

学位論文

「The analysis of inflammatory signals in Japanese children with
Crohn's disease」

(日本人小児クローン病における炎症性シグナルの解析)

指導教授名 石井 正浩

申請者氏名 藤武 義人

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

The analysis of inflammatory signals in Japanese children with Crohn's disease

(日本人小児クローン病における炎症性シグナルの解析)

1. 序論

クローン病の病態には、Th1 と Th17 を中心とする様々なサイトカインが関与していると考えられるが、日本人小児クローン病における詳細な検討はなされていない。今回、我々は日本人小児クローン病の活動期と寛解期における炎症性サイトカインとそれらのシグナル伝達因子の発現を血清と腸管粘膜を用いて解析した。

2. 方法

クローン病活動期と診断された 11 名 (平均年齢 10.32 ± 6.02 歳) とクローン病寛解期と診断された 20 名 (平均年齢 11.87 ± 4.29 歳) の検体を血清サイトカイン値の分析に使用した。また、これらの症例の中で、クローン病活動期の 7 名 (平均年齢 13.63 ± 1.94 歳)、クローン病寛解期の 6 名 (平均年齢 9.93 ± 4.33 歳)、健常対照者の 6 名 (平均年齢 9.90 ± 4.88 歳) の内視鏡検査で得られた腸管粘膜組織を用いて、シグナル伝達因子の発現を real time PCR 法で検討した。

3. 結果

血清サイトカイン値の検討では、クローン病寛解期と比べて、クローン病活動期における IL-6 と TNF- α が有意に増加していた ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。腸管粘膜の real time PCR 法では、クローン病寛解期や正常粘膜の小児例と比較して、クローン病活動期におけるインターフェロン γ と STAT4、TGF- β 1 の発現が有意に増強していた。

4. 結語

これらの結果より、日本人小児クローン病の病態には、Th1 と Th17 のシグナルが深く関与している可能性が示唆された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 患者の選定	1
2-2. Real-time reverse transcription PCR	2
2-3. 統計分析	2
3. 結果	
3-1. 炎症誘発性サイトカイン濃度	3
3-2. クロウン病粘膜のシグナル伝達因子の発現度	3
4. 考察	4
5. 総括	4
6. 今後の課題	4
7. 謝辞	5
8. 引用文献	6
9. 業績目録	9
10. 図表	11

1. 序論

近年、クローン病 (CD) や潰瘍性大腸炎 (UC) といった炎症性腸疾患 (IBD) と診断された日本人の若年患者が増えてきている。CD の好発年齢は 20 代後半から 30 代であるとされるが、小児期に発症する症例も決して少なくなく、欧米では罹患数は全体の約 25% と言われている。

Ishige らが、日本人における IBD の臨床調査個人票をまとめており¹、2003~2006 年に CD として特定疾患に新規登録された 2,940 人のうち、16 歳以下で発症した患者は 311 人 (10.6%) であった。乳児期に発症する症例もあるが、8 歳以降に増加する傾向が示唆されている。そのため、日本人小児例においても CD の原因と治療に対して注目されてきている。

過剰な免疫反応、病原性バクテリアの成長、遺伝子的背景^{2,4}、食の西洋化、環境要因⁵ などといったものが IBD の病因に関連があると考えられている。これらの因子と 2 種類のヘルパー T (Th) 細胞 (Th1 と Th2) の間で起こるアンバランスなシグナリングが、免疫学的な障害に至る主要な要因であると考えられる。Th1 サイトカインは CD の病因^{6,7}に、Th2 サイトカインは UC の病因⁸に関係していると考えられている。

さらに、血清中の炎症誘発性サイトカイン値の増加 (サイトカインストーム) は、IBD の活動期にしばしば認められる。特に、インターロイキン (IL) -6 値の増加は、臨床診療において認めることが多い⁹。しかしながら、クローン病活動期、それも日本人小児例における Th17 サイトカインと IBD との病因関係は、詳細に検討されていない。

この研究では、日本人小児クローン病の病因を特定するために炎症誘発性サイトカインの血清中の濃度を測定し、炎症病変を認めた腸管粘膜を用いて炎症性シグナル伝達因子を解析した。

2. 方法

2-1. 患者の選定

クローン病活動期と診断された 11 名 (平均年齢 10.32 ± 6.02 歳) とクローン病寛解期と診断された 20 名 (平均年齢 11.87 ± 4.29 歳) の検体を血清サイトカイン値の解析に使用した (図 1)。

クローン病活動期は、IOIBD (炎症性腸炎疾患研究の国際機関によって提示された活動評価項目) 2ポイント以上であった時に、クローン病寛解期は、IOIBD の評価得点が 1ポイント未満で、血清 C 反応性蛋白 (CRP) 値と赤血球沈降速度 (ESR) であった時に診断した。

また、クローン病活動期の 7 名 (平均年齢 13.63 ± 1.94 歳)、クローン病寛解期の 6 名 (平均年齢 9.93 ± 4.33 歳)、健常対照者の 6 名 (平均年齢 9.90 ± 4.88 歳) には内視鏡検査を行い、腸管粘膜組織を採取してシグナル伝達因子の発現度を解析した (図 2)。

比較対照者は、便潜血を調査するために内視鏡検査を受けた患者で、病理検査で正常粘膜と診断した腸管粘膜組織を使用した。この研究で使用した腸管粘膜組織は、回腸末端より採

取した。

自己免疫性疾患や、この研究の前に治療を受けている患者は除いた。また、この研究を登録する前には全ての子供たちの保護者の同意を得て、研究のプロトコールは順天堂大学病院の倫理委員会の承認を得た。

2-2. 解析内容

血清サイトカイン値を解析するにあたり、炎症誘発性サイトカインとして、IL-4、IL-5、IL-6、インターフェロン- γ (IFN- γ)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) とトランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF- β 1) を酵素結合免疫吸着法 (ELISA) で測定し、活動期と寛解期の測定結果を比較した。

粘膜のシグナル伝達因子の発現度を解析するにあたり、Th1 関連因子として、IFN- γ 、T-box expressed in T cells (T-bet)、signal transducer and activator of transcription (STAT) 4 を、Th2 関連因子として、GATA binding protein 3 (GATA3)、STAT6 を、Th17 関連因子として、IL-17A、STAT3、retinoic acid receptor-related orphan receptor C (RORC) を、制御性 T 細胞関連因子として、TGF- β 1、IL-10、Forkhead box protein (Foxp) -3 を Real time PCR 法で検討した。

2-3. Real-time reverse transcription PCR (リアルタイム・逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

生検した粘膜サンプルは、RNA later (アプライドバイオシステム、フォスターシティー、CA、USA) の入ったマイクロチューブに入れて、 -30°C で保存した。サンプルはRiboPure kit (アプライドバイオシステム) を用いて細断、均質化した。次に、クロロホルムとイソプロパノールを用いてRNA抽出を行った。RNAからcDNAを合成するために、High-Capacity Reverse Transcription Master Mix (アプライドバイオシステム) を使用した。

Real-time reverse transcription(RT) -PCRは、ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (アプライドバイオシステム) のTaqMan PCR Master Mix (アプライドバイオシステム) を用いて行った。全てのプライマーは、Assay-on-Demand kits (アプライドバイオシステム) を用いて準備した。PCRの条件設定としては、最初の変性に95度で10分間、1サイクルの変性を95度で15秒間、40サイクル増幅を行い、アニーリング、60度で1分間延長した。

それぞれの遺伝子の発現度は、検量線として使用する β -アクチン・ハウスキーピング遺伝子の発現度で定量化を行った。

2-4. 統計分析

血清中の炎症誘発性サイトカイン濃度の統計分析は、unpaired t-test を用いた。 β -アクチン発現と比較したシグナル伝達因子は、Mann-Whitney U-test を用いて分析した。p < 0.05 値を統計学的有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 炎症誘発性サイトカイン濃度

クローン病寛解期と比較すると、IL-6 と TNF- α の血清値は活動期において有意に増加した（それぞれ、 $P < 0.01$ と 0.05 ）（表 1）。IL-4、IL-5、IFN- γ と TGF- $\beta 1$ といった他の血清サイトカイン濃度は、活動期に有意な増加は認めなかった。

3-2. クローン病粘膜のシグナル伝達因子の発現度

リアルタイム・逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、クローン病活動期、クローン病寛解期、健常対照者間を比較した。

Th1 関連の因子を評価すると、寛解期と比較して、活動期には、T-bet ではなく IFN- γ と STAT4 の粘膜発現度が増強した（両方、 $P < 0.05$ ）（図 2）。しかし、健常対照者（ $P < 0.05$ ）と比較すると、STAT4 や T-bet ではなく、IFN- γ の粘膜発現度が活動期において有意に増強した（ $P < 0.05$ ）。

STAT6、GATA3、RORC、IL-17A、STAT といった、Th2 または Th17 関連の因子の粘膜発現度には三者間の比較では有意差を認めなかった（図 3, 4）。

制御性T細胞の重要なサイトカインである TGF- $\beta 1$ の粘膜発現度は、寛解期と比較すると、活動期で優位に増加したが（ $P < 0.05$ ）、健常対照者と比較では認めなかった（図 5）。また、IL-10 と Foxp3 の粘膜発現度は、三者間の比較では有意差を認めなかった。

4. 考察

IBD の病因について、血清炎症誘発性サイトカインとの関係を示唆している研究は様々ある。クローン病に関係する主要な免疫学的細胞が Th1 と Th17 細胞であることは一般的に知られている^{10,11}。一部の著者は、粘膜損害が Th1 細胞によって引き起こされる時に Th17 細胞のシグナリングがどこで Th1 細胞を活動させるのに必要となっているのかについて示唆している^{7,8}。この考えは、RORC や STAT3 よりも IFN- γ と STAT4 が腸管粘膜での発現増強することで Th1 細胞のシグナリングが患者の粘膜炎症増悪に直接影響するかもしれないことを示唆した今回の研究結果とも一致する。一方、IL-6 の血清レベル増加は、Th1 細胞を刺激することによって粘膜炎症の増悪を更に促すと考える。血清 IL-6 濃度がクローン病活動期において、日本の子供たちで有意に増加したが、RORC と STAT3 の粘膜発現は今回の研究では有意差は認めなかった。Th17-関連因子が小児クローン病の初期段階では完全に活性化されないのではないかと考えることができる。ただし、今後の更なる研究により、小児クローン病で粘膜炎症に至る過程の正確な機序を特定していく必要がある。

今回の研究では、小児クローン病患者の粘膜で T-bet、IL-17A、STAT3 の発現増強を調べたが、有意な結果は認めなかった。粘膜生検を行った部位の炎症性変化は様々であり、Th17

関連の因子の発現は多様であった。もう一つ考慮する点は、成人症例で認めるような臨床症状を今回の小児例では明らかに認めなかったことがある。Stroberらは、量的見解から、CDにおけるTh1の反応は、CDの初期段階ではTh17の反応よりはるかに増強していると報告している¹²。今後の研究としては、重度の小児クローン病患者での症例解析が必要である。

Mitsuyamaらは、成人のクローン病患者において、IL-6と可溶性IL-6受容体の血清レベル増加を認めると報告した¹³。また、患者のIL-6の血清レベルとCRPの相関関係も確認した。IL-6は炎症の過程で関連するTh1とTh2細胞の活動に対して主要な炎症誘発性サイトカインであるので、生物学的治療における目標とするサイトカインと考える。

Yamamotoらは、クローン病の治療のために、ラットに対して抗マウスIL-6受容体抗体を投与した¹⁴。さらに、Itoらは、複数の施設において二重盲検法、プラセボ対照試験を行い、ヒト抗IL-6受容体モノクローナル抗体がクローン病の治療に効果的であるとまとめた¹⁵。今回の研究では、IL-6の血清レベルが日本人小児クローン病の活動期に有意に増加することを確認した。また、我々は以前の研究で小児IBDにおけるIL-6の血清レベルとCRP間との相関関係とIL-6がTh17細胞の生成に不可欠であることを確認しており、IL-6は小児クローン病活動期において重要な役割を担っていると考え^{9,16-18}。

5. 総括

今回の研究結果は、日本人小児におけるクローン病の病因には、Th1とTh17細胞の関与の可能性を示唆することができた。しかしながら、予測したシグナリング因子の活性化を証明できていないことがあり、今後の更なる研究で日本人小児クローン病の病因を確認していくことが必要と考える。

6. 今後の課題

近年、内視鏡機器の精密化と検査技術の向上により、小児においても内視鏡検査が可能な症例が増えてきている。現在、多施設において小児の内視鏡検査は行われており、小児期発症のIBDの病因検索を行っている。今回の研究結果の正確性を高めるためには、症例数を増やす必要があり、今後当院でも小児の内視鏡検査を進めていきたい。しかし、クローン病の場合は、疾患特異性、全層性病変であることを考えると、粘膜のみでIBDに関連したシグナル伝達因子の発現度を評価するのは限界がある。また、シグナル伝達因子の発現度と各種細胞に作用するサイトカイン濃度との相関性の証明、サイトカイン受容体の発現度の証明も行わなければ、病因との関連性の証明は難しい。今後、UCを含めたIBD全体での検査及び評価を検討していく方針である。

7. 謝辞

研究および論文作成にあたりご指導いただいた、順天堂大学医学部小児科学講座 清水俊明先生および大塚宜一先生、北里大学医学部小児科学 石井正浩先生に深謝いたします。

8. 引用文献

1. Ishige T, Tomomasa T, Takebayashi T, Asakura K, Watanabe M, Suzuki T, et al. Inflammatory bowel disease in children: epidemiological analysis of the nationwide IBD registry in Japan. *J Gastroenterol* 2010;45:911-7
2. Hugot JP, Chamailard M, Zourai H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603
3. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicole DL, Chen FF, Romos R, et al. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-606
4. Sun L, Nava GM, Stappenbeck TS. Host genetic susceptibility, dysbiosis, and viral triggers in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;2:321-327
5. Asakura H, Suzuki K, Kitahora T, Morizane T. Is there a link between food and intestinal microbes and the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis? *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1794-801
6. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut. *Science* 2005;307:1920-1925
7. Matsuoka K, Inoue N, Sato T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kishi Y, et al. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 2004;53:1303-1308
8. Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation. *BMC Med* 2011;9:122-7

9. Ohtani K, Ohtsuka Y, Ikuse T, Baba Y, Yamakawa Y, Aoyagi Y, et al. The increased expression of GATA-3 but T-bet observed in the mucosa from children with acute phase of inflammatory bowel disease. *Pediatr Int* 2010;52:584-89
10. Fuss IJ, Becker C, Yang Z, Groden C, Hornung RL, Heller F, et al. Both IL-12 p70 and IL-23 are synthesized during acute Crohn's disease and are downregulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:9-15
11. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70
12. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140:1756-67.
13. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, et al. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 1995;36:45-49
14. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol* 2000;164:4878-4882
15. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody non-acute Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:989-996
16. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310-1316
17. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234

18. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-1133

9. 業績目録

(I) 主論文

1. Fujitake Y, Iwasaki T, Suyama N, Endo S, Arai M, Sasaki M, Yazawa M, Otsu S, Ishii M. : Nutritional evaluation of children with severe motor and intellectual disabilities. *Kitasato Med J.* 2014; 44: 31-37.

2. Fujitake Y, Ohtsuka Y, Ikuse T, Ohtani K, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Ishii M, Shimizu T. : Analysis of inflammatory signals in Japanese children with Crohn's disease. *Pediatrics International.* 2013 Dec; 55(6): 753-756.

(II) 著 書

1. 藤武義人：口内炎、驚口瘡、舌の疾患，今日の小児治療指針（第16版），医学書院，東京，2015，434頁。
2. 藤武義人：小児疾患診療のための病態生理 1 「21. 過敏性腸症候群」，小児内科，東京医学社，東京，2014，46巻増刊号，572-576頁。
3. 藤武義人：小児疾患の診断治療基準(第4版) 蛋白漏出性胃腸症，小児内科，東京医学社，東京，2012，44巻増刊，372-373頁。
4. 藤武義人：腹部膨満・腫瘤，小児科，金原出版，東京，2012，53巻11号，1581-1586頁。
5. 藤武義人：Dieulafoy潰瘍に対する内視鏡治療，小児外科，東京医学社，東京，2012，44巻3号，268-271頁。
6. 藤武義人：メッケル憩室、消化管重複症，今日の小児治療指針（第15版），医学書院，東京，2012，435頁。
7. 藤武義人：学童期以降の嘔吐の原因と診断・管理手順，小児内科，東京医学社，東京，2011，43巻12号，1986 - 1990頁。
8. 藤武義人：最近の下痢に対する食事療法の考え方について教えてください，小児内科，東京医学社，東京，2011，43巻増刊号，684 - 687頁。
9. 藤武義人：過敏性腸症候群，小児臨床栄養学（児玉浩子，玉井浩，清水俊明），初版，診断と治療社，東京，2011，223-225頁。
10. 藤武義人：単一症候性下痢，小児科臨床ピクシス（五十嵐隆，清水俊明），初版，中山書店，東京，2010，18巻「下痢・便秘」，60 - 62頁。
11. 藤武義人：単一症候性下痢と過敏性腸症候群，小児内科，東京医学社，東京，2009，41巻12号，1755 - 1758頁。

(III) 総説・講座

なし

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. 蔣世旭, 中島裕康, 坂東由紀, 杉山尚人, 高梨学, 藤武義人, 石井正浩, 三上哲夫, 村雲芳樹: 難治性てんかんと免疫不全症に合併した慢性活動性EBウイルス感染症の女児例. 北里医学, 43:123-126, 2013.
2. 石田倫也, 扇原義人, 佐藤慎太郎, 高梨学, 峰尾恵梨, 昆伸也, 安藤寿, 野々田豊, 藤武義人, 石井正浩: 小児科に入院したインフルエンザ感染症例に対するペラミビル投与の臨床的検討. 小児科診療, 76巻1号: 155-158, 2013.
3. 原真人, 藤武義人, 島貫郁, 野々山勝人, 砂川慶介, 石井正浩: シプロフロキサシンが有効であったサルモネラ髄膜炎の新生児例. 日本小児科学会雑誌, 114(4): 699 - 705, 2010.
4. 林初香, 梅原実, 箕浦克則, 原真人, 上田康久, 藤武義人, 松浦由希子: 呼吸管理に難渋した気管狭窄を伴う右肺欠損の1男児例. 日本小児呼吸器疾患学会雑誌, 16巻1号: 33-40, 2005.

10. 図表

	Active	Remission	Control
人数	7	6	6
性別(男性:女性)	6:1	3:3	5:1
年齢 (mean ± SD)	13.63 ± 1.94	9.93 ± 4.33	9.90 ± 4.88

図 2. クロウン病患者と正常対照者における RT-PCR 法の結果

	活動期	寛解期
人数	11	20
性別(男性:女性)	6:5	17:3
年齢 (mean ± SD)	10.32 ± 6.02	11.87 ± 4.29

図 1. 血清サイトカインを分析したクロウン病患者

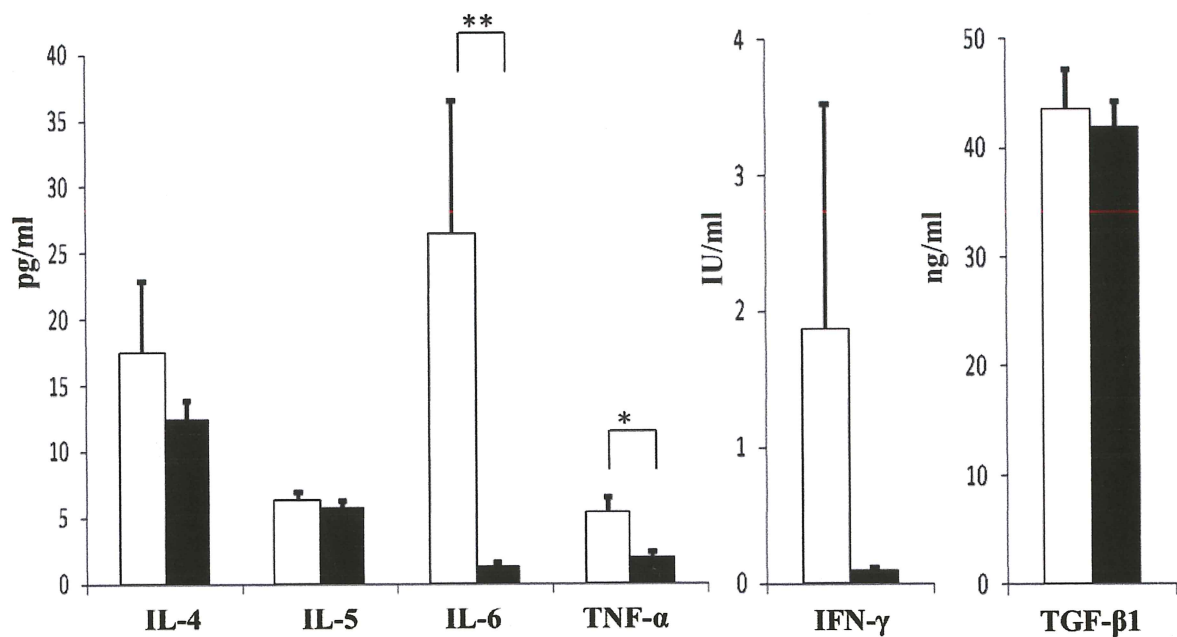


表1 小児クローン病患者における活動期と寛解期の血清 IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1値の比較. 活動期($n=11$, open column), 寛解期 ($n=20$, closed column) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, mean \pm SE).

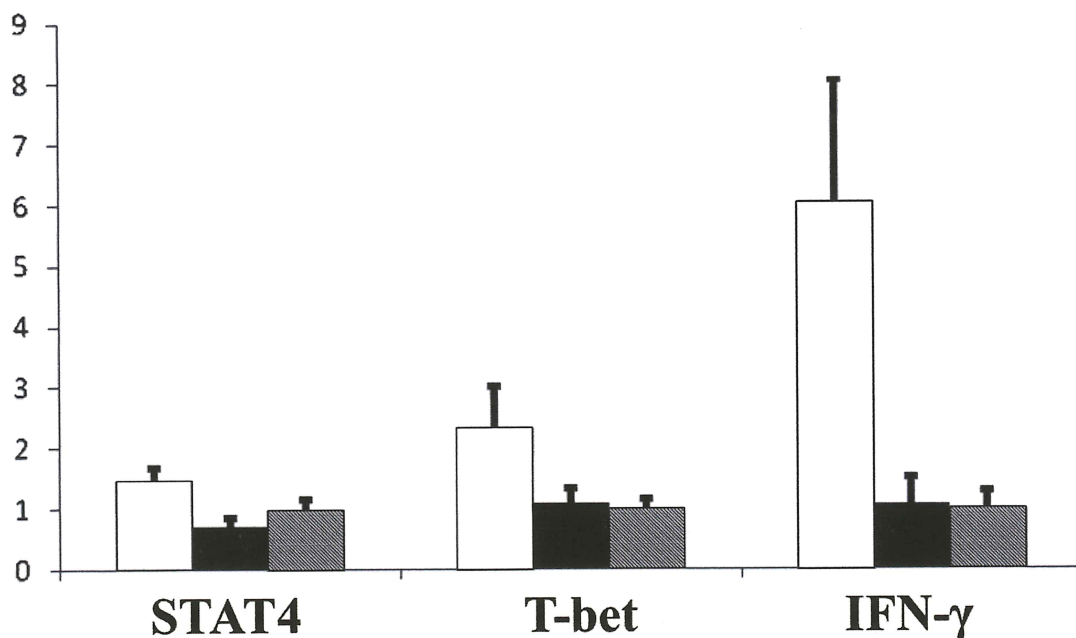


表2 小児クローン病患者の活動期と寛解期および正常対照者の腸管粘膜におけるTh1関連因子 (STAT4, T-bet, IFN- γ) の発現度の比較. 活動期($n=7$, open column), 寛解期($n=6$, closed column), 正常対照者($n=6$, checked column) (* $P < 0.05$, mean \pm SE).

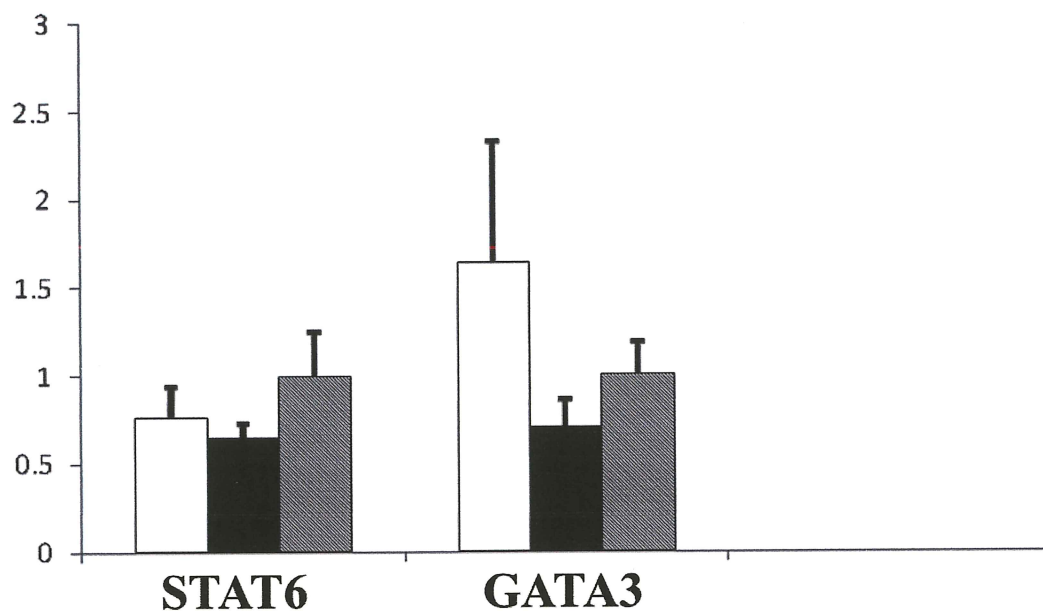


表3 小児クローン病患者の活動期と寛解期および正常対照者の腸管粘膜におけるTh2関連因子 (STAT6,GATA3) の発現度の比較. 活動期 ($n = 7$, open column), 寛解期 ($n = 6$, closed column), 正常対照者 ($n = 6$, checked column) (mean \pm SE).

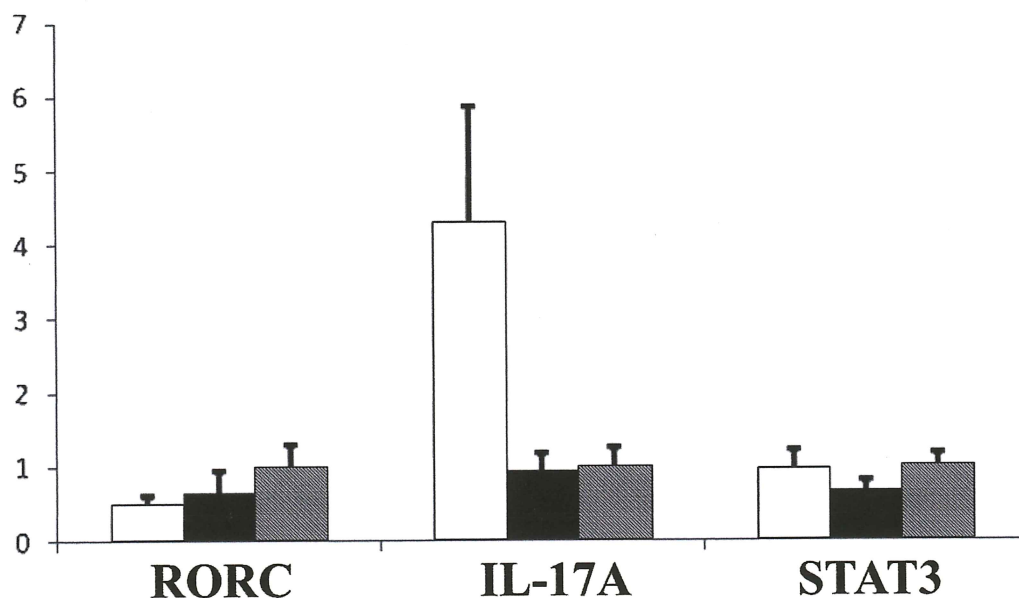


表4 小児クローン病患者の活動期と寛解期および正常対照者の腸管粘膜におけるTh17関連因子 (RORC,IL-17A,STAT3) の発現度の比較. 活動期($n = 7$, open column), 寛解期 ($n = 6$, closed column), 正常対照者 ($n = 6$, checked column) (mean \pm SE).

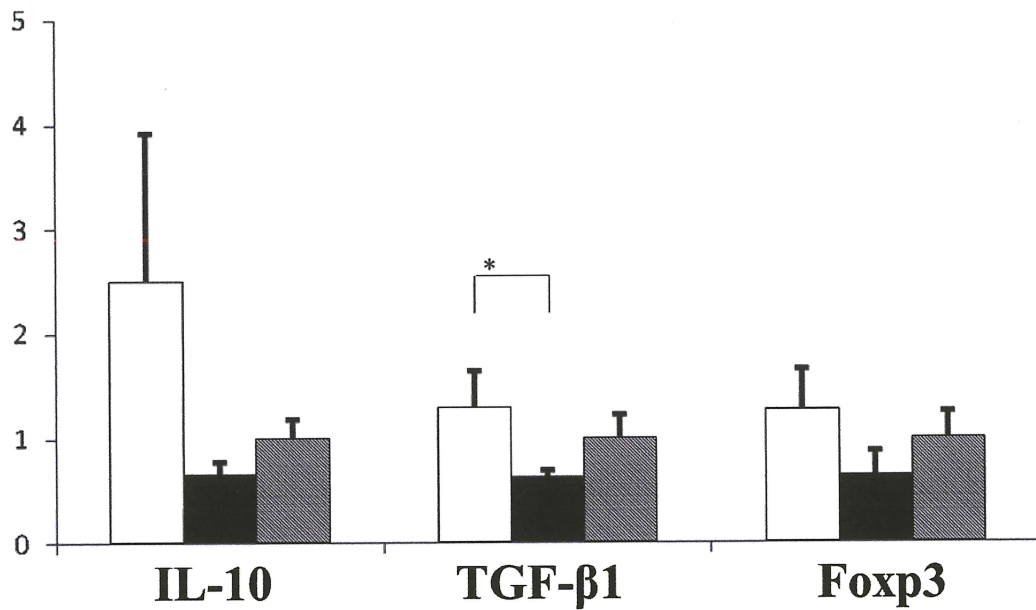


表5 小児クローン病患者の活動期と寛解期および正常対照者の腸管粘膜における制御性T細胞関連因子 (IL-10,TGF- β ,Foxp3) の発現度の比較. 活動期($n = 7$, open column), 寛解期($n = 6$,closed column) , 正常対照者($n = 6$, checked column) (* $P < 0.05$,mean \pm SE).