

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：14401
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19059011
 研究課題名（和文） 自然免疫系の自己識別における役割

研究課題名（英文） Role of Innate Immunity in self/nonself discrimination

研究代表者

竹田 潔 (TAKEDA KIYOSHI)
 大阪大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：20309446

研究成果の概要（和文）：異物認識受容体を介した自己・非自己の識別による自然免疫系の活性化を制御する分子機構を解析した。そして、異物認識による遺伝子発現を核内因子 I κ B ζ が制御する分子機構を明らかにした。また、異物でありながら非自己として認識されない腸内共生細菌による、腸管自然免疫細胞の活性制御機構を解析した。そして、腸管マクロファージが腸内細菌によりその活性が負に制御されていること、腸管特有の樹状細胞が腸内細菌由来因子により活性化されT細胞応答を誘導することを見出した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the mechanisms by which discrimination of self and non-self via pattern recognition receptors regulates innate immune responses. First, we revealed that nuclear factor I κ B ζ regulates gene expression induced by pattern recognition receptors. We also analyzed the regulatory mechanisms of intestinal innate immune cells by commensal microflora, which are non-self but not recognized as non-self. We revealed that activity of intestinal macrophages is negatively regulated by commensal microflora. We also demonstrated that a commensal bacteria-derived factor activates intestinal dendritic cells to induce T cell-dependent responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,000,000	0	17,000,000
2008年度	17,000,000	0	17,000,000
2009年度	17,000,000	0	17,000,000
2010年度	17,000,000	0	17,000,000
2011年度	17,000,000	0	17,000,000
総計	85,000,000	0	85,000,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫、遺伝子発現、粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫系を獲得免疫系とともに担う自然免疫系にも非自己を認識するシステムが存在していることが Toll-like receptor (TLR)の機能解析から明らかになった。自然免疫系では、TLRなどのパターン認識受容体と呼ばれる分子群が、我々ヒトには存在しない病原体に特有

の成分をパターンとして認識し、自然免疫系の活性化ばかりでなく獲得免疫系の活性化をも誘導することが明らかになった。当初これらパターン認識受容体は、非自己そのものを認識するため、自己を誤って認識することはないと考えられていたが、特に核酸成分などの自己の成分を認識してしまい、これが全

身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患の発症原因となる可能性が示唆されている。また、自然免疫系の活性を負に制御する機構が破綻し、異常活性化状況に陥ると、通常は腸管内で宿主と共生している非自己として認識されない腸内細菌叢が原因となり、慢性炎症性腸疾患が発症することも明らかになってきた。このように、自然免疫系における自己・非自己の識別機構の制御、さらにパターン認識受容体による自然免疫系の活性化誘導機構、さらにその活性制御機構の解明は、免疫応答を統合的に理解するうえでは、必要・不可欠な要素であることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、パターン認識受容体を介した自己・非自己の識別による自然免疫系の活性化を制御する分子機構を明らかにする。特に、自然免疫系細胞における TLR 依存性の遺伝子発現の制御機構を分子レベルで明らかにする。また、腸管粘膜に存在する特有の自然免疫系細胞が、腸管内共生細菌によりどのような分子機構で活性化され、またその活性が制御されているかを明らかにする。これらの解析により、自然免疫系の活性制御による感染症予防、免疫疾患の制御技術の開発に向けた基盤を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) TLR 依存性の遺伝子発現の制御機構の解析：自然免疫系細胞での TLR 依存性の遺伝子発現誘導機構を核内 IκB 分子群による制御機構を中心に解析する。
- (2) 共生細菌による腸管特有自然免疫系細胞の活性制御機構の解析：腸管特有の自然免疫系の活性の共生細菌および共生細菌由来因子による制御機構を解析する。

4. 研究成果

- (1) TLR 依存性の遺伝子発現の制御機構の解析

これまでに IκBNS の機能解析から、TLR 刺激による NF-κB 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、IκBNS は遅期誘導型の遺伝子発現を NF-κB の活性を制御することにより抑制していることを見出していた。そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析するため、TLR 刺激による NF-κB 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。その結果、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスし易く、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセ

スされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターが TLR 刺激依存性にクロマチン構造変換を受けるとのメカニズムを解析した。IκBNS のファミリー分子 IκBzeta は、マクロファージで TLR 刺激により早期誘導型遺伝子として誘導される。IκBzeta ノックアウトマウス由来のマクロファージは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の誘導がほとんど見られない。逆に、IκBzeta をマクロファージに恒常的に発現させておくと、遅期誘導型遺伝子の誘導が早まった。さらに、IκBzeta ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子プロモーターの histone H3 の trimethylation (Me3-H3K4: クロマチン構造が開いていることの一つの指標) が誘導されず、逆に IκBzeta を恒常的に発現させたマクロファージでは、Me3-H3K4 が早く誘導された。これらの結果から、IκBzeta が遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与していることが明らかになった。遅期誘導型遺伝子群は T 細胞の活性制御に関与する遺伝子が含まれており、これら遺伝子群の選択的制御法の開発は自然免疫系の異常により T 細胞依存性に発症する免疫疾患の治療法開発に資することが期待されるが、本成果はそれに向けた基礎的基盤を提供した。

- (2) 共生細菌による腸管特有自然免疫系細胞の活性制御機構の解析

腸管粘膜固有層には、炎症性腸疾患に深く関わる Th17 細胞が多く存在している。腸管粘膜固有層での Th17 細胞の分化誘導機構を解析した。腸管粘膜固有層での Th17 細胞の分化誘導を司る樹状細胞として、腸管粘膜固有層に特有の CD70 陽性樹状細胞を同定した。この樹状細胞を大腸粘膜固有層より単離し脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養すると、Th17 細胞が誘導された。腸内細菌の存在しない germ free マウスでは腸管 Th17 細胞が激減していた。Germ free マウスの便中の ATP (アデノシン 3 リン酸) 濃度は specific pathogen free (SPF) マウスの便中濃度に比べて極めて低いことから、ATP の Th17 細胞分化への関与を解析した。Germ free マウスに ATP を投与すると、Th17 細胞数が増加した。逆に SPF マウスに ATP 加水分解酵素を投与すると Th17 細胞が減少した。また、SPF マウスに抗生剤を投与したところ、便中 ATP 濃度の低下とともに、Th17 細胞数が減少した。これらの結果から、腸内細菌由来の ATP が、Th17 細胞分化誘導に関わっていることを明らかにした。また、CD70 陽性樹状細胞とナイーブ CD4 陽性 T 細胞の共培養中に ATP を投与すると Th17 細胞分化が増強した。さらに、ATP 投与による Th17 細胞分化の誘導は、SCID マ

ウスへのナイーブ T 細胞移入による腸炎誘発モデルを増悪させることも見出した。以上の結果から、腸管粘膜においては、腸内細菌由来の ATP が腸管特有の樹状細胞に作用し、Th17 細胞分化を司っていることが明らかになった。このように特有の免疫系を有する腸管免疫系において、他の組織に存在しない自然免疫担当細胞が存在し、特有の免疫応答を演出していることを見出した。

腸管に特有の CD70 陽性樹状細胞が含まれる CD11b⁺CD11c⁺細胞群をさらに詳細に解析すると、CX3CR1 の発現レベルにより三つのサブセットに分けられることが明らかになった。その中で CX3CR1^{high}CD11b⁺CD11c⁺細胞が、直接 T 細胞の増殖を抑制する機能を有していること、個体レベルで、免疫不全(SCID)マウスにナイーブ T 細胞を移入することにより発症する T 細胞依存性腸管炎症を、腸管局所での T 細胞増殖を抑制することにより抑制していることを見出し、制御性ミエロイド(Mreg)細胞と名付けた。Mreg 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると、IL-10 誘導性の遺伝子が多数高発現していたため、IL-10 欠損マウスの Mreg 細胞の機能を解析した。IL-10 欠損マウス由来の Mreg 細胞は、T 細胞増殖抑制機能が障害されていた。また IL-10 のシグナルに必須の Stat3 遺伝子自然免疫細胞特異的欠損マウス由来の Mreg 細胞も T 細胞増殖抑制機能が障害されていた。さらに、免疫不全(Rag2 欠損)マウスにナイーブ T 細胞を移入することにより発症する T 細胞依存性腸管炎症を、Stat3 欠損 Mreg 細胞は抑制できなかった。以上の結果から、IL-10/Stat3 シグナルが Mreg 細胞の機能を制御していることが明らかになった。また、Mreg 細胞は、T 細胞と会合することにより増殖を抑制するが、そのメカニズムとして、第 1 段階で、高発現する ICAM-1, VCAM-1 の接着分子により樹状細胞より極めて優先的に T 細胞と会合すること、第 2 段階で、IL-10/Stat3 シグナルにより、MHC class II は高発現しているにも関わらず CD80/CD86 の発現が抑制された結果、副刺激分子を介したシグナルが伝達されず T 細胞が活性化されないことにより、T 細胞応答を抑えていることを明らかにした。このように、腸管において T 細胞応答を直接制御することにより腸管ホメオスタシスを維持する新規自然免疫担当細胞を同定した。

腸管粘膜特有の樹状細胞に比べて、腸管に局在するマクロファージの活性については不明な点が多い。そこで、大腸マクロファージの活性制御機構について解析した。リポ多糖に反応して IL-12 を産生する大腸樹状細胞と比較して、大腸マクロファージはリポ多糖による炎症性サイトカイン産生がみられない。両細胞の遺伝子発現を網羅的に比較解析したところ、大腸マクロファージでは、IL-10 関連遺伝子群が強く発現していた。IL-10 欠損マウスや Stat3 変異マウス由来の大腸マク

ロファージは、リポ多糖による炎症性サイトカインの産生が強く誘導された。大腸では、腸内細菌依存性に大腸マクロファージ自身および制御性 T 細胞から IL-10 が産生される。腸内細菌のいない無菌マウス由来の大腸マクロファージでは、IL-10 の産生低下に伴い、炎症性サイトカインの産生が亢進していた。これらの結果から、大腸マクロファージの活性は、腸内細菌依存性に誘導される IL-10 により負に制御されていることが明らかになった。

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 46 件) 全て査読有り

- (1) Kayama, H., Ueda, Y., Sawa, Y., Jeon, S. G., Ma, J. S., Okumura, R., Kubo, A., Ishii, M., Okazaki, T., Murakami, M., Yamamoto, M., Yagita, H. and Takeda, K.: Intestinal CX₃C chemokine receptor 1^{high} (CX₃CR1^{high}) myeloid cells prevent T cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 5010-5015 (2012).
- (2) Yamamoto, M. and Takeda, K. Inhibition of ATF6 β -dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *Virulence* 3, 77-80 (2012).
- (3) Yamamoto, M., Ma, J. S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Okuyama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Farve, D. and Takeda, K.: ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.* 208, 1533-1546 (2011).
- (4) Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K., and Honda, K.: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337-341 (2011).
- (5) Ueda, Y., Kayama, H., Jeon, S.-G., Kusu, T., Isaka, Y., Rakugi, H., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int. Immunol.* 22, 953-962 (2010).
- (6) Kayama, H. and Takeda, K.: The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 12, 511-517 (2010).
- (7) Okuyama, M., Kayama, H., Atarashi, K., Saiga, H., Kimura, T., Waisman, A.,

- Yamamoto, M., and Takeda, K.: A novel inducible dendritic cell ablation model in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 559-563 (2010).
- (8) Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., Soldati-Farve, D., and Takeda, K.: A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* 206, 2747-2760 (2009).
- (9) Takeda, K.: The lipid A receptor. *Lipid A in cancer therapy* 53-58, (2009).
- (10) Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D. R.: Induction of Intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498 (2009).
- (11) Kayama, H., Koga, R., Atarashi, K., Mak, T. W., Takayanagi, H., Honda, K., Yamamoto, M. and Takeda, K.: NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000514 (2009).
- (12) Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Takeno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, T.: C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 1897-902 (2009).
- (13) Morishita, H., Saito, F., Kayama, H., Atarashi, K., Kuwata, H., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Fra-1 negatively regulates lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses. *Int. Immunol.* 21, 457-465 (2009).
- (14) Honda, K., and Takeda, K.: Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol.* 2, 187-196 (2009).
- (15) Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshikai, Y., Honda, K., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181, 8521-8527 (2008).
- (16) Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K.: ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808-812 (2008).
- (17) Yamamoto, M., and Takeda, K.: Role of nuclear I κ B proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265-269 (2008).
- (18) Saito, F., Kuwata, H., Oike, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Honda, K., and Takeda, K.: Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 113-118 (2008).
- (19) Kayama, H., Ramirez-Carrozzi, V. R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., and Takeda, K.: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and I κ B ζ . *J. Biol. Chem.* 283, 12468-12477 (2008).
- (20) Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180, 4032-4039 (2008).
- (21) Takeda, K., Yamamoto, M., Honda, K.: Assessing the response of cells to TLR stimulation. Signaling by Toll-like receptors, 1-21 (2008).
- (22) Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh, T., Saitoh, T., Takeda, K., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).
- [学会発表] (計 45 件)
- (1) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Regulatory Mechanisms of Immune Responses to Intestinal Bacteria. Keystone Symposium. Mar 4-8, 2012. Keystone, USA
- (2) Kiyoshi Takeda, Regulation of gut homeostasis by microbiota and innate immunity. The 4th Symposium of Immunological Self., Jan 27-28, 2012, Kyoto
- (3) Kiyoshi Takeda, Regulation of gut homeostasis by microbiota and innate immunity. Joint Symposium of CRCID, IFRcC & IBB. Dec 19-20, 2011, Seoul, Korea
- (4) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, A unique subset of intestinal myeloid cells suppress T cell-dependent intestinal inflammation. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (シンポジウム) 2011 年 11 月 27-29 日、千葉
- (5) Kiyoshi Takeda, Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. 日本食品免疫学会第 7 回学術大会、2011 年 10 月 18-19 日、東京
- (6) 竹田 潔 自然免疫と炎症性疾患 第 48 回日

- 本眼感染症学会、2011年7月8-10日、京都
- (7) Kiyoshi Takeda, Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The NZ Australian Society for Immunology Branch Meeting 2011, June 30-July1, 2011. Wellington New Zealand
 - (8) Kiyoshi Takeda, Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. ESF-JSPS Frontier Science Conference for Young Researchers, March 1-6, 2011, Hulshort, The Netherlands
 - (9) Kiyoshi Takeda, Innate immune responses at the intestinal mucosa. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society, October 7-9, 2010, Vancouver, Canada
 - (10) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. 14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010, Kobe, Japan
 - (11) Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses at the, intestinal mucosa. Host-Pathogen interactions in generalized bacterial infection. May 31-June 3, 2010, Greifswald, Germany
 - (12) Kiyoshi Takeda, Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. 第83回日本細菌学会総会、2010.3.27-29、横浜
 - (13) 竹田潔 腸管粘膜に特有の自然免疫系細胞の機能 (ランチョンセミナー) 第39回日本免疫学会学術集会、2009.12.2-4、大阪
 - (14) 竹田潔 自然免疫系の活性制御と免疫疾患 (特別講演) 第51回日本小児血液学会 2009.11.27-29、東京
 - (15) Kiyoshi Takeda, Innate immune responses at the intestinal mucosa. The 2009 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists, 2009.11.9-10, Seoul, Korea
 - (16) Kiyoshi Takeda, Innate immune responses at the intestinal mucosa. The first CSI/JSI/KAI Join Symposium on Immunology, 2009.11.7-8, Shanghai, China
 - (17) 竹田潔 トリパノソーマ原虫に対する自然免疫応答機構 第20回日本生体防御学会学術総会 2009.7.25-26、東京
 - (18) Kiyoshi Takeda Commensal bacteria-derived ATP mediates development of intestinal Th17 cells. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2009 2009.7.9-10、横浜
 - (19) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Masahiro Yamamoto NFAT is responsible for TLR-independent innate immune responses to a protozoan parasite. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008.12.9-12、神戸

- (20) Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: A mechanism for development of intestinal Th17 cells causing intestinal inflammation. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research. 2008.12.7-10, Guangzhou, China
- (21) Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda, Commensal bacteria-derived ATP mediates Th17 cell development in the intestinal lamina propria (Symposium) 第37回日本免疫学会学術集会、2008.12.1-3、京都
- (22) 竹田潔 自然免疫系と炎症性腸疾患 第29回日本炎症・再生医学会、2008.7.9、東京
- (23) Kiyoshi Takeda, Regulatory mechanisms of innate immune responses. The Kick-off Symposium on the MEXT Priority Research for Immunological Self, 2008.2.28, Kyoto
- (24) Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10.29, Tsukuba, Japan
- (25) Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear IκB proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007.10.25, Sendai, Japan
- (26) 竹田潔 自然免疫シグナルの制御機構 第28回日本炎症・再生医学会、2007.8.2、東京

[産業財産権]
○出願状況 (計1件)

名称: T細胞活性化を抑制する腸粘膜特有のミエロイド細胞およびその利用
発明者: 香山尚子、竹田潔
権利者: 大阪大学、科学技術振興機構
種類: 特許
番号: 特願 2009-241034
出願年月日: 2009年10月20日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/ongene/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
竹田潔 (TAKEDA KIYOSHI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20309446

- (2) 研究分担者 ()
研究者番号:

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :