

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460963

研究課題名(和文) 病原性メモリーリンパ球の包括的制御によるIBD新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment with trafficking modulation of colitogenic memory lymphocytes.

研究代表者

藤井 俊光 (FUJII, TOSHIMITSU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30547451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患の治療は生物学的製剤の登場で激変したもののいまなお社会的問題となっている。単一分子を標的とするだけでなく病原性メモリーリンパ球を包括的に制御するために、病原性メモリー細胞のtrafficking制御を標的とした全く新規の概念による治療の開発を目的とした。マウス病原性メモリー細胞の解析およびそのtraffic制御モデルの確立を行った。そしてナイーブT細胞移入腸炎モデルさらには病原性メモリーT細胞移入モデルにおいてもfingolimodが腸炎を抑制することを明らかにし、二次リンパ組織欠損腸炎モデルにより骨髄にリンパ球を隔離することで免疫抑制作用を発揮するという新規の機序を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Fingolimod is a sphingosine-1-phosphate receptor modulator, which inhibits T cell egress from lymph nodes, thereby prevents pathogenic T cells from migrating towards disease sites. In inflammatory bowel diseases (IBD), it is thought that colitogenic memory T cells are reactivated in regional lymphoid organs, and return to inflammatory tissues. We demonstrated that fingolimod prevents the development of colitis induced by the adoptive transfer of naive T cells (naive T colitis) and colitogenic effector-memory T cells (memory T colitis) into SCID mice. Next, we demonstrated that fingolimod decreased T cells in peripheral blood, but conversely increased in bone marrow in the mice lacking lymph nodes and spleen. Notably, fingolimod prevented the development of memory T colitis without lymph nodes and spleen. Collectively, fingolimod may offer an additional role to direct trafficking of T cells in bone marrow, resulting in the prevention of memory T cell-mediated diseases including IBD.

研究分野：消化器病学、炎症性腸疾患、腸管免疫

キーワード：下部消化管学 炎症性腸疾患 新規治療 腸管免疫 リンパ球動態制御

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) の治療は生物学的製剤の登場で激変したものの、未だに社会的問題となっている。病変の粘膜治癒なくして臨床的寛解のみでは遷延、再燃していずれ腸管切除に至るリスクを秘めているのが現状である。抗 TNF 療法の無効例や効果減弱例の増加も IBD 診療の新たな問題である。したがって IBD の遷延化や再燃の阻止に向けて、単一分子を標的とするだけでなく、病原性メモリーリンパ球を包括的に制御する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまで我々が見いだしてきた IBD 特異的な免疫学的異常に着目し、病原性メモリー細胞の trafficking 制御を標的とした、これまでと全く異なる概念に基づいた新規治療法の可否に関して独自に検討を行う。この解析結果から最終的に新規治療法の開発基盤樹立を目的とした。

### 3. 研究の方法

近年我々が独自に開発した、IBD モデルにおける病原性メモリーリンパ球の同定やその分離培養法をはじめ、我々のこれまでの経験、知識を集積し、病原性メモリーリンパ球の再循環機構を標的とした新規治療法の開発基盤を樹立するために、

- (1) マウス病原性メモリー細胞の同定およびその trafficking 制御 ex vivo モデルの確立
- (2) 実験腸炎モデルにおける病原性メモリーリンパ球再循環制御の誘導と解析
- (3) 病原性メモリーリンパ球の腸炎モデルにおける新規 trafficking 制御機構の解析を行った。

### 4. 研究成果

- (1) その結果、既報にあるナイーブ T 細胞のみならず病原性メモリー T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> 細胞) にも SIP 受容体が発現していることがわかった。in vitro において fingolimod は単離したこれらの細胞に対しアポトーシスを誘導せず、各種細胞表面抗原の発現、ホーミング受容体の発現に影響をなかった。また腸上皮幹細胞の単離による、三次元培養法に基づく腸上皮オルガノイドへの fingolimod の影響について条件を確立した。
- (2) ナイーブ T 細胞移入腸炎モデルに対し fingolimod を投与し腸炎発症の程度について解析を行った。その結果 fingolimod はコントロール群に対し有意に移入 8 週後の腸炎を臨床スコア、組織学的スコアともに抑制し、さらに脾臓、腸間膜リンパ節、末梢血、骨髄、大腸粘膜 CD4<sup>+</sup>T 細胞数を抑制した。さらに各臓器より単離した CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞表面抗原、サイトカイン産生能等の解析を行った。その結果病原性メモリー細胞は減少し、各種の炎症性サイトカイン産生能は低下していた。またアポトーシスは

誘導されず、これらより fingolimod はナイーブ T 細胞移入腸炎を抑制することが明らかとなった。上記の成果は我々が想定している、病原性リンパ球動態制御による腸炎抑制として合致していた。

- (3) 病原性メモリー T 細胞移入腸炎モデルに対する fingolimod の腸炎抑制効果に関し検討を行った結果 fingolimod は病原性メモリー T 細胞移入腸炎モデルにおいても腸炎を抑制することが明らかとなった。これは fingolimod が二次リンパ節にリンパ球を隔離し免疫抑制作用を発揮するという既知の機序以外の新規免疫抑制作用が存在することを示唆している。
- (4) 二次リンパ組織欠損病原性メモリー T 細胞移入腸炎モデルを作成し、fingolimod を投与し腸炎抑制効果を検討した結果、同モデルにおいても fingolimod は腸炎を抑制することが明らかとなった。この新たな腸炎抑制機序を明らかとするために、二次リンパ組織欠損マウスに対して fingolimod を投与し各臓器におけるリンパ球数を検討した結果、骨髄においてリンパ球の優位な増加を認め、その程度は末梢血中の減少数と同等であった。これにより、fingolimod が骨髄にリンパ球を隔離することで免疫抑制作用を発揮するという、あらたな機序を解明した。上記の成果は我々が想定する病原性リンパ球動態制御による腸炎抑制として、あらたな方向性を示唆している。

### 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 13 件)

- (1) Kobayashi M, Nagaishi T, Watanabe M (他 10 名、8 番目、11 番目) : The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. *Sci Rep* 2016 (in press). 査読有
- (2) Ohtsuka K, Fuji T, Nagaishi T, Watanabe M (他 4 名、4 番目、7 番目、8 番目) : Magnetic resonance enterography for the evaluation of the deep small intestine in Crhon's disease. *Intest Res*. 14: 120-126, 2016. 査読有
- (3) Nagaishi T, Fujii T, Watanabe M (他 6 名、1 番目、5 番目、9 番目) : Epithelial Nuclear Factor-kappa B Activation in Inflammatory Bowel Diseases and Colitis-Associated Carcinogenesis. *Digestion*. 93(1):40-46, 2016. 査読有
- (4) Takenaka K, Fujii T, Watanabe M (他 7 名、5 番目、10 番目) : Correlation of the endoscopic and magnetic resonance scoring

- systems in the deep small intestine in crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 21:1832-1838,2015. 査読有
- (5) 藤井 俊光、渡辺 守: クロウン病画像モダリティとしての MRI 日本消化器病学会雑誌 112: 1251-1258, 2015 査読有
- (6) Matsuoka K, Fujii T, Watanabe M (他 5 名、3 番目、8 番目): Tacrolimus for the treatment of ulcerative colitis. *Intest Res.* 13:219-226,2015. 査読有
- (7) Fukushima K, Nagaishi T, Watanabe M (他 13 名、13 番目、16 番目): Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor  $\alpha$  induces high malignant potential in colon cancer cell line. *Cancer Sci.* 106:1000-1007, 2015 査読有
- (8) Matsuzawa Y, Nagaishi T, Watanabe M (他 11 名、9 番目、14 番目): TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy.* 11:1052-1062, 2015. 査読有
- (9) Fujii T, Watanabe M (他 5 名、1 番目、7 番目): Advancing MR imaging in Crohn's disease. *Digestion.* 89(1):24-30. 2014. 査読有
- (10) Takenaka K, Fujii T, Watanabe M (他 6 名、5 番目、9 番目): Comparison of magnetic resonance and balloon enteroscopic examination of deep small intestine in patients with crohn's disease. *Gastroenterology.* 147:334-342, 2014. 査読有
- (11) Saito E, Nagahori M, Fujii T, Ohtsuka K, Watanabe M: Efficacy of salvage therapy and its effect on operative outcomes in patients with ulcerative colitis. *Digestion.* 89(1):55-60, 2014. 査読有
- (12) Suzuki M, Nagaishi T, Watanabe M (他 11 名、2 番目、14 番目 \*equally contributed first authors): Myosin light chain kinase expression induced via tumor necrosis factor receptor2 signaling in the development of colitis-associated carcinogenesis. *PLoS One.* 9:e88369, 2014. 査読有
- (13) Fukuda M, Watanabe M (他 9 名、10 番目): Small intestinal stem cell identity is maintained with functional paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto colon. *Genes & Development* 28:1752-1757, 2014. 査読有
- [学会発表] (計 11 件)
- (1) Toshimitsu Fujii, Kento Takenaka, Yoshio Kitazume, Maiko Kimura, Katsuyoshi Matsuoka, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: MR enterocolonography can detect small bowel strictures and predict surgery in patients with Crohn's disease: Comparison with balloon enteroscopy. APDW 2016(兵庫県神戸市) 2016 年 11 月 3 日
- (2) Toshimitsu Fujii, Kento Takenaka, Yoshio Kitazume, Maiko Kimura, Tadahiko Iwamoto, Katsuyoshi Matsuoka, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: MR enterocolonography evaluation for small bowel strictures in patients with Crohn's disease: comparison with balloon enteroscopy. UEG Week 2016 Vienna(オーストリア) 2016 年 10 月 18 日
- (3) Toshimitsu Fujii, Kento Takenaka, Maiko Kimura, Katsuyoshi Matusoka, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: The evaluation for small bowel strictures on MR enterocolonography in patients with Crohn's disease. AOCC 2016 The 4<sup>th</sup> Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis (京都府京都市)2016 年 6 月 19 日
- (4) 藤井俊光、大塚和朗、渡辺守: MRenterocolonography (MREC) の開発とクロウン病診療における疾患活動性モニタリングツールとしての応用. 第 102 回日本消化器病学会総会(東京都新宿区) 2016 年 4 月 23 日
- (5) Toshimitsu Fujii, Kento Takenaka, Yoshio Kitazume, Maiko Kimura, Tadahiko Iwamoto, Katsuyoshi Matsuoka, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: Enteroscopic and MR findings of small intestine in Crohn's disease. UEG Week 2015 Barcelona(スペイン) 2015 年 10 月 28 日
- (6) Toshimitsu Fujii, Kento Takenaka, Yoshio Kitazume, Eiko Saito, Katsuyoshi Matusoka, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: Modifying and validating endoscopic and magnetic resonance scoring systems for the deep small intestine in Crohn's disease. AOCC 2015 The 3<sup>rd</sup> Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis. 北京(中国) 2015 年 6 月 19 日
- (7) Toshimitsu Fujii, Kento Takenaka, Yoshio Kitazume, Eiko Saito, Katsuyoshi Matusoka, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: Modifying and validating endoscopic and magnetic resonance scoring systems for the deep small intestine in Crohn's disease. DDW/AGA 2015 Washington DC.(米

- 国) 2015年5月17日
- (8) 藤井俊光、北詰良雄、竹中健人、齊藤詠子、長堀正和、大塚和朗、渡辺守: クロウン病における内視鏡的粘膜治癒と MRenterocolonography (MREC) 活動性の関係と長期予後についての検討. 第11回日本消化管学会(東京都新宿区) 2015年2月13日
- (9) 藤井俊光、長堀正和、渡辺守: クロウン病における MRenterocolonography (MREC) での病態評価と入院・手術予測. JDDW2014 第56回日本消化器病学会大会(兵庫県神戸市) 2014年10月23日
- (10) Toshimitsu Fujii, Makoto Naganuma, Yoshio Kitazume, Kento Takenaka, Eiko Saito, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: MR enterocolonography can identify patients who need additional treatment by predicting recurrence, hospitalization and surgery of Crohn's disease patients in remission. UEG Week 2014 Vienna(オーストリア) 2014年10月20日
- (11) Toshimitsu Fujii, Eiko Saito, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe: The consecutive salvage therapy of tacrolimus and infliximab is effective in patients with refractory ulcerative colitis accompanied by acceptable adverse operative outcomes. DDW/AGA 2014 Chicago(米国) 2014年5月4日

[図書] (計 11件)

- (1) Nagaishi T, Watanabe M : Paradigm of T cell differentiation in IBD: *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*; from Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach. Daniel C. Baumgart, ed. Springer, New York, NY, 2016, ISBN: 978-3-319-33701-2
- (2) 藤井俊光: IBD Imaging アトラス クロウン病典型例 小腸病変 内視鏡・MR 日本メディカルセンター 2016, 230 頁
- (3) 藤井俊光: 消化器研修ノート 改訂第2版 X線検査-上部消化管・小腸 診断と治療社 2016, 708 頁
- (4) 藤井俊光、渡辺守: JMEDIJ 治療法便覧 2016~私の治療~ 潰瘍性大腸炎 日本医事新報社 2017 in press
- (5) 藤井俊光、渡辺守: チェックリストで見える! IBD 治療薬の選び方・使い方 現在開発中の新規治療 羊土社 2015, 6
- (6) 藤井俊光: 実臨床に役立つ IBD 内視鏡-診断・モニタリング・サーベイランス クロウン病の小腸病変は内視鏡的モニタリングが必要か 日本メディカルセン

ター 2016, 264 頁

- (7) 藤井俊光、渡辺守: あなたも名医! 消化器疾患診療のギモン・シツモン・アンコモン 17. Crohn 病 18. 潰瘍性大腸炎. 日本医事新報社 2015 8
- (8) 藤井俊光、中村哲也: 一冊できわめるステロイド診療ガイド 消化器疾患患者に投与するときの注意 文光堂 2015, 7
- (9) 藤井俊光、渡辺守: 消化器疾患 最新の治療 2015-2016 炎症性腸疾患-生物学的製剤の課題と展望 南江堂 2015, 512 頁
- (10) 藤井俊光: これで納得! 画像で見ぬく消化器疾患 vol.3 小腸正常小腸と診断機器 8 MRI 医学出版 2014, 168 頁
- (11) 藤井俊光: 実践! IBD 診療 スーパーバイザー'S アドバイス NSAIDs は IBD を悪くする? 医学出版 2014 224 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 炎症性腸疾患の治療方法およびそれに用いるための医薬組成物  
 発明者: 永石宇司、渡辺守、久場敬司  
 権利者: 東京医科歯科大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2016-234062  
 出願年月日: 2016年12月01日  
 国内外の別: 国内

○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  
 藤井 俊光 (FUJII, Toshimitsu)  
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号: 30547451

(2) 研究分担者  
 永石 宇司 (NAGAISHI, Takashi)  
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号: 60447464

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授  
研究者番号：10175127

(3)連携研究者