

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | クローン病における好中球殺菌機構の解析                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Sub Title        | Bactericidal function of neutrophils in Crohn's disease                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Author           | 松岡, 克善 (Matsuoka, Katsuyoshi)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Publisher        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Publication year | 2013                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2012. )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Abstract         | <p>腸管の慢性炎症性疾患であるクローン病の原因は未だ解明されていない。一方で、好中球NADPH oxidaseの先天性異常のために、好中球殺菌機能が障害される慢性肉芽腫症において、クローン病類似の消化管病変を発症することが知られている。このことは、好中球殺菌能の異常により、クローン病に類似した病態が発症し得ることを示している。そこで、好中球による腸内細菌に対する殺菌能の異常がクローン病の病態形成に関与している可能性を考え、クローン病患者の好中球機能異常を系統的に調べ、クローン病の病態への関与を明らかにすることを目的として下記の検討を行った。</p> <p>クローン病患者の末梢血好中球および腸管粘膜内好中球を用いて、1) 細菌刺激によるサイトカイン産生能、2) 細菌貪食能、3) 活性酸素産生能、4) アポトーシス、5) 抗菌ペプチド産生能について検討した。アポトーシス、細菌貪食能、活性酸素産生、抗菌ペプチド産生は健常人の好中球と差を認めなかったが、クローン病患者の好中球からのIL-6・IL-1</p> |
| Notes            | <p>研究種目：基盤研究(C)<br/>研究期間：2010～2012<br/>課題番号：22590708<br/>研究分野：医歯薬学<br/>科研費の分科・細目：消化器内科学</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Genre            | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22590708seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22590708seika</a>                                                                                                                                                                                                                                                                   |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590708

研究課題名（和文） クローン病における好中球殺菌機構の解析

研究課題名（英文） Bactericidal function of neutrophils in Crohn's disease

研究代表者

松岡 克善（MATSUOKA KATSUYOSHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40307393

研究成果の概要（和文）：

腸管の慢性炎症性疾患であるクローン病の原因は未だ解明されていない。一方で、好中球 NADPH oxidase の先天性異常のために、好中球殺菌機能が障害される慢性肉芽腫症において、クローン病類似の消化管病変を発症することが知られている。このことは、好中球殺菌能の異常により、クローン病に類似した病態が発症し得ることを示している。そこで、好中球による腸内細菌に対する殺菌能の異常がクローン病の病態形成に関与している可能性を考え、クローン病患者の好中球機能異常を系統的に調べ、クローン病の病態への関与を明らかにすることを目的として下記の検討を行った。

クローン病患者の末梢血好中球および腸管粘膜内好中球を用いて、1) 細菌刺激によるサイトカイン産生能、2) 細菌貪食能、3) 活性酸素産生能、4) アポトーシス、5) 抗菌ペプチド産生能について検討した。アポトーシス、細菌貪食能、活性酸素産生、抗菌ペプチド産生は健康人の好中球と差を認めなかったが、クローン病患者の好中球からの IL-6・IL-1 $\beta$ 産生は有意に低下していた。以上より、クローン病では好中球機能が異常になっている可能性が考えられたが、今後さらにそのメカニズムや、病態への関与を検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

The etiology of Crohn's disease (CD), characterized by chronic intestinal inflammation, has not yet been identified. Interestingly, chronic granulomatous disease, in which neutrophil bactericidal function is impaired due the congenital defect of NADPH oxidase, is known to develop intestinal lesions similar to CD. This fact indicates that CD-like lesions can develop in patients with impaired neutrophil function. Thus, it was hypothesized that abnormal response of neutrophils to intestinal microbiota can be a cause of CD. To examine this hypothesis, bactericidal function of neutrophils of Crohn's disease were systematically analyzed. Neutrophils were isolated from peripheral blood of healthy controls and CD to examine neutrophil functions including 1. Cytokine production, 2. Phagocytosis, 3. Reactive oxygen species (ROS) production, 4. Apoptosis, and 6. Anti-microbial peptide (AMP) production. While no difference was observed in terms of apoptosis, phagocytosis, ROS production, or AMP production, neutrophils of CD patients produced significantly less IL-6 and IL-1  $\beta$  compared with healthy controls. Further studies are needed to explore the mechanism of the reduced cytokine production and its contribution to the pathogenesis of CD.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合 計       |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2012 年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 総 計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：クローン病、好中球、殺菌能

### 1. 研究開始当初の背景

クローン病は、主として若年者に発症する腸管の慢性炎症性疾患である。クローン病は、病状の進行により腸管の狭窄や穿孔を来すため、発症 10 年以内に 70% の患者が手術を余儀なくされるなど、患者の社会生活や QOL に重大な影響を与える疾患である。日本においても患者数が急増しているが、クローン病の病因は現在でも不明である。

一方で、好中球 NADPH oxidase の先天性異常のために、好中球殺菌機能が障害される慢性肉芽腫症において、クローン病類似の消化管病変を発症することが知られている。このことは、好中球殺菌能の異常により、クローン病に類似した病態が発症し得ることを示している。

### 2. 研究の目的

本研究では、慢性肉芽腫症とクローン病の類似性に注目し、好中球による腸内細菌に対する殺菌能の異常がクローン病の病態形成に関与している可能性を考え、クローン病患者の好中球機能異常を系統的に調べ、クローン病の病態への関与を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

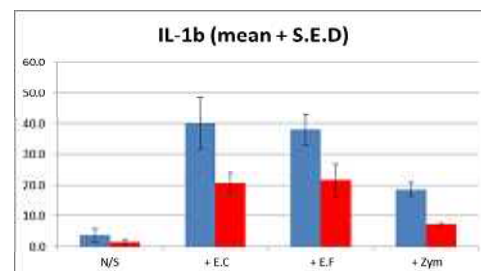
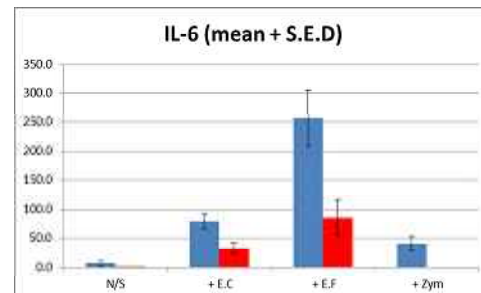
クローン病患者の末梢血好中球および腸管粘膜内好中球を用いて、1) 細菌刺激によるサイトカイン産生能、2) 細菌貪食能、3) 活性酸素産生能、4) アポトーシス、6) 抗菌ペプチド産生能について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 結果

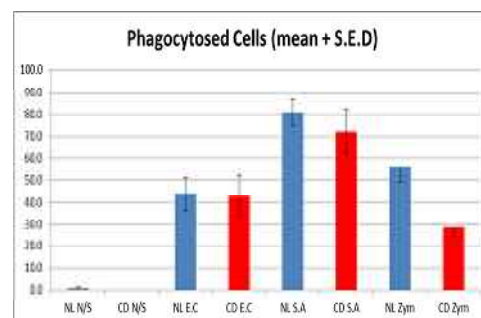
##### 1) サイトカイン産生

健常人およびクローン病患者より末梢血好中球を単離し、加熱処理した *E. coli* (E.C.), *E. faecalis* (E.F.), Zymosan で刺激し、培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。IL-12 p70, TNF, IL-8, IL-10 においては、健常人とクローン病患者で差を認めなかったが、IL-6, IL-1 $\beta$  の産生はクローン病で低下していた。



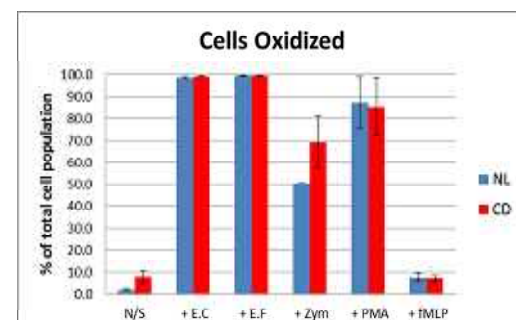
##### 2) 貪食能

蛍光標識した死菌または Zymosan を用いて、flowcytometry にて好中球貪食能を評価したが、クローン病患者の好中球と健常人対照者で貪食能に差は認めなかった。



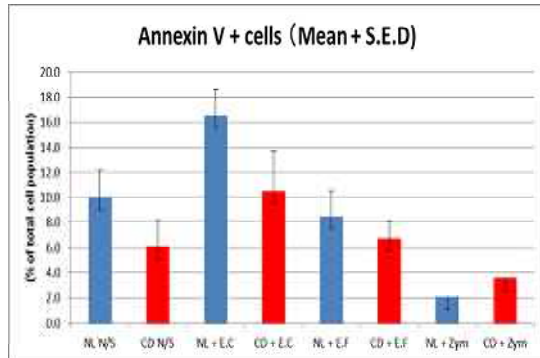
##### 3) 活性酸素産生

死菌刺激もしくは Zymosan による活性酸素を測定したが、クローン病患者の好中球と健常人対照者で貪食能に差は認めなかった。



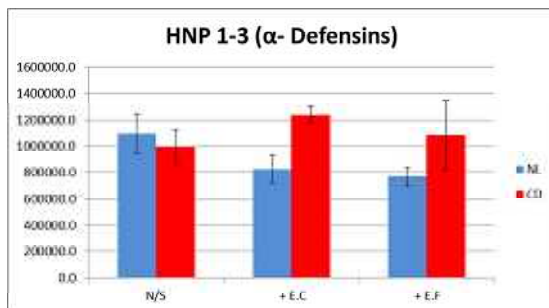
#### 4) アポトーシス

死菌刺激もしくはZymosanによるアポトーシスを、Annexin Vを用いたflowcytometryにて調べたが、クローン病患者の好中球と健常人対照者で差は認めなかった。



#### 5) 抗菌ペプチド産生

死菌刺激後の抗菌ペプチド( $\alpha$ -Defensin,  $\beta$ -Defensin)産生をELISA法にて測定したが、クローン病患者の好中球と健常人対照者で差は認めなかった。



#### (2) 考察

今回の検討結果では、クローン病の好中球において貪食能、活性酸素産生能、アポトーシス、抗菌ペプチド産生能では健常人対照者と差を認めなかった。一方、IL-6・IL-1 $\beta$ の産生は有意に低下していた。以上より、クローン病では好中球機能が異常になっている可能性が考えられたが、今後さらにサイトカイン産生低下のメカニズムや、その病態への関与を検討する必要がある。

#### 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 9 件)

1. 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 $\gamma$ R-mediated CD14 macrophage activation. Gut 2012 [in press (査読あり)]

2. 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 cells make different contributions to colitis in mice. Gastroenterology. 2012;143(5):1288-97. (査読あり)

3. Mizukami T, Kanai T, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Handa T, Matsumoto A, Jun L, Matsuoka K, Sato T, Hisamatsu T, Hibi T. CCR9(+) macrophages are required for eradication of peritoneal bacterial infections and prevention of polymicrobial sepsis. Immunol Lett. 2012;147:75-9. (査読あり)

4. Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T, Hibi T. Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. Immunology. 2012;136:153-62. (査読あり)

5. Miyoshi J, Yajima T, Okamoto S, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Shimamura K, Nakazawa A, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Hibi T. Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. J Gastroenterol. 2011;46:1056-1063. (査読あり)

6. 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 the Development of Colitis, Blocking Differentiation of T-helper 17 Into Alternative T-Helper 1 Cells. Gastroenterology. 2011;141:1014-1023. (査読あり)

7. Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes

to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. Clin Exp Immunol. 2011; 164:137-144.  
(査読あり)

8. Miyoshi J, Yajima T, Okamoto S, **Matsuoka K**, Inoue N, Hisamatsu T, Shimamura K, Nakazawa A, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Hibi T. Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. J Gastroenterol. 2011;46:1056-1063.  
(査読あり)

9. Mikami Y, Kanai T, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Okazawa A, Kamada N, **Matsuoka K**, Hisamatsu T, Okamoto S, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Hibi T. Competition between colitogenic Th1 and Th17 cells contributes to the amelioration of colitis. Eur J Immunol. 2010 ;40:2409-2422.  
(査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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  
該当なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松岡 克善 (MATSUOKA KATSUYOSHI)  
慶應義塾大学・医学部消化器内科・助教  
研究者番号：40307393

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：