

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09393

研究課題名（和文）腸管マクロファージの腸内細菌非依存的IL-10産生機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of gut microbiota-independent IL-10 production mechanism of intestinal macrophages

研究代表者

竹内 修（Takeuchi, Osamu）

北里大学・北里研究所病院・部長補佐(研究)

研究者番号：00249997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌非依存的かつMyD88依存的な経路を見いだすため、近年炎症反応の誘導に関与する経路として注目されているNLRP3インフラサーム経路に着目し、腸管マクロファージが腸内細菌などの外的要因と接しながらも寛容を保つメカニズム、すなわち腸管マクロファージが産生するIL-10発現機構を検討した。マウスマクロファージ細胞株を用いた実験では、IL-1 /IL-1Rを介したIL-10の産生が観察され、IL-1RがMyD88経路を介して、IL-10の発現を促進する役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果より、炎症性腸疾患の発症に深く関与する腸管マクロファージの特異的かつ恒常的なIL-10の発現機序の一端が明らかになった。腸管型の抗炎症性マクロファージの特性の一つを見いだせたことにより、*in vitro*あるいは*ex vivo*での腸管マクロファージを誘導することが出来るようになる可能性がある。さらに腸管マクロファージの機能異常が病態の中心となっている炎症性腸疾患の治療に応用できるかもしれない。このようなマクロファージの機能異常をレスキューさせて正常化することができれば、画期的な治療戦略に結びつくことも期待できる。

研究成果の概要（英文）：IL-10 production in gut macrophages is microbiota-independent and MyD88-dependent. We focused on the NLRP3 inflammasome pathway, which has been attracting attention in recent years as a pathway involved in the induction of inflammatory response. We examined the mechanism by which intestinal macrophages maintain tolerance while contacting external factors such as gut microbiota, that is, the IL-10 expression mechanism produced by intestinal macrophages. In an experiment using a mouse macrophage cell line, IL-10 production via IL-1 /IL-1R was observed. IL-1 may play a role in promoting IL-10 expression by stimulating IL-1R via the MyD88 pathway.

研究分野：腸管免疫

キーワード：腸管マクロファージ IL-10 NLRP3 IL-1R

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)とは、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、主として下部消化管に炎症をきたす、難治性かつ原因不明の疾患である。長年の研究により、免疫系の異常、特に本来は腸内細菌などの抗原に対し共存的、寛容的であるはずの腸管マクロファージが、何らかの理由で過剰に応答するようになってしまっていることが病態の中心とみなされるようになってきた。

腸内環境の恒常性維持に重要な役割を果たす腸管マクロファージ(M $\phi$ )は、IL-10 を産生するユニークな M $\phi$  であることが知られている。この IL-10 高産生型腸管 M $\phi$  は、腸管内に多数存在する外来抗原に対して、過剰な免疫応答を誘導せずに抑制的に働くことに一役買っていると考えられている。抑制性サイトカインである IL-10 を恒常的に発現することで Th1/Th17 などの T 細胞を抑制し、腸管腔内の常在細菌や食餌抗原に対する恒常性を維持している。IBD の発症には、この免疫寛容のシステムが破綻することで病態が引き起こされる。

M $\phi$  は M1、M2 型に分類されることが知られている。腸管 M $\phi$  は IL-10 高産生であり、M2 型 M $\phi$  と呼ばれている。M2 型 M $\phi$  は IL-4、IL-13 の働きにより誘導され、宿主の炎症反応の終息や修復につながる。我々は、これまで、腸管 M $\phi$  からの IL-10 産生能獲得には SPF(Specific Pathogen Free)環境下と同様に GF(Germ Free)マウスでも維持されており、腸内細菌非依存的であること、TLR(Toll-like receptor)のアダプタータンパクである MyD88-ノックアウト(KO)マウスでは IL-10 産生能が消失していることを明らかにしてきた。

近年、炎症反応の際に形成されるインフラマソームというタンパク質複合体が注目されており、中でも細胞内レセプター分子 NLRP3 は Nod Like Receptor ファミリーに属しインフラマソームにおいて中心的な役割を果たしている。NLRP3 はアダプタータンパクである ASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain)や Pro-caspase 1 と会合しインフラマソームを形成する。その NLRP3-KO マウスから CD11b<sup>+</sup>M $\phi$  を単離し、*Il10* 遺伝子発現を観察すると、野生型(WT)マウスと比較し *Il10* の発現が減少傾向にあり、*Nlrp3* の *Il10* 発現への関与が推察された(未発表データ)。また、MyD88-KO マウスの *Nlrp3* の発現も減少していたことから MyD88 も *Nlrp3* 発現に関与していることが示唆された。さらに MyD88 は、IL-1R に会合したアダプタータンパクであることから、腸管 M $\phi$  の *Il1R* の遺伝子発現を観察すると、各臓器 M $\phi$  と比較し、高率に発現していた。これらの結果より、腸管 M $\phi$  における *Nlrp3* や *Il10* の発現に、MyD88 依存的な IL-1R を介した経路が関与している可能性が推察される。本研究では、炎症反応の誘導に関与する経路として近年注目されている NLRP3 インフラマソームと炎症性腸疾患(IBD)の発症機序について着目し、腸管の恒常性に重要な役割を果たす腸管マクロファージの IL-10 産生機序について解析を行った。

## 2. 研究の目的

腸内細菌非依存的かつ MyD88 依存的な経路を見いだすため、炎症反応の誘導に関与する経路として近年注目されている NLRP3 インフラマソーム経路に着目し、腸管マクロファージが腸内細菌などの外的要因と接しながらも寛容を保つメカニズム、すなわち腸管マクロファージが産生する IL-10 発現機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸内細菌非依存的、MyD88 依存的経路で誘導される IL-10 産生機構の解明

腸管マクロファージにおける *Il10* の発現検討

SPF 或いは GF の野生型 (WT) マウス、および *Myd88* 欠損(*Myd88*<sup>-/-</sup>)、マウスの大腸よ

り CD11b<sup>+</sup>腸管 M $\phi$  を単離し、*Il10* の発現を qPCR により比較した。

各臓器由来マクロファージにおける *Il1r1* の発現検討

WT マウスの大腸、脾臓、腹腔より M $\phi$  を採取し、*Il1r1* の発現を qPCR により比較した。

IL-1 $\beta$  刺激による腸管 M $\phi$  からの *Il10* 誘導について

WT、及び *Myd88*<sup>-/-</sup> マウスの腸管 M $\phi$  を IL-1 $\beta$ (10ng/mL)により刺激し、経時的な *Il10* の発現を qPCR により評価した。

IL-1R 過剰発現株の作成と IL-1 $\beta$  刺激による IL-10 産生応答の観察

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 を用いて IL-1R を過剰に発現するミュータントをレンチウイルスの系を利用し作成を試みた。IL-1 $\beta$  刺激(25ng/mL)による *Il10* の発現と IL-10 の産生について qPCR と ELISA により観察した。

## (2) NLRP3 に着目したマクロファージからの IL-10 産生機構の解明

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 を用いて、下記の方法により実験を行った。

CEISPER-Cas9 による *Nlrp3* 遺伝子のノックアウト株の作成

*Nlrp3* 遺伝子が IL-10 産生応答に与える影響を検討するために、CRISPER-Cas9 システムを用いてレンチウイルスを利用し *Nlrp3* 遺伝子のノックダウン(KO)株を樹立した。

*Nlrp3*-KO 株を用いた IFN- $\gamma$ (10U)プライミング + LPS(100ng/mL)刺激による IL-10 の誘導について

IFN- $\gamma$  刺激 + LPS プライミングによって IL-10 が誘導されることから、このプライミングの系を用いて NLRP-3 の有無と IL-10 の誘導について qPCR により観察を行った。

IL-1R 過剰発現 / *Nlrp3*-KO 株の作成と IL-10 の産生についての検討

腸内細菌非依存的かつ MyD88 依存的な経路により誘導される IL-10 において、NLRP-3 分子が関与するか否かを確認するため、IL-1R 過剰発現 / *Nlrp3*-KO 株を作成し、IL-1 $\beta$  刺激を行い IL-10 の誘導を行い qPCR により観察を行った。

## (3) 手術時摘出サンプルによる粘膜固有層単核細胞(LPMC)の単離

炎症性腸疾患(IBD) 患者手術適応症例を対象にして以下の実験を行った。

倫理委員会承認後、手術時摘出組織一部を入手し、トリミング後、collagenase と DNase 処理による細胞の分散を行った。その後、Percoll による比重遠心分離法により粘膜固有層単核細胞(LPMC)層を採取し、LPMC 細胞分画からさらに CD3<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>炎症性マクロファージとその counter part 分画(CD3<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup>)の細胞を磁気細胞分離装置(MACS)でソーティングを行った。同様の方法で非炎症部の腸管組織より細胞を分離した。得られた細胞は mRNA の発現解析のために RLT buffer 中で保存する場合と、細胞が多い場合にはフローサイトメトリーによる解析を実行するため、セルバンカーで細胞を保存した。

## 4. 研究成果

### (1) 腸内細菌非依存的、MyD88 依存的経路で誘導される IL-10 産生機構の解明

まずは、研究分担者の小林ら (Kobayashi, T., et al. 2012. J Immunol 189(4):1792-9) が以前に行った研究の一部を我々のラボで追実験を行った。SPF 環境のマウスと無菌マウスの大腸から粘膜固有層単核球を分離し、MACS で CD11b 陽性の腸管マクロファージを分離した。その腸管 M $\phi$  の IL-10 産生を観察すると、SPF 環境下と同様に無菌マウスでも維持されており、腸管 M $\phi$  の IL-10 産生は腸内細菌非依存性であった。しかしながら、MyD88 の欠損(MyD88-KO)マウスでは、WT と比べて腸管マクロファージからの IL-10

発現が減少していた(図 1-1,1-2)。

そこで我々は、腸内細菌非依存的かつ MyD88 依存的な経路による IL-10 産生機構を見いだすため、IL-1R の発現について着目し研究を行った。MyD88 は、IL-1R に会合したアダプタータンパクであることから、リアルタイム PCR を用いて、*Il1r* 発現について観察すると、脾臓中の M や腹腔 M に比べ腸管 M で *Il1r* は非常に強く発現していた(図 2-1)。次にこの IL-1R を刺激することで IL-10 が増加するかどうかを確認した。野生型(WT)マウスと MyD88-KO マウスの腸管マクロファージを分離し、IL-1R を IL-1 で刺激を行い IL-10 の経時的な発現を観察すると WT の腸管マクロファージで有意に上昇していたが、MyD88-KO マウスでは増加が観察されなかった。以上の結果より、IL-1R の刺激が、最終的に IL-10 の産生に働く可能性が示唆された(図 2-2)。

最終的に、IL-1R を介した IL-10 の産生について解析するため、cDNA 発現用レンチウイルスベクターにマウス IL-1R をコンストラクトし、マウスマクロファージ株である RAW264.7 細胞に遺伝子導入を行った(図 3-1)。この IL-1R を過剰発現させたミュータント株を用いて、IL-1 で刺激を行うと *Il10* の mRNA 発現と IL-10 の産生が観察された(図 3-2,3-3)。

## (2) NLRP3 に着目したマクロファージからの IL-10 産生機構の解明

NLRP3 と IL-10 の産生について解明するため、まずは CRISPR/Cas9 により RAW264.7 細胞の NLRP3 分子をノックアウトした細胞(*Nlrp3*-KO)株を作成し、IL-10 産生を観察することにした(図 4-1)。

NLRP3 分子が完全に消失している clone#3 の *Nlrp3*-KO 株と WT、control の 3 群で検討した。RAW264.7 細胞は IFN- $\gamma$  でプライミング後に LPS 刺激を行うことで IL-10 を産生することが知られている。そこで WT, Control, *Nlrp3*-KO 株それぞれに IFN- $\gamma$  でプライミング後に LPS で刺激すると *Nlrp3*-KO 株では Control と比べて IL-10 の産生が抑制されていた(図 4-2)。一方で、

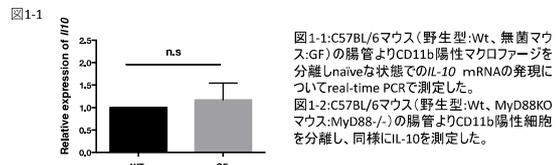
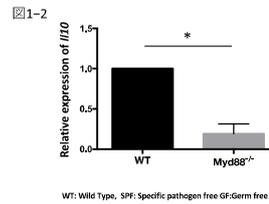


図1-1:C57BL/6マウス(野生型:WT、無菌マウス:GF)の腸管よりCD11b陽性マクロファージを分離しnaiveな状態で*Il-10* mRNAの発現についてreal-time PCRで測定した。



WT: Wild Type, SPF: Specific pathogen free GF: Germ free

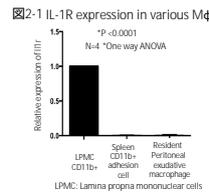


図2-1: C57BL/6マウスより腸管Mφs、脾細胞中のMφs、腹腔滲出性Mφsを分離して、*Il1r*の発現をリアルタイムPCRで観察した。

図2-2: C57BL/6マウス(野生型:WT、MyD88-KOマウス:MyD88<sup>-/-</sup>)の腸管よりCD11b陽性細胞を分離し、IL-1 $\beta$ で刺激後、経時的に細胞を回収し、*Il10*の発現をリアルタイムPCRで観察した。

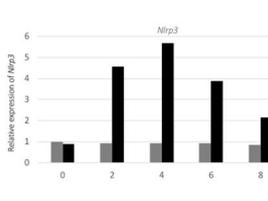
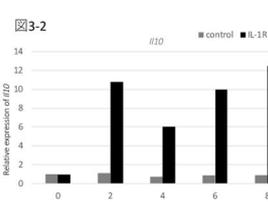
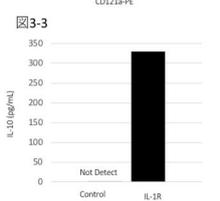
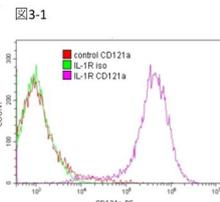
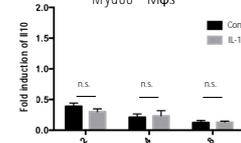
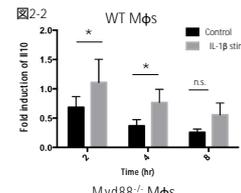


図3-1: フローサイトメトリーによるIL-1Rの発現確認。IL-1R過剰発現株は親株に比べ高率にIL-1Rを発現していた。  
図3-2: IL-1R過剰発現株を用いてIL-1 $\beta$ 刺激を行い、経時的に*Il10*と*Nlrp3*の発現を観察した。  
図3-3: IL-1R過剰発現株を用いてIL-1 $\beta$ 刺激を行い24時間後に培養上清を回収しELISAにてIL-10の産生量を観察した。

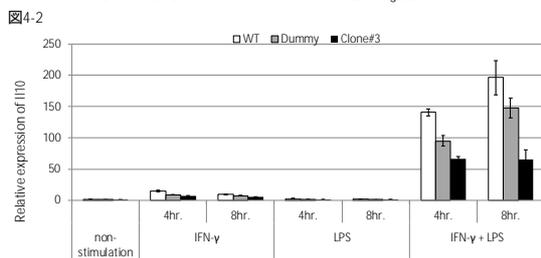
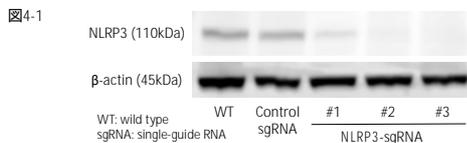


図4-1: CRISPR-Cas9システムでのNLRP3のノックアウトをウエスタンブロットングで確認した。  
図4-2: 作成した*Nlrp3*-KO株を用いて、IFN- $\gamma$ プライミング+LPS刺激によって、*Il10*の発現をリアルタイムPCRで経時的に確認した。

IL-1R 過剰発現株 / *Nlrp3*-KO 株を作成し、IL-1 刺激による IL-10 の産生に NLRP-3 分子が関与するかどうかを確認すると、NLRP-3 分子の有無にかかわらず、IL-1 /IL-1R を介した刺激では IL-10 の産生応答に差がなかった。以上のことから IL-1 から刺激による IL-10 の産生応答には NLRP3 の関与はしない可能性が示唆された (図 5)。

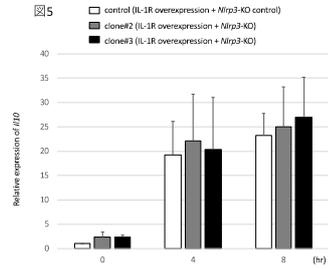


図 5 : IL-1R過剰発現株にNLRP3を欠損させたミュータント株を作成し、コントロール株と一緒にIL-1β(25ng/mL)で刺激した。その後、経時的にIL10の発現をリアルタイムPCRで観察した。

### (3) 手術時摘出サンプルによる粘膜固有層単核細胞(LPMC)の単離

現在までに集積したサンプルは、クローン病患者 35 例、潰瘍性大腸炎患者 20 例になるが、IBD の病態における腸管マクロファージの解析は、今後の研究に利用する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morimoto Yoshihito, Takada Kimihiko, Takeuchi Osamu, Watanabe Kazuhiro, Hirohara Masayoshi, Hamamoto Tomoyuki, Masuda Yutaka	4. 巻 472
2. 論文標題 Bcl-2/Bcl-xL inhibitor navitoclax increases the antitumor effect of Chk1 inhibitor prexasertib by inducing apoptosis in pancreatic cancer cells via inhibition of Bcl-xL but not Bcl-2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 187 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/s11010-020-03796-6">https://doi.org/10.1007/s11010-020-03796-6</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morimoto Yoshihito, Takada Kimihiko, Takeuchi Osamu, Takagi Akinori, Watanabe Kazuhiro, Hirohara Masayoshi, Hamamoto Tomoyuki, Masuda Yutaka	4. 巻 28
2. 論文標題 Prexasertib increases the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine and S-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 669 ~ 689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3892/or.2019.7421">https://doi.org/10.3892/or.2019.7421</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oka Akihiko, Mishima Yoshiyuki, Liu Bo, Herzog Jeremy W., Steinbach Erin C., Kobayashi Taku, Plevy Scott E., Sartor R. Balfour	4. 巻 8
2. 論文標題 Phosphoinositide 3-Kinase P110 -Signaling Is Critical for Microbiota-Activated IL-10 Production by B Cells that Regulate Intestinal Inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1121 ~ 1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8101121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okabayashi Shinji, Kobayashi Taku, Saito Eiko, Toyonaga Takahiko, Ozaki Ryo, Sagami Shintaro, Nakano Masaru, Tanaka Junichi, Yagisawa Keiji, Kuronuma Satoshi, Takeuchi Osamu, Hibi Toshifumi	4. 巻 17
2. 論文標題 Individualized treatment based on CYP3A5 single-nucleotide polymorphisms with tacrolimus in ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 218 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.5217/ir.2018.00117">https://doi.org/10.5217/ir.2018.00117</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Aito, Jeffery Louisa, Kobayashi Taku, Hibi Toshifumi, Ghosh Subrata, Jijon Humberto	4. 巻 87
2. 論文標題 Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 38 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2017.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Keiichi, Takeuchi Osamu, Suzuki Yukio, Kitagawa Yuko	4. 巻 54
2. 論文標題 Mechanisms of metformin's anti-tumor activity against gemcitabine-resistant pancreatic adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International journal of oncology	6. 最初と最後の頁 764 ~ 772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okabayashi Shinji, Kobayashi Taku, Nakano Masaru, Toyonaga Takahiko, Ozaki Ryo, Carla Tablante Maria, Kuronuma Satoshi, Takeuchi Osamu, Hibi Toshifumi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A Simple 1-Day Colon Capsule Endoscopy Procedure Demonstrated to be a Highly Acceptable Monitoring Tool for Ulcerative Colitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammatory Bowel Diseases	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izy125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹内 修、小林 拓、豊永 貴彦、黒沼 智、Maria Carla、岡林 慎二、佐上 晋太郎、上野 明紀、日比 紀文
2. 発表標題 腸管マクロファージにおけるIL-10産生機序の解明
3. 学会等名 第54回日本消化器免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊埜御堂沙英、田中 潤、篠崎公一、小林 拓、竹内 修、黒沼 智、佐上晋太郎、岡林慎二、渡辺 由紀、石橋とよみ、中野 雅、豊永貴彦、尾崎 良、日比紀文、斎藤太寿、小林 義和、齋藤雅俊
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎患者のタクロリムスTDM用ソフトウェアの作成とその有用性
3. 学会等名 第34回日本TDM学会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 根本華歩、小林 拓、上野明紀、黒沼 智、竹内 修、和田安代、日比紀文
2. 発表標題 高脂肪低炭水化物食がマウスの腸管及び腸内細菌叢に与える影響
3. 学会等名 第21回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇田川 文、小林 拓、黒沼 智、竹内 修、日比則孝、小林 朋、林 芳、和田安代、日比紀文
2. 発表標題 高脂肪食がマウスの腸炎及び腸内細菌叢に与える影響に関する検討
3. 学会等名 第23回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki Kiyohara, Takahiko Toyonaga, Satoshi Kuronuma, Aito Ueno, Shinji Okabayashi, Ryo Ozaki, Osamu Takeuchi, Sally A. Coulthard, Christopher P, F. Redfern, Hideki Terai, Yoichi Tanaka, Masaru Nakano, Toshifumi Hibi, Taku Kobayashi
2. 発表標題 NUDT15 variance increases DNA-incorporated thiopurine metabolites and lymphocyte apoptosis in patients with Inflammatory Bowel Disease
3. 学会等名 Congress of European Crohns and Colitis Organisation (ECCO) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小林 拓  (Kobayashi Taku)  (10424144)	北里大学・北里研究所病院・副センター長    (32607)	