

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19885

研究課題名(和文) ヒト腸管におけるPathogenicTh17細胞を誘導する自然免疫担当細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of innate immune cells which induces development of pathogenicTh17 cells in human intestinal lamina propria

研究代表者

松野 裕旨 (Matsuno, Hiroshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30749750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：正常腸管粘膜固有層の自然免疫担当細胞の4つのサブセットの細胞(CD14-CD11clow, CD14-CD11chigh, CD14+CD163low, CD14+CD163high)を採取した。末梢血のMDR1陰性エフェクターT細胞と共培養し、共培養後の細胞をRh123 assayした。クローン病腸管と正常腸管の4つのサブセットの細胞間でpathogenicTh17細胞の誘導能を比較したが、いずれの細胞も同程度の誘導能であった。PathogenicTh17細胞を誘導する自然免疫担当細胞を同定できなかった。

研究成果の概要(英文)：We identified 4 lamina propria cell subsets (CD14-CD11clow, CD14-CD11chigh, CD14+CD163low, CD14+CD163high) in the human colon. Allogenic CD4+ MDR1- effector T cells were co-cultured with these cells, and the frequency of MDR1+ pathogenicTh17 cells were analyzed by Rh123 assay. The frequency of MDR1+ pathogenicTh17 cells in Crohn's disease was similar to that in the normal colon. We could not found the innate immune cell which induced development of pathogenicTh17 cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヒト腸管粘膜固有層 MDR1陽性Pathogenic Th17細胞 自然免疫担当細胞 炎症性腸疾患

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 腸管における免疫と炎症性腸疾患

免疫には自然免疫と獲得免疫の2種類がある。自然免疫が標的に特有の構造を認識し、さまざまなサイトカインを放出して適切な獲得免疫を誘導すると考えられている。自然免疫担当細胞である樹状細胞やマクロファージがナイーブ T 細胞に作用し、獲得免疫担当細胞である Th1 細胞や Th2 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞へ分化誘導する。Th17 細胞は IL-17 ファミリーのサイトカインを産生し、炎症性サイトカインを誘導するとともに細胞内外の細菌や真菌感染に対して防御的に働く。炎症性腸疾患はなんらかの原因により腸管粘膜における免疫の破綻をきたしている自己免疫性疾患であり、炎症性サイトカインの異常産生がみられる。Th17 細胞は炎症性腸疾患の発症や増悪に関わるヘルパー T 細胞として注目されている。

### (2) マウスにおける Th17 細胞の解析

最近のマウスでの研究で IL-17 を産生するヘルパー T 細胞がすべて炎症を惹起する Th17 細胞でないことが報告された (Lee, Nat.Immunol, 2012)。TGF- $\beta$ 1+IL-6 と TGF- $\beta$ 3+IL-6 を使用し、マウスのナイーブ T 細胞の分化誘導実験をすると、どちらも IL-17 を産生する Th17 細胞を誘導する。しかし、TGF- $\beta$ 3+IL-6 で誘導された Th17 細胞のみが、ヒトの多発性硬化症モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスにおいて、有意差をもって麻痺症状が増悪することを示した。そこで、炎症を惹起しない細胞を Non-pathogenicTh17 細胞と定義された。

### (3) ヒトにおける PathogenicTh17 細胞の解析

最近、ヒトにおいても Th17 細胞を PathogenicTh17 細胞と Non-pathogenicTh17 細胞に分類できると報告された (Ramesh, JEM, 2014)。ヒト血液を使用し FACS で解析をすすめ、Th17 細胞を IL-17 のみを産生する細胞 (Th17 細胞) と IL-17 と IFN- $\gamma$  の両方を産生する細胞 (Th17.1 細胞) に分類した。Th17 細胞と Th17.1 細胞をマイクロアレイ解析し、先ほどのマウスの論文 (Lee, Nat.Immunol, 2012) と比較することで Th17.1 細胞が PathogenicTh17 細胞に相当すると報告した。また、マイクロアレイ解析の結果から PathogenicTh17 細胞が Multiple drug resistance 1 (以下 MDR1) を特異的に発現していることを示した。MDR1 は細胞膜上に存在して細胞毒性を有する化合物などの細胞外排出を行う膜輸送蛋白である。Rameshらは、クローン病のヒト腸管においてさらに研究をすすめた。クローン病の腸管の炎症部と非炎症部から採取した T 細胞を FACS

で解析し、非炎症部に比較して炎症部の腸管では MDR1 陽性の PathogenicTh17 細胞の割合が増加していることを示した。しかし、ヒト PathogenicTh17 細胞に関する解析は発展途上であり、PathogenicTh17 細胞を誘導する自然免疫担当細胞に関しては解析されていない。

### (4) 当教室におけるこれまでの研究

当教室ではヒト腸管を使用し、腸管粘膜固有層に存在する自然免疫担当細胞の解析をしている。ヒト腸管粘膜固有層の自然免疫担当細胞は FACS により、HLA-DR<sup>+</sup> (CD3/CD19/CD20/CD56)<sup>-</sup> 細胞は CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>low</sup>、CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>high</sup>、CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup>、CD14<sup>+</sup>CD163<sup>high</sup> で特徴づけられる4つのサブセットに分類できることがわかった。その中で CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup> 細胞が Th17 細胞の分化誘導を行い、クローン病腸管の CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup> 細胞では炎症性サイトカインの産生が増加し過剰炎症を誘導することを明らかにした (Ogino, Gastroenterology, 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究では、最近報告された PathogenicTh17 細胞を誘導する自然免疫担当細胞を同定し、その誘導メカニズムを明らかにすることを目的とする。誘導メカニズムを明らかにし、PathogenicTh17 細胞の誘導を抑制できれば、炎症性腸疾患の治療につながれると考えている。

## 3. 研究の方法

(1) PathogenicTh17 細胞に特異的に発現している MDR1 に着目して研究を進める。MDR1 陽性細胞割合を同定するために Rh123 assay を用いる。Rh123 とは MDR1 特異的に排出される蛍光色素である。

### Rh123 assay の条件検討

(対象) 健康人の末梢血液 10ml を使用する。  
(方法) 末梢血 10ml から Ficoll を用いて末梢血単核球細胞を採取する。4 度で 30 分間、採取した単核球細胞に Rh123 を取り込ませる。MDR1 は 4 度で不活化し、37 度で活性化する。37 度の CO2 incubator に数時間、Rh123 を取り込ませた単核球細胞を静置する。MDR1 を発現している細胞は 37 度で活性化するため、細胞内に取り込んでいた Rh123 を細胞外へ排出する。Rh123 を排出した細胞割合=MDR1 陽性細胞割合となる。MDR1 の inhibitor を用いた検体も同時に実験することによりカットラインを決定する。FACS を用いて、リンパ球をゲートし、CD4 陽性細胞中の MDR1 陽性細胞割合を測定する。37 度の CO2 incubator に静置する時間を検討する必要があるため、静置する時間を 1 時間、2 時間、3 時間にわけて検討し、決定する。

正常腸管での PathogenicTh17 細胞を誘導する自然免疫担当細胞の同定

(対象) 当教室において大腸癌に対して切除術を施行する症例のうち、20 歳以上でインフォームドコンセントにより同意を得られた症例を対象とする。

(方法) 切除腸管の病理診断に不要な非癌部腸管を約 5 平方センチメートル採取する。腸管の粘膜・粘膜固有層を筋層・漿膜から剥離し、粘膜・粘膜固有層を細かく切り刻み、コラゲナーゼ等で酵素処理する。採取した細胞から Percoll を用いて粘膜固有層細胞を単離し、HLA-DR、CD3、CD19、CD20、CD56、CD14、CD11c、CD163 の抗体を用いて FACS を施行する。CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>low</sup>、CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>、CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup>、CD14<sup>+</sup>CD163<sup>high</sup> の 4 つのサブセットの細胞をソーティングする。末梢血 10ml から Ficoll を用いて末梢血単核球細胞を採取し、MACS を用いてナイーブ T 細胞を採取する。ソーティングした 4 つのサブセットの細胞とナイーブ T 細胞を 37 度の incubator で 3 日間共培養する。全細胞を Rh123 assay することにより MDR1 陽性 PathogenicTh17 細胞割合を測定する。4 つの自然免疫担当細胞のどのサブセットが MDR1 陽性 PathogenicTh17 細胞を誘導するのかを同定する。

炎症性腸疾患の腸管での PathogenicTh17 細胞を誘導する自然免疫担当細胞の同定  
(対象) 当教室において炎症性腸疾患に対して切除術を施行する症例のうち、20 歳以上でインフォームドコンセントにより同意を得られた症例を対象とする。

(方法) 切除腸管の病理診断に不要な炎症部と非炎症部の腸管を約 5 平方センチメートル採取する。以下の方法は の正常腸管での同定方法と同様である。 の正常腸管と の炎症性腸疾患から採取した自然免疫担当細胞から誘導される PathogenicTh17 細胞の割合を比較検討する。

(2)

同定した自然免疫担当細胞の機能解析  
(対象) 当教室において大腸癌及び炎症性腸疾患に対して切除術を施行する症例のうち、20 歳以上でインフォームドコンセントにより同意を得られた症例を対象とする。

(方法) FACS によりソーティングした自然免疫担当細胞から cDNA を作成し、qPCR を用いて各サイトカインや TLR の発現を解析する。ソーティングした細胞の mRNA のマイクロアレイ解析を行う。PathogenicTh17 細胞を誘導する自然免疫担当細胞のヘルパー T 細胞の誘導に関わる遺伝子群を解析することにより、PathogenicTh17 細胞誘導に必要なサイトカインや補助刺激分子の同定を行う。

PathogenicTh17 細胞の誘導の制御機構

の解析

(対象) 当教室において大腸癌及び炎症性腸疾患に対して切除術を施行する症例のうち、20 歳以上 でインフォームドコンセントにより同意を得られた症例を対象とする。

(方法) の方法で同定されたサイトカインや補助刺激分子を抗体でブロックすることにより、PathogenicTh17 細胞の誘導能を解析する。また、マウスにて PathogenicTh17 細胞を誘導するとされている TGF- $\beta$  3 についても検討する。PathogenicTh17 細胞を誘導する自然免疫担当細胞の TGF- $\beta$  1 と TGF- $\beta$  3 の発現を解析する。次に抗 TGF- $\beta$  1 抗体と抗 TGF- $\beta$  3 抗体を使用し、TGF- $\beta$  1 と TGF- $\beta$  3 をブロックし PathogenicTh17 細胞の誘導効率を解析する。

4. 研究成果

(1) MDR1 を発現している細胞を同定する方法として Rh123 assay を用いた。はじめに Rh123 assay の条件検討を施行した。健常人の末梢血 10ml から Ficoll を用いて末梢血単核球細胞を採取し、Rh123 を細胞内へ取り込ませた後に 37 度 CO<sub>2</sub> incubator に静置する時間を検討した。1 時間、2 時間、3 時間で検討し、静置時間は 2 時間に決定した。

(2) 次に正常腸管での PathogenicTh17 細胞を誘導する自然免疫担当細胞の同定の実験に移った。腸管粘膜固有層の自然免疫担当細胞の 4 つのサブセットの細胞 (CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>low</sup>, CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>, CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup>, CD14<sup>+</sup>CD163<sup>high</sup>) を採取した。末梢血から単核球細胞を採取した後、Rh123 assay を施行し、MDR1 陰性エフェクター T 細胞を採取した。4 つのサブセットの細胞とエフェクター T 細胞を 3 日間共培養し、共培養後の細胞を Rh123 assay することにより MDR1 陽性 PathogenicTh17 細胞の割合を測定した。コントロールとして末梢血中の CD14<sup>+</sup>単球を用いた。MDR1 陽性細胞の割合は、コントロールの細胞に比べると 4 つのサブセットの細胞のいずれも有意差をもって高く MDR1 陽性細胞の誘導能を認めたが、4 つのサブセットの細胞間では有意差を認めず、いずれの細胞も同程度の誘導能であった。

(3) 正常腸管に存在する 4 つのサブセットの自然免疫細胞間では PathogenicTh17 細胞を特異的に誘導する細胞は認めなかった。次に、クローン病患者の非炎症部・炎症部腸管を用いて、正常腸管と同様の手順で実験を施行した。クローン病腸管と正常腸管の 4 つのサブセットの細胞間で PathogenicTh17 細胞の誘導能を比較したが、いずれの細胞も同程度の誘導能であった。当初の研究実施計画では、同定した自然免疫担当細胞の機能解析を進めていく予定にしていたが、研究計画の変更が必要になった。そのため、MDR1 陽性 T 細胞の機能解析を施行する方針とした。

(4) はじめに腸管から T 細胞を採取する方法の検討をおこなった。自然免疫担当細胞を採取する方法では、CD4 陽性 T 細胞を採取できないため、酵素処理の方法の変更等を検討した。最終的には酵素を用いない方法で腸管から CD4 陽性 T 細胞を採取可能となった。正常腸管から MDR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞と MDR1 陰性 CD4 陽性 T 細胞を採取し、mRNA を抽出し cDNA を作成した。qRT-PCR によりこれらの細胞の炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインなどの mRNA 発現を解析したが、2 群間でサイトカイン発現に差は認めなかった。今後は、クローン病患者の非炎症部・炎症部腸管を用いて、MDR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の機能解析を正常腸管と比較し検討していく。

(3) 連携研究者  
( )  
研究者番号：  
(4) 研究協力者  
( )

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

松野 裕旨 (Matsuno Hiroshi)  
大阪大学・医学系研究科・医員  
研究者番号：30749750

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：