

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590495

研究課題名 (和文) 細菌性抗原受容体 NOD2 の活性化による腸管免疫制御機構の解析

研究課題名 (英文) Immune regulation of intestinal homeostasis by NOD2 activation

研究代表者

渡邊 智裕 (WATANABE TOMOHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40444468

研究成果の概要：Nucleotide binding oligomerization domain 2(NOD2)の活性化が腸内細菌による Toll-like receptor (TLR)の活性化を抑制することにより、腸炎の発症を未然に防止していること及びその分子機序を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 免疫学

キーワード：サイトカイン 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

(1)NOD2 は細菌壁構成成分である Peptidoglycan (PGN)由来の小分子 Muramyl Dipeptide(MDP)を認識することにより、自然免疫反応の一翼を担っている。

(2)クローン病に代表される炎症性腸疾患は腸内細菌に対する過剰な免疫反応を背景に発症することが知られている。NOD2 変異がクローン病の発症に関わっていることが報告されたが、NOD2 変異の存在下でいかにしてクローン病が発症するのかその機序は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

申請者は NOD2 と自然免疫の他の中心分子である TLR がその下流のシグナル伝達経路を共有していることに着目し、NOD2 と TLR の間に cross-talk 現象が存在するのではないかと考えた。申請者は MDP による NOD2 の活性化が TLR2 を介する炎症反応を負に制御することを発見し、報告した。しかしながら、腸炎の発症には TLR2 のみならず多くの TLR が関与することが示唆されており、NOD2 による TLR2 への負の制御機構のみで腸炎の発症を説明することは不可能であった。そこで、本研究においては NOD2 が多くの TLR 経路を負に制御するか否かを検証した。

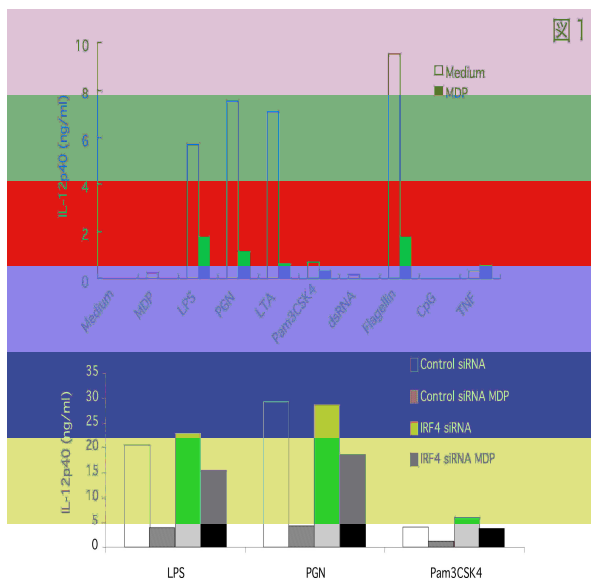
## 3. 研究の方法

(1)MDP による NOD2 の活性化が TLR を介する炎症反応を負に制御するか否かをヒト樹状細胞(dendritic cell, DC)を用いて検討した。DC を予め MDP で 24 時間刺激し、洗浄したのち、様々な TLR ligands で刺激しその産生するサイトカインとシグナル伝達経路への影響を検討した。

(2)マウス実験腸炎モデルである dextran sodium sulfate(DSS)腸炎を用いて、MDP 投与による NOD2 の活性化が腸炎の発症を防止するか否かを検討した。

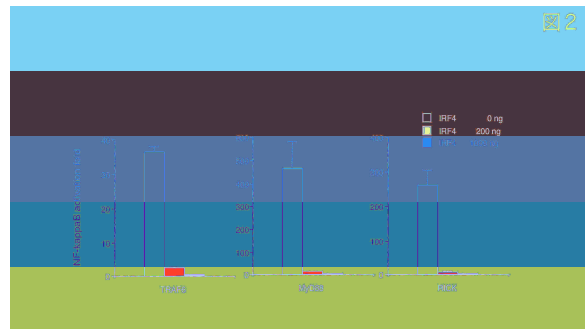
#### 4. 研究成果

(1) MDP 刺激により NOD2 を予め活性化されたヒト DC において、引き続き様々な TLR ligands で刺激した際に炎症性サイトカインである IL-12p40 の産生が著明に抑制された (図 1 参照)。さらにその効果は MDP により活性化を受けた DC が TLR シグナル伝達経路の負の制御因子である IRF4 の発現を増加させるためであることが siRNA を用いた検討で明らかとなった。つまり、IRF4siRNA を導入され、IRF4 の発現を低下された DC においては、MDP による NOD2 の活性化は TLR を介する炎症性サイトカインの産生を抑制しなかった (図 1 参照)。

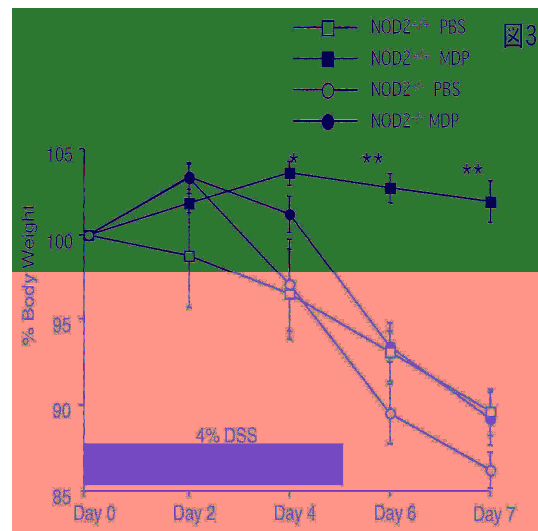


(2) MDP 刺激による NOD2 の活性化は IRF4 の発現を誘導し、IRF4 は TLR のシグナル伝達分子 (TRAF6、RICK、MyD88) と結合し、NF-kappaB の活性化を抑制することが明らかとなった。IRF4 の遺伝子導入は濃度依存性に TRAF6、RICK、MyD88 を介する NF-kappaB の活性化を抑制した (図 2 参照)。さらに、ヒト DC を用いた endogenous な系においても MDP で刺激

された DC においては IRF4 と RICK の結合が認められた。このことから、MDP による NOD2 の活性化は IRF4 の発現を誘導し、多くの TLR 経路を阻害することが証明された。

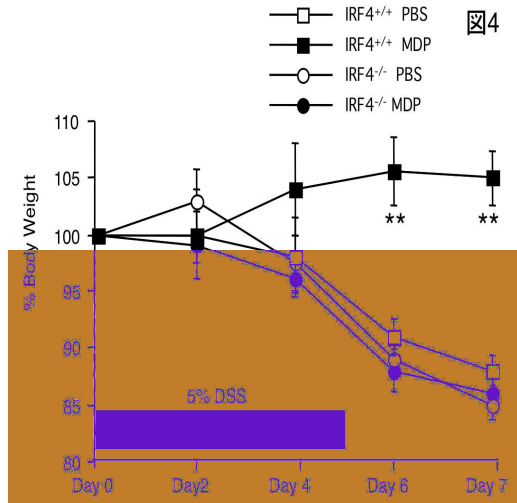


(3) MDP を全身投与され、NOD2 が予め活性化されたマウスにおいては DSS 腸炎の発症が著明に抑制された (図 3 参照)。さらに、その効果は MDP を投与されたマウスの腸管組織において、TLR 経路の活性化が抑制されているためであった。



されたマウスにおいては DSS 腸炎の発症が著明に抑制された (図 3 参照)。さらに、その効果は MDP を投与されたマウスの腸管組織において、TLR 経路の活性化が抑制されているためであった。

(4) IRF4 欠損マウスにおいては MDP 投与による DSS 腸炎の予防効果が認められなかった (図 4 参照)。



(5) 以上の結果から、MDP による NOD2 の活性化は IRF4 の発現を介して、TLR のシグナル伝達経路を阻害する。その効果は TLR2 のみならず多くの TLR 経路に及ぶこと、また、MDP による NOD2 の活性化は DSS 腸炎の発症を抑制することが証明された。

(6) MDP による NOD2 の活性化を用いた炎症性腸疾患の新規治療法の開発の可能性が示唆された。

## 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 3 件)

1) Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, Tailor P, Fuss IJ, Kitani A, Strober W. Muramyl dipeptide activation of nucleotide binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis.

**Journal of Clinical Investigation**

2008;118:545-59. 査読有

2) Strober W, Kitani A, Fuss IJ, Asano N, Watanabe T. The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease. **Mucosal Immunology**

2008;1:5-9. 査読有

3) Yang Z, Fuss IJ, Watanabe T, Asano N, Davey MP, Rosenbaum JT, Strober W, and Kitani A. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis-induction. **Gastroenterology**

2007; 133; 1510-21. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Tomohiro Watanabe, Muramyl dipeptide activation of Nucleotide binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis.

**Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology** 2008 December 1-3, Kyoto.

Symposium: Mucosal immunology.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 智裕 (WATANABE TOMOHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 ; 40444468