

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15915

研究課題名(和文)Fc レセプターを介したTL1A分泌産生機構の解明

研究課題名(英文)Discovery of mechanism in which TL1A is produced through Fcγ receptors

研究代表者

金澤 義丈 (Kanazawa, Yoshitake)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60779726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの血中の単球分画において、免疫グロブリン受容体のうち、FcγRII、FcγRI、FcγRIIIの発現を確認した。一方、FcγRIII、FcγRIIb、FcγRIIcの発現はみられなかった。これらの受容体を刺激する方法としてヒトのIgGおよびIgAを用いて、単球の刺激を行い、IgGおよびIgAの同時刺激により単球からのTNFαやTL1Aという蛋白の産生の亢進を確認した。また、ヒトのIgGにより被覆化されたマイクロビーズを用いて単球を刺激することで、単球からのTNFαの産生が亢進することを確認した。一方で、TL1Aについては産生の亢進がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの血中単球を免疫グロブリン受容体を介して刺激する方法として、マイクロビーズを使用して刺激することにより、免疫グロブリンの各サブタイプ毎に被覆化された細菌を模することで、各免疫グロブリンに被覆化された細菌がどのように抗原提示細胞を刺激するかのモデルとして使用できる可能性があり、腸内細菌がどのように炎症性腸疾患に影響するのかを検討する一助になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human blood monocytes express parts of immunoglobulin receptors such as FcγRII, FcγRI and FcγRIII, but not FcγRIIIb, FcγRIIb and FcγRIIc. To stimulate monocytes through these receptors, human IgG and IgA was used. Production of TNFα and TL1A from monocytes was increased in condition in which monocytes are stimulated simultaneously with both human IgG and IgA. After monocytes were stimulated with microbeads which is covered with human IgG, production of TNFα from monocytes was increased, but production of TL1A was not increased.

研究分野：腸管免疫

キーワード：TL1A TNF 単球

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

TL1A はクローン病の疾患関連遺伝子の一つとして同定されており（Nat Genet, 2015. 47:979-86）、とりわけ、日本人においてクローン病との関連が明らかにされている（Hum Mol Genet, 2005. 15:3499-506）。TL1A を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは実験的腸炎モデルにおいて、腸管の線維化が増強される事が報告されており（PLoS One, 2011. 6:e16090）、腸管線維化との関連が注目されている。

炎症性腸疾患は遺伝的な素因とそれにより腸内常在細菌叢に対する異常な免疫応答が生じることが疾患発症の原因と想定されており、近年、腸管の免疫応答に関わるオートファジーや Th17 T 細胞分化、病原体に対するパターン認識レセプター(PRR)に関連した遺伝子が疾患関連遺伝子として注目されている（Nat Rev Genet, 2008. 9:9-14）。TL1A は腸管の免疫応答にも関わっている事が報告されており、腸管においては骨髄細胞由来の抗原提示細胞から分泌されている（Gastroenterology, 2008: 135:552-67）。TL1A はヒト抹消血由来単球を免疫複合体による Fc γ レセプター刺激を介して、その分泌が促進される事が報告されており（J Immunol, 2007. 178:4033-8）、さらに免疫複合体による TL1A の分泌促進作用は、TLR8 の刺激により抑制される事が報告されている（Eur J Immunol, 2009. 39:2195-202）。PRR が腸管免疫応答において腸内常在細菌叢や病原体の認識に関わっており、細胞内 PRR の一つである NOD2 はクローン病の発症に強く関連する遺伝子として知られている（Mucosal Immunol, 2013. 6:451-63）。クローン病を含めた炎症性腸疾患では腸内細菌叢の変化が疾患の発症と関連する事が報告されているが（Nature, 2012. 491:119-24）、近年、細菌叢のみならず腸内のウイルス叢の変化も炎症性腸疾患と関連する事が報告されている（Cell, 2015. 160:447-60）。PRR のうち TLR8 はウイルス ssRNA の認識に関わっていることから、腸内ウイルス叢 (virome)の変化がクローン病における TL1A の産生分泌に影響している可能性がある。

炎症性腸疾患においては Fc γ レセプターの polymorphism の相違が罹患率の相違（Inflamm Bowel Dis, 2010. 16:2080-9）や infliximab や adalimumab といった 生物学的製剤の効果に関連していること（Immunogenetics, 2013. 65:265-71）が報告されており、Fc γ レセプターと疾患とのかかわりがクローン病において注目されている。Infliximab や adalimumab は Fc 部分を保持する抗 TNF α 製剤として、炎症性腸疾患の治療に有効である一方、Fc 部分を有しない抗 TNF α 製剤である etanercept, onercept, CDP571 はクローン病の治療として期待されたが、十分な治療効果が認められなかったことから、Fc γ レセプターを介したシグナルが抗 TNF α 製剤の治療機序として重要であることが示唆されている（Gastroenterology, 2011. 140:221-30）。TL1A の産生分泌には Fc γ レセプターや TLR8 からの細胞内シグナルが関わっており、そのいずれについてもクローン病との関連が示唆されるが、Fc γ レセプター刺激と TLR8 刺激による TL1A の産生分泌に関与する詳細なメカニズムおよびクローン病との関わりについては、現在までのところ明らかにされておらず、TL1A 分泌に関わるメカニズムの解明を行うことで、クローン病による繊維性狭窄に対して、TLR8 刺激を介した新たな治療法が創出される可能性がある。

2. 研究の目的

TL1A はクローン病の関連遺伝子として注目されている。TL1A は免疫複合体による Fc γ レセプター刺激により骨髄由来細胞から産生分泌が促進される事が知られており、その産生分泌は toll 様受容体 8 (TLR8) 刺激により抑制される事がわかっている。近年、クローン病と

腸管内ウイルス叢との関連が報告されており、TLR8 はウイルス由来の ssRNA により刺激を受けること、および Fcγレセプターはクローン病の罹患や治療に関わっていることから、Fcγレセプターおよび TLR8 を介したシグナルが TL1A 産生分泌に密接に関連していると推測されるが、現在までのところ TLR8 および Fcγレセプターシグナルによる TL1A の産生分泌制御のメカニズムおよびクローン病との関連について詳細にはわかっていない。本研究では Fcγレセプターと TLR8 シグナルによる TL1A の産生分泌制御機構の解明とクローン病との関連について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TL1A の産生分泌を促進する Fcγレセプターサブタイプの同定

健常人の末梢血から比重分離法により末梢血単核球分画を回収し、さらに磁化ビーズを用いて末梢血由来単球分画を単離する。単離した単球について、フローサイトメトリーを用いて、純度を確認する。単離した単球を免疫複合体および各 Fcγレセプターのサブタイプについて、各々のレセプターサブタイプの刺激抗体とともに培養し、培養 6 時間後、12 時間後、24 時間後および 72 時間後の培養上清の回収を行う (J Immunol, 2007. 178:4033-8)。培養上清中の TL1A および各種サイトカインの産生について、ELISA 法を用いて確認し、TL1A 産生に關与する Fcγレセプターサブタイプについて同定する。Fcγレセプターサブタイプごとの刺激が困難な場合は、それぞれのレセプターサブタイプに親和性の高い IgG サブタイプによる免疫複合体もしくは免疫グロブリン被覆化抗体を使用して、単球の刺激を行い、それぞれの条件における TL1A の産生を比較して、TL1A 産生に關して主要な Fcγレセプターサブタイプを推定する。

(2) TLR8 シグナルと Fcγレセプターサブタイプについて、TL1A 分泌の機構を解明する。

健常人の末梢血から比重分離法により末梢血単核球分画を回収し、さらに磁化ビーズを用いて末梢血由来単球分画を単離する。単離した単球を同定した Fcγレセプターのサブタイプについて、刺激抗体とともに培養する。この際に TLR8 の agonist である resiquimod を培養液中に添加し、培養 6 時間後、12 時間後、24 時間後および 72 時間後の培養上清の回収を行う。培養上清中の TL1A および各種サイトカインの産生について、ELISA 法を用いて確認する。また、同時に可能であれば、培養細胞中の mRNA を回収し、TL1A と各種サイトカインなどの発現量について、Q-PCR 法を行い解析を行う。

(3) クローン病症例における TL1A 産生分泌にかかわる TLR8 と Fcγレセプターの発現とその下流シグナルの検討ならびに糞便中 micorbiome 解析による TL1A 産生との関連の検討。

A. TL1A 発現量によるクローン病患者の層別化

所属施設におけるクローン病患者のデータベースから TL1A について既知のクローン病リスク allele ごとに患者血中の TL1A 濃度の測定を行い、患者の層別化を行う (Hum Mol Genet, 2009. 18: 1089-98)。

B. TLR8 と Fcγレセプターの発現量の解析

層別化されたクローン病患者に關して、罹患病巣における TLR8 と Fcγレセプターサブタイプの発現および免疫複合体の沈着について、免疫組織染色を使用して確認する。また、患者末梢血由来単球に關して、TLR8 と Fcγレセプターサブタイプの細胞表面発現量についてフローサイトメトリーを使用して解析する。

C. クローン病患者における TL1A 産生分泌機構の解析

層別化されたクローン病患者から末梢血由来単球分画を単離し、Fcγレセプターサブタイプに対する刺激抗体および R848 とともに刺激培養する。培養 6 時間後、12 時間後、2

4 時間後および 7 2 時間後の培養上清中の TL1A や各種サイトカインの産生について ELISA 法を用いて解析する。また、同時に培養細胞中の mRNA を回収し、TL1A と各種サイトカイン、TL1A の産生に關与する遺伝子の発現量について、Q-PCR 法により解析を行う。さらに培養細胞中の TLR8 下流のシグナルと Fc γ レセプターサブタイプの下流シグナルに關して、健常者より得られた知見をもとに TL1A 産生分泌に關係する細胞内シグナルについて、ウェスタンブロット法を用いて検討する。

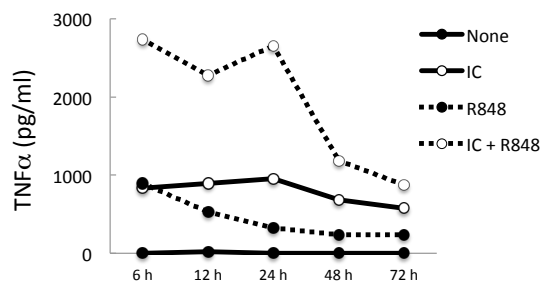
(4) クロウン病患者における TL1A 産生と腸内 virome との關連の解析

層別化されたクロウン病患者から糞便を回収し、まず、糞便中のヒト由来細胞、腸内細菌などを除去し、ウイルス様粒子を回収し、さらにウイルス DNA を回収する。回収した DNA を illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit を使用して増幅し、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for illumina により腸内ウイルスライブラリーを作成し、illumina MiSeq を使用して、シーケンスを行い、ウイルスについての既存のデータベース ([NCBIViral RefSeq proteins]および[PHST])との比較により腸内 virome と TL1A 産生との關連について解析を行う。(Cell, 2015. 160:447-60)

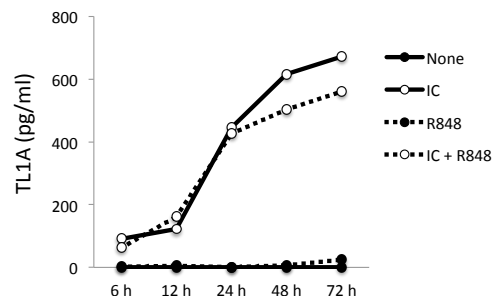
4. 研究成果

健常者より末梢血単球 (CD14⁺CD16⁺単球分画) の単離を行い、無刺激、免疫複合体 (IC) 刺激、TLR8 のアゴニストである R848 による刺激および IC と R848 による同時刺激の各条件について、TNF α および TL1A の産生について検討した。TNF α については 6 時間、18 時間、24 時間、48 時間、72 時間いずれの時点でも IC+R848 同時刺激群で TNF α の産生が最も高値であり、ついで IC 刺激単独群が高値であった。(図 1) 一方、TL1A の産生についてはいずれの検体も 48-72 時間で産生の増加を認めるが、検体により IC 刺激単独条件や IC+R848 同時刺激条件において産生の亢進がみられるなど、同じゲノタイプにおいても一定の傾向がみられなかったため、IC+R848 同時刺激により TL1A の産生が抑制されるとする既報のものとは異なる結果であった。(図 2) 本研究では TL1A のクロウン病に対するリスクアリアルにもとづいて TL1A の産生の違いと TLR8 シグナルの変化をとらえることを当初の目的としたが、健常人の結果からゲノタイプ毎に R848 による TL1A 産生への影響を検討することは困難と考えられた。

CD16⁺単球からの TNF α の産生 (図1)

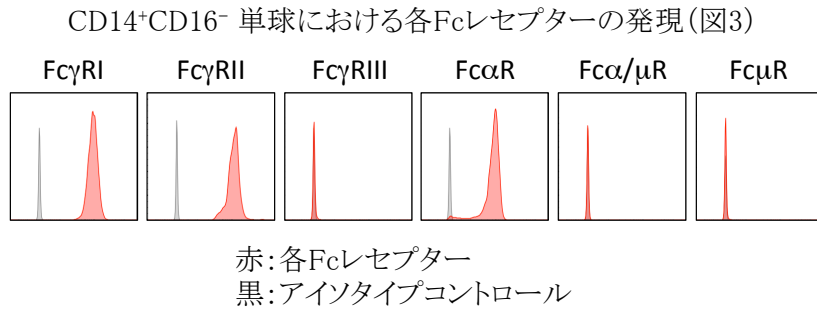


CD16⁺単球からの TL1A の産生 (図2)



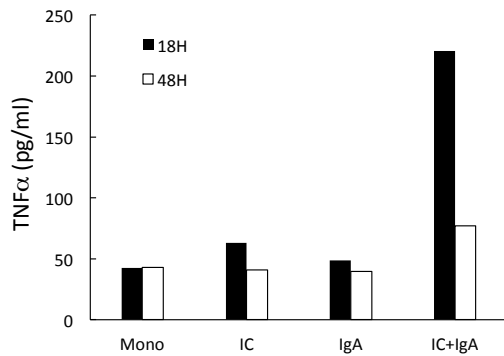
末梢血単球の IC 刺激による TNF α や TL1A の産生は単球上に発現する Fc レセプターを介して、行われると考えられたため、末梢血単球上の Fc レセプターの発現についてフローサイトメトリーを使用して確認を行い、末梢血単球サブセット (CD14⁺CD16⁺単球分画) では Fc γ RII (CD32)、Fc γ RI (CD64)、Fc α R (CD89) について発現を認めた。一方、Fc γ RIII (CD16)、Fc α / μ R、

Fc μ R については発現を認めなかった。(図3)

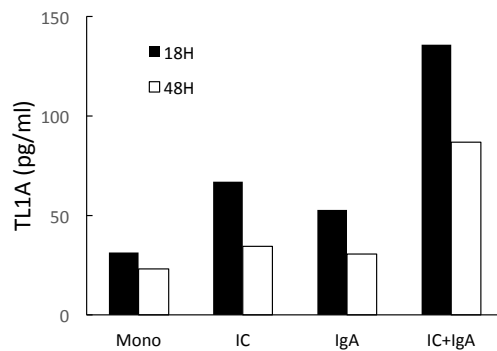


こうした結果から、IgA についても Fc α R を介して単球を刺激すると考えられたため、ヒト IgG のみならず、ヒト IgA による刺激培養を行ったところ、IgA 単独刺激条件では TNF α 、TL1A いずれもそれほど産生は認めなかったが、IC との同時刺激において、TNF α 、TL1A いずれも産生の亢進を認めた。(図4, 図5)

CD16⁻単球からのTNF α の産生(図4)

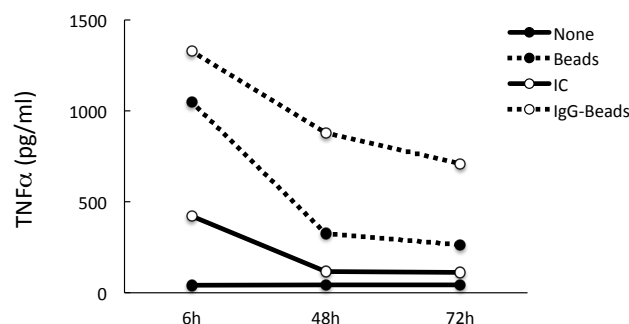


CD16⁻単球からのTL1Aの産生(図5)



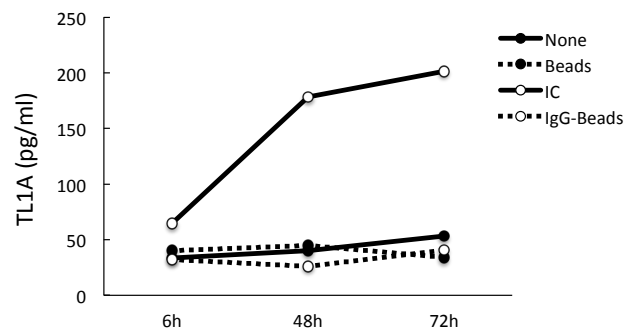
炎症性腸疾患 (IBD) 患者においては IgA や IgG といった免疫グロブリンに被覆化された便中細菌の増加が認められるとの報告があることから、粘膜固有層においてこれら免疫グロブリンにより被覆化された細菌が単球由来のマクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞を刺激すると考えられる。そこで、末梢血単球が IC 刺激により TNF α と TL1A を産生することに着目し、ヒト IgG により被覆化したマイクロビーズ (径 1 μ m) により刺激を行うことで、TNF α や TL1A の産生について検討した。単離した末梢血単球を無刺激、IC 刺激、ヒト IgG で被覆化されていないマイクロビーズおよびヒト IgG で被覆化したマイクロビーズによる刺激培養をおこなったところ、ヒト IgG で被覆化されたマイクロビーズで刺激した条件において、6 時間、48 時間、72 時間のいずれの時点でもマイクロビーズ単独刺激条件よりも TNF α の産生が亢進し、IC 単独刺激条件よりも高値であった。(図6)

CD16⁻単球からのTNF α の産生(図6)



一方、TL1A については IC 単独刺激条件では産生が亢進したが、その他の条件では産生の亢進はみられなかった。こうしたことから、TNF α と TL1A では異なる作用機序による産生が行われていると考えられた。(図7)

CD16 単球からの TL1A の産生 (図7)



【結論】

ヒト末梢血単球からの TL1A 産生は IC 刺激により増加するが、IgA からの刺激によりさらに増強される。また、IgG により被覆化したマイクロビーズを用いた検討から TNF α については IC、IgG 被覆化マイクロビーズいずれからの刺激によっても産生が増加するが、TL1A については IC 刺激により産生が増加する一方で、IgG 被覆化ビーズからの刺激では産生の増加がみられないことから、TL1A の産生は TNF α とは異なる機序により産生が促進されている。

5. 主な発表論文等

[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)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし。

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし。

※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。