

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19390197
研究課題名（和文） 骨髄腸管間を循環する腸炎惹起免疫記憶 T 細胞の全身播種性を制御する新規治療法の開発
研究課題名（英文） Circulating colitogenic CD4+ memory T cells between bone marrow and intestine may be targets for the treatment of inflammatory bowel diseases
研究代表者 金井 隆典(KANAI TAKANORI) 慶應義塾大学・医学部・准教授 研究者番号：40245478

研究成果の概要：

マウス大腸炎モデルにおいて腸炎責任CD4 T細胞は腸炎完成後恒常的に全身循環し、循環遮断は腸炎発症を抑制することを明らかとした。腸炎責任CD4 T細胞はIL-7産生骨髄にも存在し、腸管IL-7欠損状態においても骨髄IL-7によって維持されることを並体結合実験で証明した。さらに、腸炎責任CD4 T細胞はTLR分子を発現し、MyD88分子を介し病態恒常性に寄与することを明らかとした。また、無菌マウスにおいても腸炎発症を認めることはないものの腸炎責任CD4 T細胞は恒常的生体内で長期維持されることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、腸炎責任CD4 T細胞、免疫記憶T細胞、IL-7、慢性大腸炎モデル

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎およびクローン病は本邦において近年増加の一途をたどり、かつ、就学、就労、結婚、出産といった社会生活の真最中の若年者を襲い、再燃と緩解を繰り返し生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる難病であり新規治療法開発は急務な国民的要請である。

従来から炎症性腸疾患は小腸や大腸を侵す腸に局限した疾患として捉えられて、実際、内科的な治療の継続が困難な症例に対しては腸病変の外科的局所切除が必要とされてきた。術後、外科的緩解 (Surgical remission) という用語が用いられているように炎症性腸疾患の病態は外科的に一旦健常状態にリセットされたと判断されてきた。しかしながら、ほぼ100%の患

者で術後に手術以前と同一の疾患、同様な病変を再燃する。我々はこのような炎症性腸疾患の永続性・難治性の主座として免疫の記憶（メモリー）という概念を提唱してきた(Kanai T, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: 1051-8, 2006)。すなわち、疾患の責任細胞は抗原を特異的に認識し記憶する免疫記憶T細胞が炎症性腸疾患発症時に形成され、ひとたび緩解導入に成功しても潜在する腸炎責任免疫記憶T細胞の再活性化が再燃を引き起こすと推定している。さらに、腸炎責任免疫記憶T細胞は血球細胞であることから白血病細胞でみられるのと同様に全身に播種した病態、すなわち炎症性腸疾患を腸局所に限局した疾患としてではなく全身疾患として捉える仮説のもとに本プロジェクトを立案した。実際、最近になり我々はマウス炎症性腸疾患モデルを用いて、慢性大腸炎発症時に腸炎責任免疫記憶T細胞が腸管から離れた骨髄にも潜在することを見出し、腸炎永続性のリザーバーとしての骨髄の役割を明らかにした (Nemoto Y, Kanai T, et al. Gastroenterology. in press)。さらに、近年、潰瘍性大腸炎という大腸疾患に対して本邦で開発された白血球除去療法が臨床応用され、その有効性が数多く報告されているが (Kanai T, et al. Expert Opin on Biol Ther. 6: 453-66, 2006)、我々は炎症性腸疾患患者では腸炎責任免疫記憶T細胞が血中に常に再循環しておりこの再循環システムを遮断することこそが白血球除去療法の作用機序と推定している。これを裏付けるように、最近開発されたリンパ球の血中循環を遮断する新規の免疫抑制剤、FTY720 (2-amino-2-(2-(4-oxocetylphenylethyl)-1,3-propanediol; Fingolimod)が多発性硬化症患者に有効であると報告されている。

2. 研究の目的

その実証のために、我々のグループが頻用するCD4+CD45RB^{high}移入大腸炎モデルが極めて有用なモデルと言える(Totsuka T, Kanai T, et al. Gastroenterology. 124: 410-21, 2003)。本モデルはCD4+CD45RB^{high}ナイーブ細胞をT細胞の欠損した免疫不全マウスに移入することで腸内細菌に反応するCD4+T細胞が移入細胞に比べ100

万倍以上の増殖によって発症する。したがって、本腸炎マウス生体内に存在するCD4+T細胞はそのほとんどが腸炎責任免疫CD4+T細胞で構成されることになる極めて特徴的なモデルであり腸炎責任免疫CD4+T細胞の生体内での追跡に非常に有用なモデルである。本プロジェクト期間中に、CD4+CD45RB^{high}移入大腸炎マウス末梢血CD4+T細胞を分離し新規免疫不全マウスへの再移入による腸炎の発症有無を明らかとしたい。いわば微生物学におけるコッホの3原則に相当する実験系であり、上述の如く、本モデルマウスにおいてのみ達成可能といえる。さらに、慢性大腸炎疾患が全身疾患であることを追究するために、様々な臓器組織におけるT細胞の存在とその腸炎誘導能についても検討を行う。

第2の腸炎責任免疫記憶T細胞を支持するIL-7産生骨髄と腸管との骨髄腸管循環の免疫慢性大腸炎疾患病態における重要性プロジェクトは第1プロジェクトと密接に関連するプロジェクトといえる。第1プロジェクトの目標である慢性大腸炎における腸炎責任免疫記憶T細胞の播種性の証明から、第2プロジェクトの目標として、慢性腸炎炎症持続に腸内細菌反応性腸炎惹起制CD4+T細胞が循環系を介して全身さまざまな臓器組織に潜在する必然性(生物的病態的意義)について追求する。そのヒントとして我々は2つの背景に着目した。第1に我々のグループが中心となって報告してきた慢性大腸炎における免疫恒常性サイトカインIL-7の重要性に関するものである。IL-7は腸管上皮細胞で産生され(Watanabe M, et al. J Clin Invest. 95: 2945-53, 1995)、抗IL-7抗体などによるIL-7阻害系は腸炎の発症と維持を抑制し治療の可能性を示唆してきた(Yamazaki M, Kanai T, et al. J Immunol 171: 1556-63, 2003, Okada E, Kanai T, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288: 745-54, 2005)。しかしながら、慢性大腸炎活動性に相関し不思議な現象として炎症局所である腸管でのIL-7産生が逆に減少することを明らかとしてきた(Watanabe M, et al. J Exp Med 187: 389-402, 1998)。第2に最近の基礎免疫学の進歩に伴いCD4+免疫記憶T細胞の維持にIL-7が必須であることも明らかとされ

てきた。これらの背景から、我々は慢性大腸炎永続性におけるIL-7供給源として腸管以外に骨髄に着目した。骨髄は造血臓器としてT細胞ばかりではなくすべての血液細胞を産生する1次リンパ装置として考えられてきた。さらに骨髄は重要なIL-7産生部位である。IL-7発見当時は骨髄でのIL-7はT細胞とB細胞の前駆細胞分化に必須な造血因子として捉えられてきたが、現在では骨髄に成熟したT細胞の存在も明らかとされている。以上のことから、我々は慢性大腸炎永続性において腸炎責任免疫記憶T細胞がその生存のために腸管から移出し循環し骨髄IL-7というニッチを形成するという仮説を立て本プロジェクトを遂行する。具体的には、慢性大腸炎骨髄におけるIL-7産生細胞と成熟CD4+細胞との相互作用の検討、骨髄IL-7の必須性と腸管IL-7の非必須性の検討をIL-7欠損マウスとパラピオース（並体結合）を用いたマウス実験系を行う。本研究では骨髄IL-7の慢性大腸炎における重要性・必須性に迫るものであり、従来の外科手術などの局所治療とは異なり、全身に病的細胞が播種する白血病に類似した全身疾患として治療戦略の方向性を決定付けるものと考えられる。

第3のプロジェクトでは炎症性腸疾患の全身免疫細胞循環制御療法の開発に取り組む。第1、2のプロジェクトで集積される基盤的データをもとに、慢性大腸炎永続性における腸炎責任免疫記憶T細胞の大循環系を介した骨髄腸管循環の遮断という発想の新規治療法に取り組む。我々が着目した新規免疫抑制剤はFTY720である。FTY720はT細胞のリンパ節から輸出リンパ管への移出を阻害するユニークな作用機序によりリンパ球系細胞の循環系を遮断するものと考えられている。すでに、臓器移植などに免疫抑制剤として臨床知見も実施されており炎症性腸疾患への応用が期待される薬剤である。我々は慢性大腸炎モデルに用い腸炎責任免疫記憶CD4+T細胞のFTY720による循環抑制効果とその慢性大腸炎治療効果を検討するとともに、腸炎責任免疫記憶T細胞のリザーバーとしての骨髄での変化を検討することにより、慢性大腸炎永続性における腸炎責任免疫記憶CD4+T細胞の骨髄-腸管循

環の必須性を明らかとする。これらの基盤的研究に立脚した本研究では研究期間内にFTY720を用いた炎症性腸疾患患者に対するFTY720治療の臨床試験の具体的な立案に着手する予定である。

本研究の特徴は申請者らが臨床第一線で診療し、得られる成果を最終的にヒト疾患に対する新規治療として応用することを目指す点にある。本研究は、様々な実験デバイスの保持、実験モデルの確立を終えた申請者らにおいてのみ遂行可能で、国際的にも評価に耐え得る独創的研究と考えている。

3. 研究の方法

(1) 慢性大腸炎モデル末梢血に腸炎責任CD4+T細胞が存在するか？

CD4+CD45Rb^{high} T細胞移入SCID大腸炎モデルの作製；本モデルは正常naïve T細胞をT細胞の存在しないSCIDまたはRag-1/2欠損マウスに移入するシステムであり、移入したT細胞のうち正常腸内細菌に反応したT細胞はおよそ100万倍に増殖するモデルである。従来のマウスモデルやヒト炎症性腸疾患患者では末梢血は極めて多様な細胞が混在するため実証不可能であった末梢血中に病的腸炎惹起性CD4+T陽性細胞の存在を本マウスモデルで直接的単純に証明しうる可能性がある。さらに、腸炎を発症した場合、末梢血病的腸炎惹起性CD4+陽性細胞が腸管へ移入することを直接的に証明できる特徴を有する実験系である。

正常マウス脾臓より分離した単核球より、MACS分離法を用いてCD4+T細胞を分離する。

分離したCD4+T細胞をさらにFACS Vantageを用いてCD4+CD45Rb^{high}T細胞を分離する。

得られたCD4+CD45Rb^{high}T細胞を同系免疫不全マウスSCIDまたはRag-2欠損マウス腹腔内へ移入する。

移入4-6週後慢性大腸炎が発症したマウスより末梢血を分離する。1)同様にMACSビーズを用いてCD4+T細胞を分離する。コントロールとして正常マウス末梢血から同様にCD4+T細胞を分離する。さらに、両者のCD4+T細胞のnaïve/memory細胞表面マーカーとしてCD4/CD44/CD62LのFACS解析を行う。

得られたCD4+T細胞を再び新規SCIDまたは

Rag 2欠損マウスへ移入する。
経時的に腸炎発症の観察を行う。

(2) 末梢血腸炎責任CD4+T細胞は骨髄に移入するか？

上記で展開した移入実験マウス骨髄細胞を分離しCD4+T細胞の存在をFACS解析並びにCD4免疫組織化学的解析を行う。

さらに骨髄細胞よりCD4+MACSビーズを用い、CD4+T細胞を分離し、新規SCIDまたはRag 2欠損マウスへ移入する。

経時的に腸炎発症の観察を行う。

(3) 腸炎骨髄CD4+T細胞の維持メカニズムの検討

CD4+CD45RBhighT細胞移入Rag 2欠損マウス慢性大腸炎を作成し骨髄細胞の存在をFACS解析並びにCD4免疫組織化学的解析を行う。

さらに、骨髄におけるCD4+T細胞のニッチ形成に関するIL 7産生細胞との関連を検討する目的にIL 7/CD4の2重免疫組織化学染色を行う。

腸炎マウス骨髄CD4+T細胞を分離し、新規IL 7 -/- x Rag 1 -/- マウスまたはコントロールIL 7+/+ x Rag 1 -/- マウスへ再移入する。

経時的に腸炎発症の観察を行う。

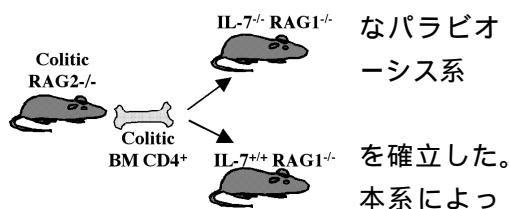
(4) IL 7依存性腸炎骨髄CD4+T細胞の維持に腸管IL 7は必須か？

信頼に耐えうる腸管特異的発現プロモーターの報告のない現状に

において、腸管IL 7の腸炎発症・維持における必須性または非必須

性を追究するために骨髄（ドナー側）ではIL 7を産生するが腸管

（ホスト側）ではIL 7を産生しないユニークなパラピオ



で慢性大腸炎活動期においてIL 7が腸管で減少する(Watanabe M, et al. J Exp Med 187: 389-402, 1998)が個体トータルではIL 7は腸炎発症・維持に必須である

(J Immunol. submitted)という我々が見出した2つの事実を矛盾

なく説明する骨髄IL 7の重要性に着目した実験系と考える。

腸管で産生されるIL 7の腸炎発症維持における必須性を追求

する目的にてパラピオ-シス（並体結合）系を導入する。

CD4+CD45RBhighT細胞移入IL 7+/+ x Rag 1 -/- マウス大腸炎

（ドナー）を作製後、新規IL 7 -/- x Rag 1 -/- マウスまたは

コントロールIL 7+/+ x Rag 1 -/- マウス（ホスト）とのパラピ

オ-シス手術を行う。

経時的にドナー・ホストマウスの腸炎発症の観察を行う。

4. 研究成果

(1) 慢性大腸炎モデル末梢血に腸炎責任CD4+T細胞が存在するか？

IBDモデル、CD4+CD45RBhigh T細胞移入SCID大腸炎マウスにおいて、腸炎責任CD4+ T細胞は発症初期ばかりではなく腸炎完成後

においても恒常的に全身に循環していることを明らかとした(Inflam Bowel Dis. 2009)。

また、FTY720による腸炎責任CD4+ T細胞の循環遮断は腸炎発症を抑制することを明らかとした(Eur J Immunol. 2008)。

以上、IBDを腸管局所の消化管疾患ではなく全身疾患として捉える必要性を示唆するものと言え、IBDにおける免疫系のリセット、すなわち骨髄移植による根治の可能性を提言したい。

(2) 腸炎骨髄CD4+T細胞の維持メカニズムの検討

腸炎責任CD4+ T細胞はIL 7を産生する骨髄にも存在し、腸管IL 7欠損状態において骨髄IL 7によって維持されることをパラピオ-シス実験によって証明した

(Inflam Bowel Dis. 2008, J Immunol 2008)。

さらに、腸炎責任CD4+ T細胞は様々なTLR

分子を発現し、TLR を介した刺激は MyD88 分子を介し、病態恒常性に寄与することを明らかとした(J Immunol 2008)。また、無菌マウスにおいても腸炎発症を認めることはないものの腸炎責任 CD4+ T 細胞は恒常的生体内で長期維持されることを証明した(J Immunol 投稿中)。以上のことから、IBD における腸炎責任 CD4+ T 細胞は腸内細菌とホメオスターシス・サイトカイン IL-7 により相互制御を受け、免疫記憶化を維持する機構を明らかとし、いわゆる慢性炎症性疾患の病態への応用も期待できるものである。

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 21 件)

1. Kanai T, Nemoto Y, Kamada N, Totsuka T, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T. Homeostatic (IL-7) and effector (IL-17) cytokines as distinct but complementary target for an optimal therapeutic strategy in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009. [Epub ahead of print], 査読有
2. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M. RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+CD25+ regulatory T cells in chronic colitis. *J Immunol*. 2009; 182: 6079-6087. 査読有
3. Araki A, Tsuchiya K, Okada E, Suzuki S, Oshima S, Yoshioka S, Yoshioka A, Kanai T, Watanabe M. Single-operator double-balloon endoscopy (DBE) is as effective as dual-operator DBE. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009. [Epub ahead of print], 査読有
4. Murayama M, Okamoto R, Tsuchiya K, Akiyama J, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M. Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol*. 2009; 44: 173-182. 査読有
5. Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya K, Aoki K, Ohya K, Yagita H, Watanabe M. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 296: G850-859. 査読有
6. Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M. Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 296: G23-35. 査読有
7. Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Totsuka T, Watanabe M, Hibi T. Persistent retention of colitogenic CD4+ memory T cells causes inflammatory bowel diseases to become intractable. *Inflamm Bowel Dis*. 2009. 15: 926-934. 査読有
8. Fujii T, Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Sakamoto N, Nakamura T, Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M. FTY720 suppresses the development of colitis in lymphoid-null mice by modulating the trafficking of colitogenic CD4+ T cells in bone marrow. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 3290-3303. 査読有
9. Araki A, Tsuchiya K, Okada E, Suzuki S, Oshima S, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. Single-operator method for double-balloon endoscopy: a pilot study. *Endoscopy*. 2008; 40: 936-938. 査読有
10. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Nozaki K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Watanabe M. Colitogenic CD4+ effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: 1630-1640. 査読有
11. Yoshioka A, Okamoto R, Oshima S, Akiyama J, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M. Flagellin stimulation suppresses IL-7 secretion of intestinal epithelial cells. *Cytokine*. 2008; 44: 57-64. 査読有
12. Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Fukuda T, Miura O, Yagita H, Watanabe M. Negative feedback regulation of colitogenic CD4+ T cells by increased granulopoiesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: 1491-1503. 査読有
13. Hino K, Tsuchiya K, Fukao T, Kiga K,

- Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. Inducible expression of microRNA -194 is regulated by HNF -1alpha during intestinal epithelial cell differentiation. RNA. 2008; 14: 1433 -1442. 査読有
14. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Tsuchiya K, Sakamoto N, Okamoto R, Watanabe M. Immunosenescent colitogenic CD4(+) T cells convert to regulatory cells and suppress colitis. Eur J Immunol. 2008; 38: 1275 -1286. 査読有
15. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Watanabe M. Continuous generation of colitogenic CD4(+) T cells in persistent colitis. Eur J Immunol. 2008; 38: 1264 -1274. 査読有
16. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M. MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. J Immunol. 2008; 180: 5291 -5299. 査読有
17. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M. Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 368: 923 -929. 査読有
18. Nakamura T, Nagahori M, Kanai T, Watanabe M. Current pharmacologic therapies and emerging alternatives in the treatment of ulcerative colitis. Digestion. 2008; 77: S36 -41. 査読有
19. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M. Systemic, but not intestinal, IL -7 is essential for the persistence of chronic colitis. J Immunol. 2008; 180: 383 -390. 査読有
20. Sekine -Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura -Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N, Watanabe M. Development of plaque assays for hepatitis C virus JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. Virology. 2008; 371: 71 -85. 査読有
21. Ito Y, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Yoshioka A, Tomita

T, Nagaishi T, Sakamoto N, Sakanishi T, Okumura K, Yagita H, Watanabe M. Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4+ T cell-mediated colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008; 294: G199 -207. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 根本康宏、金井隆典、渡辺守. IL -17を標的とした腸炎惹起性メモリーT細胞の制御. 第50回日本消化器病学会. 2008.10.3.東京.
2. Nemoto T, Kanai T, Tohda S, Tpt suka T, Okamoto R, TsuchiyaK, F ukuda T, Yagita H, and Watanabe M. Negative feedback regulation of pathogenic CD4+T Cells by i ncreased granulopoiesis. 109thAnnual meeting of the AGA Institute. 2008.5.20 San Doego, CA

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 隆典 (Kanai Takanori)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：40245478

(2) 研究分担者

渡辺 守 (Watanabe Manabu)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：10175127

戸塚 輝治 (Totsuka Teruji)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70447465

永石 宇司 (Nagaishi Takashi)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・メディカルフェロー
研究者番号：60447464

(3) 連携研究者

なし