

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17005

研究課題名(和文) アミノ酸による小腸腸管マクロファージからのIL-10産生制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Dietary amino acids regulate homeostasis of IL-10 producing lamina propria macrophages in the small intestine

研究代表者

越智 崇徳(Ochi, Takanori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70794147

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)：腸管には、体内で最も多くのマクロファージが存在しており、それらは炎症抑制性サイトカインであるインターロイキン(IL)-10を産生して、腸管内の恒常性維持に重要な役割を果たしている。我々は以前、小腸においてはIL-10産生マクロファージが食餌性抗原、特にアミノ酸により制御されていることを報告した。今回我々は、非ステロイド性抗炎症薬を用いた小腸炎モデルを用いて、小腸常在マクロファージがIL-10を産生して小腸粘膜上皮バリアの健全性を制御していることを明らかにした。特に、小腸炎回復期において単球由来マクロファージがIL-10を産生して粘膜修復に寄与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸において炎症抑制能を有するマクロファージが食餌性抗原、特にアミノ酸により誘導されること、小腸常在マクロファージがIL-10を産生して小腸粘膜上皮バリアの健全性を制御していることから、IL-10産生マクロファージを誘導する食餌性抗原を選択的に投与することで、小腸粘膜上皮修復が促進され、例えば短腸症候群や炎症性腸疾患などの患児において重症腸炎発症リスクを低減する新たな治療戦略に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The intestine contains the largest pool of macrophages (M_s), which produce anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) and play an important role in the maintenance of gastrointestinal homeostasis. We have previously reported that IL-10-producing M_s reside in the small intestine (SI) were regulated by dietary antigens, especially amino acids, while colonic M_s were regulated by the gut microbiota. In this study, we showed that SI M_s regulate epithelial barrier integrity via the secretion of IL-10. Notably, IL-10-producing M_s play an essential role in the recovery from acute SI injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Since the development and function of anti-inflammatory M_s in the SI appear to be regulated by dietary antigens, optimal dietary interventions could be used to promote mucosal healing in the SI, leading to reduce the risk of severe enteritis in the patients with short bowel syndrome requiring total parenteral nutrition.

研究分野：腸管免疫

キーワード：マクロファージ 小腸 IL-10 NSAIDs 小腸炎 アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 中心静脈栄養法 (Total parenteral nutrition: TPN) は、短腸症候群や炎症性腸疾患など小腸での消化吸収障害を伴う患者において有効な栄養投与方法である。一方で、長期使用による小腸粘膜の萎縮や透過性亢進が誘因となり、Bacterial translocation などの重大な合併症を引き起こす。
- (2) TPN モデルマウスを用いた研究で、長期絶食により小腸粘膜の透過性が亢進し、その原因として小腸粘膜における炎症抑制性サイトカイン Interleukin (IL)-10 産生低下が関与していることが報告されている¹⁾。
- (3) 腸管常在マクロファージは病原性微生物などの外来抗原に対する自然免疫の主な担当細胞であり、感染防御において重要な役割を果たしている。一方で、非病原性腸内常在細菌や食餌性抗原などの常在抗原に対しては過剰な免疫反応が起こらないように、IL-10 を産生して腸管免疫恒常性の維持に寄与している²⁾。
- (4) 大腸では、腸管常在マクロファージは腸内細菌によって分化・機能制御されていることが明らかにされている³⁾。一方、我々は以前、小腸においては IL-10 産生マクロファージが腸内細菌ではなく、食餌性抗原、特にアミノ酸によって制御されていることを明らかにした⁴⁾ (図 1)。

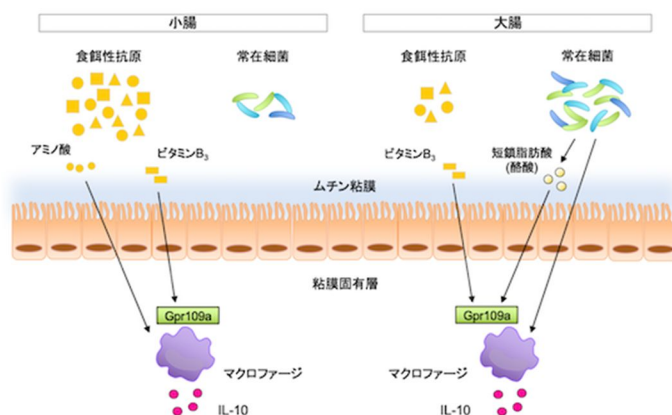


図1. 小腸および大腸におけるIL-10産生マクロファージの制御機構

Gpr109a: G-protein-coupled protein receptor 109a

(Ochi T et al⁴⁾, 2016) (Morhardt TL et al³⁾, 2018) (越智⁴⁾, 2018)

- (5) 小腸常在マクロファージからの IL-10 産生制御メカニズムの解明は、TPN に伴う重大な合併症リスクを低減する新たな治療法の提唱に繋がるものと考ええる。

2. 研究の目的

- (1) 小腸常在マクロファージの小腸炎における制御機構を検証する。
- (2) 小腸常在マクロファージからの IL-10 産生制御に寄与するアミノ酸を同定し、制御性アミノ酸の配合“アミノ酸カクテル”を作成、検証する。

3. 研究の方法

- (1) 非ステロイド性抗炎症薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) であるインドメタシンを野生型マウスに経皮的に単回投与し、小腸炎を誘導する。本モデルを用いて、小腸常在マクロファージの小腸炎における役割を解析する。
- (2) 骨髄由来マクロファージ (*in vitro* 分化) を用いて IL-10 産生誘導に寄与するアミノ酸を同定する。得られた結果から、IL-10 産生誘導に寄与する制御性アミノ酸の配合 “アミノ酸カクテル” を作成し、腸管から単離した *ex vivo* マクロファージを用いてその効果を検証する。

4. 研究成果

- (1) インドメタシン小腸炎モデル群 (IND) では、コントロール群 (Vehicle) と比べて、優位な体重減少 (図 2) および小腸粘膜上皮の透過性亢進 (図 3) を認めた。

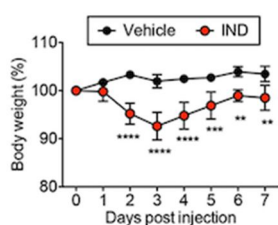


図2. 小腸炎モデルの体重推移
IND: インドメタシン小腸炎モデル群
Vehicle: コントロール群
(Morhardt TL et al⁷, 2019)

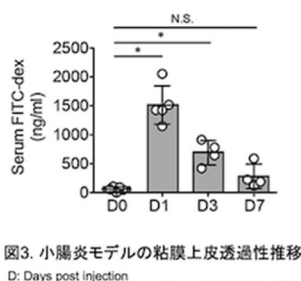


図3. 小腸炎モデルの粘膜上皮透過性推移
D: Days post injection
(Morhardt TL et al⁷, 2019)

- (2) インドメタシン投与 24 時間後に小腸粘膜を採取し、炎症性サイトカインの発現を mRNA レベルで調べたところ、TNF- α 、IL-6、IL-18 のいずれにおいても上昇を認めた。一方で、炎症抑制性サイトカインである IL-10 の上昇も認めた。本結果から、IL-10 が小腸の上皮修復において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
- (3) 続いて、上皮修復における IL-10 の役割を検証するために、IL-10 ノックアウトマウス (KO) を用いて小腸炎モデルを作成した。IL-10KO マウスでは小腸炎が増悪し、上皮修復がなされずに高い死亡率を呈した。
- (4) フローサイトメトリーを用いた解析により、小腸炎において IL-10 を産生する最も主要な細胞がマクロファージであり、さらに小腸炎回復期において CCR2 陽性単球由来の CD64⁺ Ly6C^{lo} MHC-II⁺ マクロファージが粘膜上皮修復に重要な役割を果たしていることが示された (図 4)。

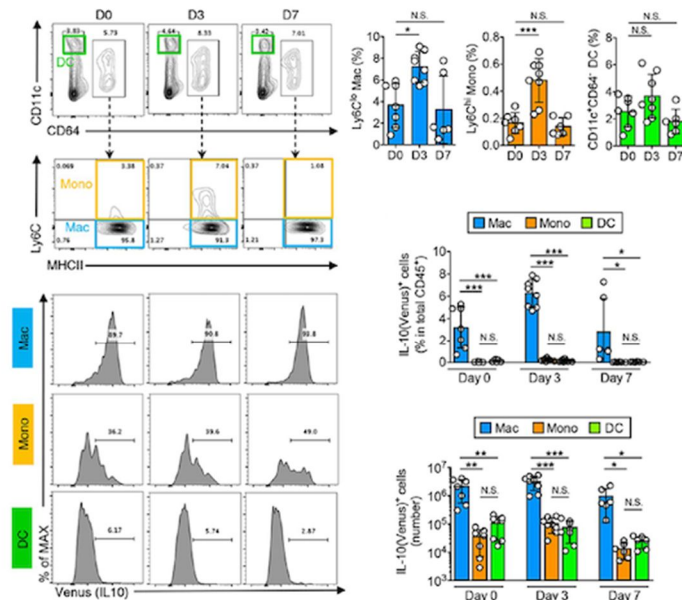


図4. 小腸炎回復期に単球由来マクロファージがIL-10を産生して粘膜修復に寄与している
Mac: マクロファージ, Mono: 単球, DC: 樹状細胞

(Morhardt TL et al⁷⁾, 2019)

- (5) 一方で、制御性 T 細胞や B 細胞から産生される IL-10 は小腸上皮修復に関与していないことが *Rag1* 遺伝子欠損マウスを用いた検討で示された。また、小腸粘膜マクロファージは末梢血 CCR 陽性単球から分化したものであり、小腸粘膜傷害時には CCR 陽性単球の炎症局所への遊走が増加することが分かった。しかしながら、炎症局所に遊走したばかりの単球の IL-10 産性能は低く、粘膜マクロファージへ最終分化することにより IL-10 産性能が高まることが示唆された。
- (6) 4 剤の抗菌薬カクテルを経口投与して腸内細菌を排除しても、粘膜内単球・マクロファージ数および IL-10 産生量に影響は認められず、小腸炎からの回復も抗菌薬非投与群と有意な差がなかったことから、小腸粘膜傷害時の粘膜内単球・マクロファージからの IL-10 産生制御は腸内細菌非依存性であることが示された。本結果は、大腸では腸内細菌叢により免疫機構が制御されているのに対し、小腸では大腸とは異なる制御機構により腸内の恒常性が維持されているという我々の過去の報告⁴⁾を裏付けるものとなった。
- (7) 骨髄由来マクロファージを用いて IL-10 産生を誘導する単一アミノ酸分画の同定を試みたが、本研究では同定に至らなかった。

<引用文献>

1. Sun X, Yang H, Nose K, et al: Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G139-147 (2008)
2. Kamada N, Núñez G: Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology* 146(6):1477-1488 (2014)
3. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, et al: Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 15(10):929-937 (2014)
4. Ochi T, Feng Y, Kitamoto S, et al: Diet-dependent, microbiota-independent regulation of IL-10-producing lamina propria macrophages in the small intestine. *Sci Rep* 6:27634 (2016)
5. Morhardt TL, Hayashi A, Kao JY, et al: Regional control of regulatory immune cells in the intestine. *Curr Pathobiol Rep* 6(1):29-34 (2018)
6. 越智崇徳: 腸管 IL-10 産生マクロファージの制御機構. *Med Sci Digest* 44(8):401-404 (2018)
7. Morhardt TL, Hayashi A, Ochi T, et al: IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Sci Rep* 9:1223 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tina L. Morhardt, Atsushi Hayashi, Takanori Ochi, Miguel Quiros, Sho Kitamoto, Hiroko Nagao-Kitamoto, Peter Kuffa, Koji Atarashi, Kenya Honda, John Y. Kao, Asma Nusrat, Nobuhiko Kamada	4. 巻 9
2. 論文標題 IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-018-38125-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 越智 崇徳	4. 巻 44
2. 論文標題 腸管IL-10産生マクロファージの制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 401-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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0件

〔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
研究協力者	鎌田 信彦 (Kamada Nobuhiko)	ミシガン大学・Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine・Associate professor	