病態解明と治療の進歩 日本内科学会雑誌 102 巻, 臨時増刊号 P92-98 (査読あり)

久松理一, 日比紀文 総説『自然免疫と炎症性腸疾患』 日本消化器病学会雑誌 2013 110 巻 5 号 p753-63. (査読あり)

## 〔学会発表〕(計 32 件)

Hisamatsu T, Matsuoka K, Naganuma M, Miyoshi J, Inoue N, Yajima T, Mizuno S, Saigusa K, Nakazato Y, Mori K, Takeshita K, Nanki K, Kiyohara H, Iwao Y, Ogata H, Kanai T. Early Intervention With Adalimumab May Contribute To Favorable Clinical Efficacy In Patients With Crohn's Disease. *Asian Pacific Digestive Week.* Bali, Indonesia. November 23-25, 2014

Mori K, Hisamatsu T, Suzuki H, Tokutake M, Shimamura K, Mizuno S, Nakamoto N, Ebinuma E, Matsuoka M, Kanai T. Inflammatory macrophages response to stimulation by Curdlan which is a component of commensal fungus cell wall and may contribute to the pathogenesis of

inflammatory bowel disease. The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Seoul, Korea, June 19-21, 2014

. Hisamatsu T. (invited)  
Inflammatory Bowel Disease, Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical management (Plenary session) 2013 Immunology Forum, Taipei, Taiwan. Aug 17, 2013

. Hayashi A, Kanai T, Sato T, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T., Yoshimura A, Kamada N, Yagita H, Hibi T. Clostridium Butyricum Regulates IL-10 Production in Normal and Inflammatory Conditions Through Different Target Cells. Poster Digestive Disease Week 2013. May 19-21, Orlando, USA

. Saigusa K, Kanai T, Sujino T, Handa T, Mikami Y, Kimura K, Mizuno S, Hayashi A, Satov T, Matsuoka K, Hisamatsu T., Hibi T. Colitogenic TH17 Cells Help Development of Ror T-Independent Classical TH1 Cells. Poster. Digestive Disease Week 2013. May 19-21, Orlando, USA

. Hisamatsu T., Uo M, Miyoshi J, Yoneno K, Matsuoka K, Kanai T, Hibi T. Intestinal CXCR4+IgG+ immature plasma cells contribute to the pathogenesis of ulcerative colitis through IgG-immune complex-FcγR signaling. Symposium. The 14th Meeting of International Conference on Ulcer Research, Tokyo, Keio Plaza Hotel, Japan, 2012.

. Hisamatsu T., Uo M, Hibi T. Mucosal IgG+CXCR4+ plasma cells contribute to the pathogenesis of ulcerative colitis through FcγR-mediated activation of CD14+ macrophages. The 3rd International Forum the 98th General Meeting of JSGE, April 20, 2012 Tokyo, Keio Plaza Hotel, Japan

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
久松 理一 (HISAMATSU TADAKAZU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：60255437

(2) 研究分担者  
徳武美奈 (Tokutake Mina)  
慶應義塾大学・医学部・研究員  
研究者番号：30468524

(3) 連携研究者 無