

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659374
 研究課題名（和文） Fibrocyte 浸潤による腸管線維化機序の解明と新規治療標的の探索
 研究課題名（英文） The role of fibrocyte in intestinal fibrosis and screening of anti-fibrotic therapy targeting fibrocyte.
 研究代表者
 日比 紀文 (HIBI TOSHIFUMI)
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：50129623

研究成果の概要（和文）：

我々はこの1年間でクローン病患者末梢血中に fibrocyte が増加していることを見出した。現在、患者背景因子と末梢血 fibrocyte の相関を解析し線維化リスク因子の割り出しに着手している。さらに fibrocyte を標的とした線維化予防治療の開発のため腸管線維化モデルの開発に着手した。また末梢血 fibrocyte のダイナミクスをより詳細に解析するため collagen-GFP マウスをすでに手に入れており、今後 DSS 腸炎での末梢血 fibrocyte の可視化を試みるとともに、isolation してその機能解析に取り組む予定である。またよりクローン病に近いモデルとして TNF ΔARE マウスをギリシアから入手しており、同マウスにおいて collagen 産生 fibrocyte の動態が他のモデルとどう異なっているのかを解析している。

研究成果の概要（英文）：

We have found the increase of fibrocytes in peripheral blood of the patients with Crohn's disease. We have investigated the risk factors of intestinal fibrosis in Crohn's disease. Furthermore, we have started development of a novel mice model which reveals intestinal fibrosis to screen the molecular targets for anti-fibrotic therapy. We plan to study of observation of dynamics of fibrocyte using GFP-collagen mice. And also we will analyze the dynamics of fibrocytes in TNF ΔARE mice which are model for Crohn's disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：クローン病、腸管線維化、fibrocyte

1. 研究開始当初の背景

我が国の炎症性腸疾患（クローン病と潰瘍性大腸炎）は増加傾向にあり、クローン病で3万人、潰瘍性大腸炎で13万人を超えるに至った。両疾患とも原因が解明されておらず根本治療は開発されていないが生物学的製剤をはじめとする薬物治療の進歩により良好な臨床症状のコントロールが目指せるようになりつつある。しかし、基本的にクローン病は病気の経過に伴い腸管障害が進行する“進行性の慢性炎症性疾患”であり経過中に

外科手術を余儀なくされることが多い。特に腸管狭窄が手術理由の多くを占めるがこれに対する適切な薬物治療や進行予防策は見出されていない。生物学的製剤の出現により炎症のコントロールは今後目覚ましく改善されていくことが予想されるが、いっぽうで腸管の線維化に伴う狭窄症例も増加すると考えられる。腸管線維化による狭窄への進展メカニズムは解明されておらず、既存の研究は一般的な線維化抑制作用のある薬剤を腸炎モデルに投与するだけの研究が多くメカ

ニズム解明や治療応用に至ってはいない。本研究ではなぜクローン病では極端な腸管狭窄へ進展するのかそのメカニズムを明らかにし、そのうえで治療標的薬の探索とハイリスク患者同定のバイオマーカー探索を行う。まず我々は慢性炎症がなぜ線維化を引き起こすのかという点からその大本である末梢血 fibrocyte に着目した。fibrocyte は骨髄から供給される未分化細胞の一つで末梢血中では CD34 陽性細胞集団の一部として存在する。近年、特発性間質性肺炎における線維化のリスクとして末梢血中の fibrocyte の増加が報告された (Moeller A, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2009)。fibrocyte は末梢血中からケモカインのシステムなどにより障害組織や炎症局所に浸潤し、その過程で fibroblast などの局所に定着したコラーゲン産生細胞へと分化していく。したがってこの制御のアンバランスや局在の異常は fibrocyte の異常な集積と過剰な線維化を生むことになると考えられる。fibrocyte の過剰で永続的な浸潤を制御し適切なバランスを保つことができれば炎症終息後の線維化による狭窄は防ぐことができる。またどのような患者が腸管狭窄のハイリスク患者であるか末梢血 fibrocyte から予測することができれば適切な線維化予防策の対象患者として絞り込むことや線維化抑制治療の開始のタイミングを知ることができる。このような仮説を元に本研究に着手している。

2. 研究の目的

クローン病における腸管狭窄は手術理由の最も多くを占め、解決されるべき重要課題であるがそのメカニズムが解明されておらず適切な薬物治療法も開発されていない。本研究では腸管狭窄のメカニズムを末梢血 fibrocyte に着目し、1) マウスモデルをもちいた fibrocyte の腸管ホーミングと局所での分化、コラーゲン産生メカニズムの解明、2) *in vitro* における fibrocyte の分化制御因子の同定、3) fibrocyte を標的とした線維化抑制物質の探索、4) ヒト炎症性腸疾患患者末梢血中の fibrocyte の同定と治療経過との相互関係を明らかにし狭窄合併のハイリスク患者を同定すること、に着目して追究する。

3. 研究の方法

(1) マウス腸炎モデルを用いた fibrocyte の動態の解明

①慢性 DSS 腸炎モデルを用いた fibrocyte の組織浸潤の経時的変化の観察：急性 DSS 誘発腸炎モデルで腸管の線維化が起こることはまれであり、狭窄を起こしうる慢性大腸炎モデルとして慢性 DSS 腸炎モデルを確立した。本モデルは DSS 経口投与 (5 日間) のインターバルを開けて 5 回以上繰り返すもので、腸

管の慢性炎症象を解析するのに適している。これまでの予備実験では本モデルにおいては 1 回目の DSS 投与後から粘膜下層への fibrocyte 浸潤がようやく観察されるようになる。本モデルにおいて末梢血中の fibrocyte の動態を同時に解析し経時変化を追う。

②CXCL12-GFP マウスを用いた fibrocyte 浸潤における CXCL12-CXCR4 axis 関与の証明：京都大学長澤丘司教授らは本マウスを用いて native CXCL12 が骨髄 pericyte で発現し免疫細胞の分化成熟にニッシュとして関与していることを明らかにしている。このマウスに慢性腸管炎症 (例：慢性 DSS 誘発性腸炎) を起こさせることで CXCL12 の局所発現と fibrocyte の浸潤の相互関係が経時的に可視化できる。腸管の CXCL12 発現細胞はいかなる細胞か (上皮細胞なのか pericyte のような細胞が腸管粘膜にも存在しているのか) も極めて興味深い。腸管の極端な線維化には fibrocyte の過剰な集積や局在の異常が関与していると考えられ本マウスを用いた腸管線維化の研究の意味はきわめて大きい。

③TNF- α ARE マウスを用いた TNF による fibrocyte の制御異常と抗 TNF α 抗体治療の影響：本マウスは過剰な TNF α 産生状態にあり腸炎を発症するマウスでクローン病の腸管局所のサイトカイン状態にきわめて類似している。本マウスで fibrocyte の浸潤程度、腸管内での局在、時間的遷延について検討する。これらの観察ののちマウス抗 TNF α 抗体を投与し fibrocyte に対する影響を観察する。浸潤が減少し線維化が軽減するのか、逆に炎症が抑制されることで局所の fibrocyte の分化が進み線維化がかえって進行してしまうのかが興味深い。

(2) クローン病患者標本を用いた検討

①クローン病患者末梢血中の fibrocyte の同定と線維化リスク予測因子としての確立：肺線維症と同じく末梢血中の fibrocyte の増加がクローン病における腸管狭窄のリスク因子となりうるかを検討するため健康人 10 名 (対照)、クローン病患者 50 名の末梢血を採取し末梢血中の CD34 陽性コラーゲン陽性の fibrocyte を同定する (倫理委員会承認済み)。クローン病患者で優位に増加が認められた場合、治療背景や活動性などの臨床情報と照合するとともに、治療経過によって変化していくかどうか経時的に観察する。

②単離した末梢血 fibrocyte の characterization と *in vitro* 培養・分化系の立ち上げ：フローサイトメトリーを用いて fibrocyte を同定し、各種細胞表面マーカーの発現を検討する。特にケモカイン受容体 CXCR4 の発現については PCR、免疫組織化学にても確認する。さらに sorting によって単離培養を試みる (通常のプレート以外にも 3 次元マトリゲルなども用いる)。各種リコン

ピナントサイトカインやクローン病患者腸管粘膜固有層単核球の培養上清など局所炎症に関与する因子を添加、あるいはそれらを中和することによる fibroblast への分化やコラーゲン産生能に与える影響について検討する。

③クローン病手術検体組織での fibrocyte の免疫組織化学的検討：非炎症部と炎症部、非狭窄部と狭窄部における fibrocyte の数、局在の違いを免疫組織学的に検討する。

(3) fibrocyte を標的とした新たな線維化抑制治療の開発

上述の研究から fibrocyte の腸管局所へのホーミングおよびその局在に異常が認められた場合その制御は線維化コントロールのターゲットとなる。具体的な候補としては① CXCR4 の阻害剤、抗体治療によって末梢血からのホーミングを防ぐ、②炎症（特に TNF α ）が局所の CXCL12 高発現に関与しているならば抗 TNF α 抗体による治療が fibrocyte のホーミング阻止に働く可能性がある。さらに fibrocyte の invitro 分化の系の立ち上げに成功すればサイトカインを含めた多くの物質の fibrocyte 分化に対する影響を探索でき、コラーゲンを高産生 fibroblast への分化抑制薬の開発へつなげる。

4. 研究成果

クローン病は徐々に腸管障害が蓄積する進行性疾患であり、腸管の線維化に伴う狭窄が手術理由の多くを占める。腸管線維化による狭窄への進展メカニズムは解明されておらず、適切な薬物治療や進行予防策は見出されていない。我々は末梢血 fibrocyte に着目した。Fibrocyte は骨髄から供給される未分化細胞の一つで末梢血中では CD34 陽性細胞集団の一部として存在する。Fibrocyte は末梢血中からケモカインのシステムなどにより障害組織や炎症局所に浸潤し、その過程で fibroblast などの局所に定着したコラーゲン産生細胞へと分化していく。我々はこの 1 年間でクローン病患者末梢血中に fibrocyte が増加していることを見出した。現在、患者背景因子と末梢血 fibrocyte の相関を解析し線維化リスク因子の割り出しに着手している。さらに fibrocyte を標的とした線維化予防治療の開発のため腸管線維化モデルの開発に着手した。すでに慢性 DSS 誘発性腸炎において末梢血中に fibrocyte が出現し、その後腸管線維化が始まるという事実をつかんでいる。末梢血 fibrocyte のダイナミクスをより詳細に解析するため collagen-GFP マウスをすでに手に入れており、今後 DSS 腸炎での末梢血 fibrocyte の可視化を試みるとともに、isolation してその機能解析に取り組む予定である。またよりクローン病に近いモデルとして TNF α ARE マウスをギリシアから入

手しており、同マウスにおいて collagen 産生 fibrocyte の動態が他のモデルとどう異なっているのかを解析している。さらに fibrocyte のホーミング機能や collagen 産生性成熟細胞への分化メカニズムの研究成果をもとにそれらを抑制する低分子化合物のスクリーニングを開始すべく準備を始めている。

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 12 件）全て査読有

① Nakamura Y, Kanai T, Saeki K, Takabe M, Irie J, Miyoshi J, Mikami Y, Teratani T, Suzuki T, Miyata N, Hisamatsu T, Nakamoto N, Yamagishi Y, Higuchi H, Ebinuma H, Hozawa S, Saito H, Itoh H, Hibi T. CCR2 knockout exacerbates cerulein-induced chronic pancreatitis with hyperglycemia via decreased GLP-1 receptor expression and insulin secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Feb 28.

② 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*. 2013 Jan 17.

③ Nishida A, Nagahama K, Imaeda H, Ogawa A, Lau CW, Kobayashi T, Hisamatsu T, Preffer FI, Mizoguchi E, Ikeuchi H, Hibi T, Fukuda M, Andoh A, Blumberg RS, Mizoguchi A. Inducible colitis-associated glycome capable of stimulating the proliferation of memory CD4+ T cells. *J Exp Med*. in press

④ Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, Mori M, Uo M, Namikawa Y, Matsuoka K, Sato T, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TGR5 signaling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. *Immunology* in press

⑤ Mikami Y, Kanai T, Iwasaki E, Naganuma M, Yamagishi Y, Shimoda M, Matsuoka K, Hisamatsu T, Iwao Y, Ogata H, Nakatsuka S, Mukai M, Hibi T. Anticoagulation therapy dramatically improved severe sigmoiditis with findings resembling inflammatory bowel disease, which was caused by mesenteric venous thrombosis. *Clinical Journal of Gastroenterology*.

in press

⑥ Hisamatsu T, Kanai T, Yohei Mikami, Yoneno K, Matsuoka K, **Hibi T**. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacol Ther. 2012 Oct 25. pii: S0163-7258(12)00233-1.

⑦ Chang J, Hisamatsu T, Shimamura K, Yoneno K, Adachi M, Naruse H, Igarashi T, Higuchi H, Matsuoka K, Kitazume MT, Ando S, Kamada N, Kanai T, and **Hibi T**. Activated Hepatic Stellate Cells Mediate the Differentiation of Macrophages. Hepatology Research. in press

⑧ 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 γ -dependent innate lymphoid cells is involved in the pathogenesis of chronic DSS-induced colitis. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Nov 2;427(4):694-700.

⑨ Ono Y, Kanai T, Sujino T, Nemoto Y, Kanai Y, Mikami Y, Hayashi A, Matsumoto A, Takaishi H, Ogata H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe M, **Hibi T**. T-helper 17 and Interleukin-17-Producing Lymphoid Tissue Inducer-Like T Cells Make Different Contributions to Colitis in Mice. Gastroenterology. 2012 Nov;143(5):1288-97.

⑩ Uo M, Hisamatsu T, Miyoshi J, Kaito D, Yoneno K, Kitazume MT, Mori M, Sugita A, Koganei K, Matsuoka K, Kanai T, **Hibi T**. Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through Fc γ R-mediated CD14+ macrophage activation. Gut. 2012 Sep 26. [Epub ahead of print]

⑪ Hisamatsu T, **Hibi T**. -Is the dendritic cell a missing piece in the pathogenesis model of post-infectious irritable bowel syndrome?- Editorial for "Characteristics of intestinal lamina propria dendritic cells in a mouse model of postinfectious irritable bowel syndrome." J Gastroenterol Hepatol. 2012 May;27(5):847-8.

⑫ Maruyama Y, Hisamatsu T, Matsuoka K, Naganuma M, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Kanai T, **Hibi T**. A Case of Intestinal Behçet's Disease Treated with Infliximab Monotherapy Who Successfully Maintained Clinical Remission and Complete Mucosal Healing for Six Years. Intern Med. 2012;51(16):2125-9.

[学会発表] (計 1 件)

Kimura K, Matsuoka K, Kanai T, Okamoto S, Hisamatsu T, Inoue N, Yajima T, Ogata H, Iwao Y, **Hibi T**

Early normalization of C-reactive protein (CRP) by infliximab is a predictive factor of sustained longterm clinical efficacy in crohn's disease.

The 14th Meeting of International Conference on Ulcer Research. 2012年07月12日～2012年07月14日 Tokyo

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 紀文 (HIBI TOSHIFUMI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 50129623

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし