

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 3 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05169

研究課題名(和文)炎症性腸疾患に対する分子標的療法の基盤開発

研究課題名(英文)Development of the molecular target therapy for the inflammatory bowel disease

研究代表者

渋谷 和子 (Shibuya, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患は、腸粘膜の慢性炎症を主徴とする原因不明の難治性疾患である。免疫応答を抑制し、腸管のホメオスタシスを保つ制御性T細胞(Treg)は、炎症性腸疾患の病態制御に重要な役割を担っている。本研究では、Tregに発現する免疫受容体DNAM-1が炎症環境下においてTregのマスターレギュレーターであるFoxp3の発現の不安定性を誘導し、Tregの免疫抑制能を制限していることを明らかにした。このことは、Tregの機能不全を伴う炎症性腸疾患の制御にDNAM-1が良い治療標的となりうることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は、腸粘膜の慢性炎症を主徴とする原因不明の難治性疾患である。わが国の患者数は年々増加しており、H25年には20万人を超えた。しかし、根治的治療法が未だ確立されていないことより、早急な治療法の開発が望まれている。制御性T細胞(Treg)は、炎症性腸疾患の病態制御に重要な役割を担っている。本研究において、DNAM-1欠損はAKT-mTORC1経路が抑制し、安定したFoxp3発現を促して、Tregの抑制機能を亢進することが明らかになった。このことは、Tregの機能不全を伴う炎症性疾患の制御にDNAM-1が良い治療標的となりうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The inflammatory bowel disease is an intractable disease with chronic inflammation of the intestinal mucosa. Treg cells play an important role to suppress immune response-induced inflammation. In this study, we show that DNAM-1, an immunoreceptor expressed on Tregs, induces instability in the expression of Foxp3, a master regulator of Tregs, in the inflammatory environment and limits the immunosuppressive capacity of Tregs. Thus, DNAM-1 may be a good therapeutic target for the control of inflammatory bowel disease associated with Treg dysfunction.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 免疫受容体 制御性T細胞 炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は、腸粘膜の慢性炎症を主徴とする原因不明の難治性疾患である。わが国の患者数は年々増加しており H25 年には 20 万人を超えた (難病情報センター発表)。炎症性腸疾患の病態においては Th17 細胞や Th1 細胞などのヘルパー T 細胞がエフェクター細胞として働き炎症を惹起していることが知られている。しかし、これら T 細胞を抑制する根治的治療法が未だ確立されていないことより、早急な治療法の開発が望まれている。

制御性 T 細胞(Treg 細胞)は、過剰な免疫応答を抑制して、生体内恒常性の維持に寄与している。Treg 細胞欠損マウスでは、ヘルパー T 細胞の過剰応答により炎症性腸疾患の病態悪化が報告されており、Treg 細胞は炎症性腸疾患の病態を制御していると考えられる。

2. 研究の目的

免疫受容体 DNAM-1 は、T 細胞、NK 細胞をはじめとする多くの免疫細胞に発現している膜型分子である。私たちは急性移植片対宿主病(aGVHD)モデルマウスにおいてドナーの Treg 細胞上の DNAM-1 を欠損させると生体内アロ免疫応答が減弱して aGVHD 病態が改善することを観察した。このことより炎症病態下において DNAM-1 が Treg 細胞の免疫抑制能を減弱させている可能性が示唆されたが、その分子メカニズムは不明のままであった。

本研究では、Treg 細胞上の DNAM-1 の機能とその分子メカニズムを明らかにし、将来的に DNAM-1 が炎症性腸疾患の治療の標的分子になりうるかを検討することとした。

3. 研究の方法

DNAM-1 欠損 Treg 細胞の抑制機能、病態制御機能を *in vitro* と *in vivo* の両側面から解析した。また、Treg 細胞の機能に関与する遺伝子の発現量や、マスターレギュレーターである Foxp3 の発現変化、CNS2 領域のメチル化解析などを行い、DNAM-1 欠損が Treg 細胞の機能に影響を与える分子メカニズムを解明し、炎症性腸疾患など炎症を主体とする病態において、DNAM-1 が治療標的になりうるかどうかを検討した。

4. 研究成果

炎症環境下にある Treg 上の DNAM-1 の機能を検証するため、まず移植片対宿主病 (Graft-vs-Host Disease, GVHD) マウスモデルを用いた。放射線照射した Balb/c マウスに、野生型 C57BL/6 より単離した骨髓細胞と Tconv 細胞を移植することで GVHD を誘導し、野生型、もしくは DNAM-1 欠損 Treg 細胞を移植し生存率を比較した。その結果、野生型 Treg 細胞と比較して、DNAM-1 欠損 Treg 細胞はレシピエントマウスの生存期間を延長させることを観察した (図 1)。また、病理組織像においても、DNAM-1 欠損 Treg 細胞は腸管の炎症を軽減させていた (図 2)。以上の結果より、DNAM-1 欠損は Treg 細胞の免疫抑制機能を促進させることが示された。Treg 細胞の機能に関与する遺伝子の発現量を解析した結果、移入した DNAM-1 欠損 Treg では、Fgl2 や Ctl4、Pcd などの発現が野生型 Treg に比較して上昇していた。また、マスターレギュレーターである Foxp3 の発

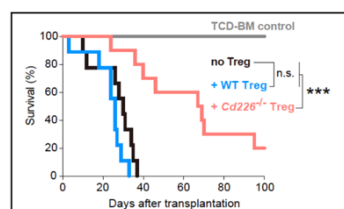


図1 炎症病態における生体内Tregの機能に DNAM-1が及ぼす影響(生存率)
野生型Treg細胞(WT Treg)とDNAM-1遺伝子欠損 Treg細胞(Cd226^{-/-} Treg)をGVHD誘導マウスにそれぞれ移植した。DNAM-1欠損Treg細胞はマウスの生存期間を有意に延長させた。

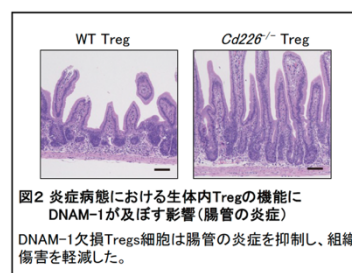


図2 炎症病態における生体内Tregの機能に DNAM-1が及ぼす影響(腸管の炎症)
DNAM-1欠損Treg細胞は腸管の炎症を抑制し、組織傷害を軽減した。

現も、DNAM-1 欠損 Treg では上昇しており (図 3)、CNS2 領域のメチル化が低下していることが明らかになった (図 4)。さらに、シングルセル RNA シーケンス解析を行なった結果、DNAM-1 が mTORC1 経路を活性化させることが示唆された。そこで、mTORC1 経路に重要な Akt や S6 のリン酸化を観察した結果、DNAM-1 欠損 Treg では、これらの分子のリン酸化が有意に低下していた (図 5)。以上の結果より、炎症環境下において、DNAM-1 の存在は Treg の AKT-mTORC1 経路を活性化させ、最終的に Foxp3 発現の不安定性を助長していることが明らかになった。

次に、Treg 細胞を用いて DNAM-1 シグナルの検証を行ったが、予想に反して DNAM-1 シグナルは AKT-mTORC1 経路と Foxp3 発現に影響を及ぼさなかった。DNAM-1 が直接的に Treg 細胞の機能を制御しなかったことから、DNAM-1 と共通のリガンドを認識する TIGIT の関与を検証したところ、DNAM-1 を欠損した場合には、リガンド結合競合により、通常よりも強い TIGIT シグナルが伝達され、AKT-mTORC1 経路が抑制された結果、安定した Foxp3 発現により Treg 細胞の抑制機能が亢進することが明らかになった。

Treg は炎症抑制に寄与するため、炎症性疾患の病態制御において重要な役割を担っている。本研究成果は、Treg 細胞の機能不全を伴う炎症性疾患の制御に DNAM-1 が良い標的となりうることを示唆している。

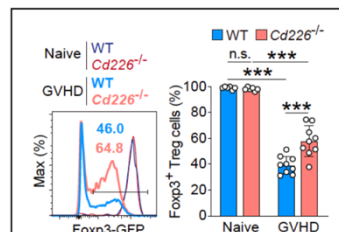


図3 炎症環境下のTregのFopx3発現にDNAM-1が及ぼす影響
DNAM-1欠損は炎症病態下のTregのFopx3の発現を上昇させた。

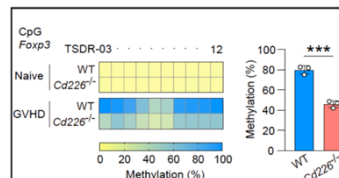


図4 炎症環境下のTregのFopx3のCNS2領域のメチル化にDNAM-1が及ぼす影響
DNAM-1欠損は炎症病態下のTregのFopx3のCNS2領域のメチル化を低下させた。

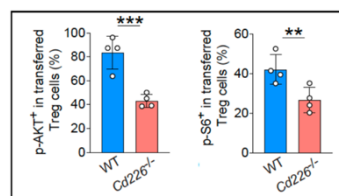


図5 炎症環境下のTregのAKTとS6のリン酸化にDNAM-1が及ぼす影響
DNAM-1欠損は炎症病態下のTregのS6とAKTのリン酸化を低下させた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Sato K., Yamashita-Kanemaru Y., Abe F., Murata R., Nakamura-Shinya Y., Kanemaru K., Muratani M., Veillette A., Goto M., Ito M., Shibuya A., Shibuya K. DNAM-1 regulates Fopx3 expression in regulatory T cells by interfering with TIGIT under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 118 (21) e2021309118, 2021 (DOI: 10.1073/pnas.2021309118)
2. Shibuya A., Shibuya K. DNAM-1 versus TIGIT: competitive roles in tumor immunity and inflammatory responses *Int. Immunol.* 33(12):687-692, 2021 (Doi: 10.1093/intimm/dxab085.)
3. Nakamura Y., Matsuzaka T., Tahara-Hanaoka S., Shibuya K., Shimano H., Nakahashi-Oda C., Shibuya A. Elov16 regulates mechanical damage-induced keratinocyte death and skin inflammation. *Cell Death and Diseases*, 9:1181, 2018 (DOI: 10.1038/s41419-018-1226-1)
4. Shibuya A., Shibuya K. Exploring the Gut Fungi-Lung Allergy Axis. *Cell Host Microbe*, 24:755-757, 2018 (DOI: 10.1016/j.chom.2018.11.012)
5. Takenaka E., Vo A., Yamashita-Kanemaru Y., Shibuya A., Shibuya K. Selective DNAM-1 expression on small peritoneal macrophages contributes to CD4+ T cell costimulation. *Sci. Rep.* 8:15180, 2018 (DOI: 10.1038/s41598-018-33437-4)
6. Sato K., Honda SI., Shibuya A., Shibuya K. Cutting Edge: Identification of Marginal Reticular Cells as Phagocytes of Apoptotic B Cells in Germinal Centers. *J Immunol*, 200:3691-3696, 2018 (DOI: 10.4049/jimmunol.1701293)
7. Nakamura Y., Naito K., Yamashita-Kanemaru Y., Komori D., Hirochika R., Shibuya A., Shibuya K. TX99 Is a Neutralizing Monoclonal Antibody Against Mouse TIGIT. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 37:105-109, 2018 (DOI: 10.1089/mab.2018.0001)
8. Shibuya A., Honda SI., Shibuya K. A pro-inflammatory role of Fca/μR on marginal zone B cells in sepsis. *Int Immunol*, 29:519-524, 2017 (DOI: 10.1093/intimm/dxx059)
9. Okumura G., Abe F., Hirochika R., Shibuya A., Shibuya K. Development and characterization of novel monoclonal antibodies against human DNAM-1. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 36:135-139, 2017 (DOI:

10.1089/mab.2016.0049)

10. Sato K., Honda SI., Shibuya A., Shibuya K. Improved protocol for the isolation of naïve follicular dendritic cells. *Mol Immunol*, 78:140-145, 2016 (DOI: 10.1016/j.molimm.2016.09.011)
11. Haraguchi N., Kikuchi N., Morishima Y., Matsuyama M., Sakurai H., Shibuya A., Shibuya K., Taniguchi M., Ishii Y. Activation of murine invariant NKT cells promotes susceptibility to candidiasis by IL-10-induced modulation of phagocyte antifungal activity. *Eur J Immunol*, 46:1691-703, 2016 (DOI: 10.1002/eji.201545987)
12. Kanaya M., Shibuya K., Hirochika R., Kanemoto M., Ohashi K., Okada M., Wagatsuma Y., Cho Y., Kojima H., Teshima T., Imamura M., Sakamaki H., Shibuya A. Soluble DNAM-1, as a predictive biomarker for acute graft-versus-host disease. *PLOS ONE*, 11: e0154173, 2016 (DOI: 10.1371/journal.pone)
13. Honda S., Sato K., Totsuka N., Fujiyama S., Fujimoto M., Miyake K., Nakahashi-Oda C., Tahara-Hanaoka S., Shibuya K., Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fc α μ R-coupled TLR4 signalling. *Nat Commun*, 7:11498, 2016 (DOI: 10.1038/ncomms11498)
14. Iguchi-Manaka A., Okumura G., Kojima H., Cho Y., Hirochika R., Bando H., Sato T., Yoshikawa H., Hara H., Shibuya A., Shibuya K. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients. *PLOS ONE*, 11: e0152982, 2016 (DOI: 10.1371/journal.pone.0152982)
15. Nakahashi-Oda C., Udayanga K., Nakamura Y., Nakazawa Y., Totsuka N., Miki H., Iino S., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion. *Nat Immunol*, 17: 441-450, 2016 (DOI: 10.1038/ni.3345)
16. Vo.A.V., Takenaka E., Shibuya A., Shibuya K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. *Mol Immunol*, 69:70-76, 2016 (DOI: 10.1016/j.molimm.2015.11.009)

〔学会発表〕（計 38 件）

1. Vo AV, Selective expression and function of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages. 第 7 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2019
2. 佐藤 和貴、DNAM-1 と TIGIT による制御性 T 細胞の調節機構 第 7 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2019
3. 大岡 杏子、乾癬における免疫受容体 CD96 の作用機序の解析 第 7 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2019
4. 村田 力斗、DNAM-1 遺伝子上の一塩基多型による自己免疫疾患への影響 第 7 回筑波大学・2019
5. Vo AV, Involvement of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages in CD4⁺ T cell priming. Keystone Symposia in Santa Fe, 2019
6. Sato K, DNAM-1 regulates the Foxp3 stability of regulatory T cells under inflammatory conditions. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会 2018
7. Vo AV, Involvement of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages in CD4⁺ T cell priming. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会 2018
8. 奥村 元紀、腫瘍免疫応答における可溶性 CD155 の役割 第 10 回血液疾患免疫療法学会学術集会 2018
9. 佐藤 和貴、活性化受容体 DNAM-1 は炎症時の制御性 T 細胞の機能を抑制する 第 10 回血液疾患免疫療法学会学術集会 2018
10. Murata R, Development of molecular target therapy for human acute GVHD in humanized mice. Tsukuba Global Science Week (TGSW) 2018
11. 田原 聡子、Allergin-1 immunoreceptor suppresses house dust mite-induced allergic Th2 responses 第 83 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2018
12. 佐藤 和貴、活性化受容体 DNAM-1 は炎症時の制御性 T 細胞の機能を抑制する 第 33 回自己免疫研究会 2018
13. 佐藤 和貴、活性化受容体 DNAM-1 は炎症時の制御性 T 細胞の機能を抑制する 第 6 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2018
14. 中村 優歩、DSS 誘導性腸炎モデルにおける活性化受容体 DNAM-1 の役割 第 6 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2018
15. 村田 力斗、DNAM-1 遺伝子上の一塩基多型による自己免疫疾患への影響 第 6 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2018
16. Okumura G, The role of soluble CD155 in tumor immune response and metastasis. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会 2017
17. Sato K, Marginal reticular cells act as a non-professional phagocyte for clearance of apoptotic B cells. 第 46 回

日本免疫学会総会・学術集会 2017

18. Negishi N, CD155-mediated signaling through TIGIT is involved in serial transfer of tolerant state into naïve T cells. 第46回日本免疫学会総会・学術集会 2017
19. Shibuya K. Escape from tumor immunity by soluble CD155. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, 2017
20. 渋谷 和子 免疫受容体によるヘルパーT細胞の機能分化と活性化制御 第4回ベーシックリサーチカンファレンス 2017
21. 五島 祐樹、急性GVHDにおける soluble DNAM-1 dynamics の解析 第9回血液・疾患免疫療法学会学術集会 2017
22. 金丸(山下)由美、DNAM-1はヒト急性GVHD治療の分子標的となりうる 第9回血液・疾患免疫療法学会学術集会 2017
23. 井口 研子、癌患者血清における可溶性 CD155 の発現解析 第9回血液・疾患免疫療法学会学術集会 2017
24. 奥村 元紀、腫瘍免疫応答とがん転移における可溶性 CD155 の役割 第9回血液・疾患免疫療法学会学術集会 2017
25. 中村 優歩、新規抗 TIGIT 抗体の樹立と特性評価 第9回血液・疾患免疫療法学会学術集会 2017
26. Nakamura Y, Development and characterization of novel monoclonal antibody for TIGIT. Tsukuba Global Science Week (TGSW) 2017
27. 渋谷 和子、アレルギー疾患におけるヘルパーT細胞の役割 第44回日本毒性学会学術集会 2017
28. 井口 研子、乳癌における可溶性 CD155 の発現解析 日本乳癌学会学術総会 2017
29. 渋谷 和子、免疫系受容体 DNAM-1 を分子標的とした病態制御 Co-stimulator's Assembly 2017
30. 中村 優歩、自然免疫細胞上 DNAM-1 は DSS 腸炎を悪化させる 第5回筑波大学-東京理科大学合同リトリート 2017
31. 奥村 元紀、腫瘍免疫応答とがん転移における可溶性 CD155 の役割 第5回筑波大学-東京理科大学合同リトリート 2017
32. Vo AV., Involvement of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages in antigen presentation. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 2016
33. Okumura G., Development of molecular targeted therapy for human acute GVHD in humanized mice. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 2016
34. 渋谷 和子、ヒト化マウスを用いた抗ヒト DNAM-1 抗体によるヒト急性GVHDの治療法開発 第8回血液疾患免疫療法学会学術集会 2016.
35. 會田 雄一、筑波大学における臨地実習前 OSCE の開発に向けた取組 第11回日本臨床検査学教育学会学術大会 2016
36. Nakahashi-Oda C., Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cells at barrier surfaces. International Congress of Immunology 2016
37. Yamashita-Kanemaru Y., CD155 (PVR/Nect5) mediates a costimulatory signal in CD4+ T cells and regulates allergic inflammation. International Congress of Immunology 2016
38. 岸 美紀子、A Questionnaire Survey of Education in the Basic Medicine 第48回日本医学教育学会大会 2016

〔図書〕(計1件)

1. 金丸 由美、渋谷 和子、「細胞内染色法を用いたサイトカイン産生の解析」実験医学別冊 新版フローサイトメトリー “もっと幅広く使いこなせる！” 羊土社、93-102, 2016

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体及びその使用、
発明者：渋谷彰、渋谷和子、阿部史枝、広近玲、奥村元紀、
権利者：国立大学法人筑波大学、
種類：特許、

番号：特願 2016-84170

出願年：2016 年、

国内外の別： 国外

○取得状況（計 2 件）

名称:同種間での移植心臓、移植血管、または移植腎臓の生着を維持するために用いられる薬剤、

発明者：渋谷彰、渋谷和子、阿部史枝、

権利者：国立大学法人筑波大学、

種類：特許、

番号：特許第 6048949 号、

取得年：2016 年、

国内外の別： 国内

名称：可溶性 CD155 タンパク質を用いた癌の検出方法、

発明者：渋谷彰、渋谷和子、井口研子、

権利者：国立大学法人筑波大学、

種類：特許、

番号：特許第 5995117 号、

取得年：2016 年、

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 和貴

ローマ字氏名：Kazuki Sato

研究協力者氏名：金丸 由美

ローマ字氏名：Yumi Yamashita-Kanemaru

研究協力者氏名：阿部 史枝

ローマ字氏名：Fumie Abe

研究協力者氏名：中村 優歩

ローマ字氏名：Yuho Nakamura

研究協力者氏名：村田 力斗

ローマ字氏名：Rikito Murata

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。