

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790483
 研究課題名（和文） 樹状細胞の Delta-Jagged の制御を応用した炎症性腸疾患に対する治療開発
 研究課題名（英文） Development of a new therapeutic strategy regulating Delta-Jagged interaction on dendritic cells for inflammatory bowel disease.
 研究代表者
 宇座 徳光（UZA NORIMITSU）
 京都大学・医学研究科・医員
 研究者番号：30447958

研究成果の概要：

樹状細胞の Delta-Jagged の制御を応用した炎症性腸疾患に対する治療開発は未だに行われていない。本研究の結果より、Jagged-1 を強制発現させた樹状細胞の移入によって実験的腸炎モデルにおける腸炎が有意に改善することが示された。Jagged-1 強発現樹状細胞は制御性 T 細胞を誘導し腸炎の改善効果につながるものと考えられた。以上の結果から樹状細胞に発現する Delta, jagged の制御が炎症性腸疾患患者に対する新たな治療法となるものと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000		1,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

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、樹状細胞、Notch シグナル、Delta、Jagged-1

1. 研究開始当初の背景

(1) クロウン病や潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患（IBD）は腸管特異的に炎症が生じ、生涯治療の継続が必要とされる難治性疾患である。本邦において、IBD 疾患患者数は増加の一途をたどっており、これに伴い治療抵抗例や重症例も増加しつつある。その原因については明らかではなく、いまだ根本的治療は確立されてはいない。現在、IBD は自己免疫異常の一種と考えられ、ステロイドおよび免疫抑制剤などの治療が行われる。しかしながら、薬剤による副作用も少なから

ず存在するため、病態に基づいた IBD に対する新規治療開発が望まれている。

(2) IBD の病態に関しては、一定の遺伝背景のもと消化管粘膜に何らかの免疫学的異常が惹起され、その結果腸内細菌などに対する免疫反応異常が生じて、慢性の腸管病変が形成されることが考えられている。実際、遺伝子操作により作製された IBD モデル動物が、無菌状態では腸炎を発症しないこと、およびヒト IBD 患者において抗生物質による治療効果が認められることなどから、腸管内抗原が IBD 発症に重要な役割を果たしていることが推測

されている。こうした点から、申請者らは IBD 患者において、抗原提示細胞の腸内細菌に対する免疫応答の異常が病態に大きく関与しているのではないかと考えてきた。その結果、申請者の所属する研究室では Drug-delivery-system を用いて粘膜局所に存在する抗原提示細胞を標的とした治療方法の開発にとりくみ、実験的腸炎モデルに対する治療効果を証明してきた。

(3) 抗原提示細胞である樹状細胞は生体内で抗原未感作ナイーブ T 細胞を活性化する細胞であり、微生物など外来異物に対する免疫応答だけでなく、自己抗原に対する免疫寛容の成立にかかわっている。つまり、樹状細胞は人の免疫ネットワークにおける自然免疫系および獲得免疫系のいずれにも極めて重要な役割を果たす細胞と考えられている。したがって、樹状細胞は免疫関連疾患の病態形成に深く関与しているものと推測される。従って、IBD の患者においては、抗原提示細胞の腸内細菌に対する免疫監視機構の異常が、病態に大きく関与しているのではないかと考えてきた。

(4) 近年、T 細胞に発現している Notch および抗原提示細胞に発現しているリガンドである Delta, Jagged によるシグナル伝達が T 細胞の分化に重要であることが報告された。Delta は T 細胞を Th1 に分化誘導し、一方 Jagged は Th2 の分化誘導に関わっているとされている。さらに興味深い点として Notch-Jagged-1 による pathway が、免疫制御に重要な制御性 T 細胞を誘導することが示された。現在、抗原提示細胞に Jagged-1 を強制発現させ、制御性 T 細胞を誘導することで、免疫疾患に対する治療開発も試みられている。したがって、IBD 患者腸管局所の樹状細胞における Delta Jagged の発現はその病態に深く関与しているものと想定されるが、この点については未だに検討されてはいない。

2. 研究の目的

自然腸炎発症モデルマウスおよび炎症性腸疾患患者抗原提示細胞を用いて、腸内細菌抗原に対する樹状細胞の Delta Jagged の発現制御機構を解明する。さらに、樹状細胞上の Delta Jagged の発現制御を応用した難治性 IBD 患者に対する新規治療開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) 大腸粘膜内樹状細胞、およびリンパ球の採取：

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、およびクローン病）患者の手術標本、あるいは内視鏡時に大腸粘膜から生検を行い、これらの組織から樹状細胞および粘膜内リンパ球を採取する。

マウスに関しては自然腸炎発症モデルである IL-10 ノックアウトマウス（クローン病類似モデル）および TCR α 受容体ノックアウトマウス（潰瘍性大腸炎類似モデル）を用いる。腸炎の生じている時期に腸管を取り出し、以下のように細胞を抽出する。具体的には採取した腸管組織の内容物を洗浄後、滅菌した PBS により洗浄し、さらに抗生加 RPMI1640 により洗浄を行う。約 5mm 幅に細切した後、10mM dithiothreitol (DTT) を含む 2.5% Hanks-medium 30ml にて 37°C 30 分間振とうする。上記 DTT 処理をもう一度施行した後、2.5% FCS-Hanks にて 2 回洗浄した腸管組織を、0.02% collagenase と 0.01% DNase を含む 2.5% FCS-Hanks 中で 37°C 60 分間振とうする。溶液をナイロンメッシュに通した後、1500rpm、5 分間の遠心にて回収された細胞を用いる。樹状細胞については、MACS カラムを用いて CD3, CD19, CD56 および CD14 の抗体ビーズにより sorting を行い単離する。マウスの場合、樹状細胞は CD11c の抗体ビーズを使用して単離する。同様の方法にて、CD4 陽性細胞を分離した後、CD25 ビーズにて CD4 陽性 CD25 陰性細胞のみを採取する。また、大腸癌にて切除された正常組織からも同様の操作を行い、樹状細胞および粘膜内リンパ球を採取する。

(2) 患者およびマウスからの腸管内抗原抽出 (bacterial lysate)：

上記粘膜内樹状細胞、およびリンパ球を採取したすべての患者から便を採取し、10 μ g/ml DNAase および 0.01M MgCl の含有された RPMI1640 に溶解後、Mini-Bead Beater を用いて 0.1mm のガラスビーズとともに 3 分間ホモジェナイズする。その後、10000 g で 1 分間遠心、上清を 0.45 μ M のフィルターにかける。この bacterial lysate は好気性、嫌気性培養をすることにより、細菌が存在していないことを確認した後、抗原提示細胞を刺激する腸管内抗原として使用する。

(3) 樹状細胞に対する腸管内抗原刺激後の Delta Jagged の発現機構の解明：

採取された樹状細胞 (1×10^6) を (2) で得られた bacterial lysate を 1 から 100 μ g/ml の濃度で刺激を行う。24 時間後、樹状細胞を回収し、RNA および蛋白を抽出する。その後、Real time-PCR 法、および Western blot 法にて Delta, Jagged-1 の発現を評価する。各腸炎マウスについても同様のことを行う。また、TLR2, TLR4, TLR9 KO マウスから樹状細胞を取り出し (1×10^6)、各々の ligand で刺激後、Real time-PCR 法、Western blot 法にて Delta Jagged の発現を評価する。この実験によりいかなる TLR シグナルが Delta Jagged の発現に影響を与えるかを検討する。

(4) Jagged-1 または Delta 強制発現樹状細胞が CD4 陽性 T 細胞に与える影響：

ヒトおよびマウスから単離した樹状細胞 (1×10^6) にこの細胞に Jagged-1 または Delta 発現プラスミドを transfection させる。その後、粘膜内リンパ球 CD4 陽性細胞 1×10^5 と RPMI 中で培養する。3 日、および 5 日間の培養後、上清とリンパ球を各々回収する。培養上清中のサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10) の測定を ELISA で行う。

(5) Jagged-1 または Delta 強制発現樹状細胞による CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞の制御性 T 細胞への誘導 :

Jagged-1 または Delta 強制発現樹状細胞 (1×10^6) を粘膜内リンパ球 CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞 1×10^5 と RPMI 中で培養する。3 日、および 5 日間の培養後、上清とリンパ球を各々回収する。共培養刺激後の FOXP3 および CD25 誘導の検討を行うために、回収したリンパ球から、TRIzol 法にて RNA を抽出する。cDNA を作製後、Real time-PCR 方法にて FOXP3 の発現を検討する。また、フローサイトメトリーにて CD25 の発現の状態を観察する。培養上清中のサイトカイン (IL-4, IFN- γ , IL-10, TGF- β) を ELISA 方法により測定する。

(6) Jagged-1 または Delta 発現の慢性腸炎の病態における役割 :

自然腸炎発症モデルである IL-10 ノックアウトマウス (クローン病類似モデル) および TCR α 受容体ノックアウトマウス (潰瘍性大腸炎類似モデル) から、4 週、8 週、12 週、16 週後ごとに樹状細胞をとりだす。そこで、Jagged-1 または Delta の発現が自然腸炎の発症の程度にどのように関与しているかを検討する。

(7) 炎症性腸疾患における樹状細胞の Jagged-1 Delta 強制発現による免疫監視機構の 制御 :

SJL マウスから骨髄細胞を取り出した後、 2×10^6 /ml に細胞を調整、10% FBS 含有の RPMI で培養しながら、GM-CSF を 7ng 加えることにより、骨髄由来の樹状細胞を作製する。フローサイトメトリーにて CD11c 陽性細胞が 95% であることを確認した後に、この細胞に Jagged-1 発現プラスミドをトランスフェクションさせる。2 日後、Jagged-1 強発現樹状細胞を SJL マウスの腹腔内に注入する。さらにこのマウスにトリニトロベンゼンスルホン酸を誘導することで Th1 反応有意な腸炎を作成する。腸炎誘導後、5 日後にコントロールプラスミド注入群と以下の項目について比較検討する。(1) 腸炎の程度 (2) 腸管内リンパ球を取り出し、サイトカイン産生を ELISA にて測定する。さらに、Delta 発現プラスミドを樹状細胞にトランスフェクションしたマウス群においても同様の実験を行う。

(8) Probiotics が樹状細胞の Jagged-1 Delta

発現に与える影響 :

マウスから抽出された樹状細胞 (1×10^6) に対し、TLR2, TLR4, TLR9 dominant negative plasmid をトランスフェクションする。その 24 時間後に、Probiotics である VSL#3 (各々、1 から $100 \cdot \text{g/ml}$ の濃度とする) を加える。さらに、24 時間後、細胞を回収し、Jagged-1 Delta 発現を PCR 法および Western blot 法にて確認する。

4. 研究成果

(1) 自然腸炎発症モデルである IL-10 ノックアウトマウス (クローン病類似モデル) および TCR α 受容体ノックアウトマウス (潰瘍性大腸炎類似モデル) を用いて、腸管内から樹状細胞を採取し、bacterial lysate を 1 から $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度で刺激を行った。その結果、IL-10 ノックアウトマウスおよび TCR α 受容体ノックアウトマウスから抽出した、いずれの樹状細胞においても Jagged-1 の発現が増強していた。

(2) IL-10 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比して、腸間膜リンパ節における制御性 T 細胞占める割合は有意に高いことが証明された。このことから、IL-10 ノックアウトマウスでは制御性 T 細胞は十分に誘導されているものの、IL-10 産生が認められないために腸炎が発症するものと推測された。TCR α 受容体ノックアウトマウスにおいても、制御性 T 細胞占める割合は有意に高く、しかしながら、IL-10 の産生は十分にみとめられ、このマウスにおける腸炎発症機序は制御性 T 細胞以外の粘膜防御機構にあることが推測された。

(3) さらに、マウスから単離した樹状細胞に Jagged-1 発現プラスミドを transfection させ、粘膜内リンパ球 CD4 陽性細胞と共培養した結果、培養上清中のサイトカインでは Th2 サイトカインである、IL-4, IL-5 および IL-10 産生が有意に増強されることを確認した。

(4) SJL マウスの骨髄細胞から作製した樹状細胞に Jagged-1 発現プラスミドをトランスフェクションし、この細胞を SJL マウスの腹腔内に注入した。さらにこのマウスにトリニトロベンゼンスルホン酸を用いて Th1 反応有意な腸炎を誘導しところ、コントロールプラスミド注入群に比して腸炎の程度は有意に改善していた。それぞれのマウスから腸管内リンパ球を取り出しサイトカイン産生を ELISA にて測定したところ、Jagged-1 強制発現樹状細胞を注入したマウス由来の腸管内リンパ球からの IFN- γ 産生は有意に低下し、IL-10 産生は有意に増加していた。

(5) Jagged-1 強制発現樹状細胞と CD4 陽性 CD25 陰性粘膜内リンパ球を共培養したとこ

る CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞の誘導が可能となった。上記の結果より Jagged-1 発現は粘膜局所における制御性 T 細胞の誘導することにより腸炎が改善することが証明された。以上の結果から、樹状細胞上の Jagged-1 発現制御は IBD 患者に対する新たな治療法として期待が持たれる。今後 Delta 分子についてもさらなる研究を行う方針である。

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 13 件)

1. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Mikami S, Ueno S, Uza N, Chiba T. The effect of proteasome inhibitor MG132 on experimental inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2009;156:172-82. (査読有)
2. Takeda Y, Nakase H, Namba K, Inoue S, Ueno S, Uza N, Chiba T. Upregulation of T-bet and tight junction molecules by *Bifidobacterium longum* improves colonic inflammation of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Jan 22. [Epub ahead of print] (in press) (査読有)
3. Tamaki H, Nakase H, Matsuura M, Inoue S, Mikami S, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Kasahara K, Chiba T. The effect of tacrolimus (FK-506) on Japanese patients with refractory Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2008;43:774-9. (査読有)
4. Matsumura K, Nakase H, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Kasahara K, Ueno S, Uza N, Chiba T. Modulation of the Th1/Th2 balance by infliximab improves hyperthyroidism associated with a flare-up of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Oct 22. [Epub ahead of print] (in press) (査読有)
5. Mikami S, Nakase H, Yamamoto S, Takeda Y, Yoshino T, Kasahara K, Ueno S, Uza N, Oishi S, Fujii N, Nagasawa T, Chiba T. Blockade of CXCL12/CXCR4 axis ameliorates murine experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327:383-92. (査読有)
6. Yamamoto S, Nakase H, Mikami S, Inoue S, Yoshino T, Takeda Y, Kasahara K, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Tamaki H, Matsuura M, Inui K, Chiba T. Long-term effect of tacrolimus therapy in patients with refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28:589-97. (査読有)
7. Yoshino T, Nakase H, Mikami S, Nio M, Ueno S, Uza N, Ohmori K, Manabe T, Chiba T. Importance of diagnosis of concomitant cytomegalovirus infection in patients with intestinal Behçet's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:877-8. (査読有)
8. Uza N, Nakase H, Ueno S, Inoue S, Mikami S, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T. The effect of medical treatment on patients with fistulizing Crohn's disease: a retrospective study. *Intern Med.* 2008;47:193-9. (査読有)
9. Yoshino T, Nakase H, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Ohmori K, Sakurai T, Nagayama S, Hasegawa S, Sakai Y, Chiba T. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1516-21. (査読有)
10. Ueno S, Nakase H, Kasahara K, Uza N, Kitamura H, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Chiba T. Clinical features of Japanese patients with colonic angiodysplasia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:363-6. (査読有)
11. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, Chiba T. Open label trial of clarithromycin therapy in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:984-8. (査読有)
12. Nakase H, Mikami S, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kasahara K, Yoshino T, Takeda Y, Chiba T. Rescue therapy with tacrolimus for a patient with severe ulcerative colitis refractory to combination leukocytapheresis and high-dose corticosteroid therapy. *Intern Med.* 2007;46:717-20. (査読有)
13. Nakase H, Yoshino T, Ueno S, Uza N, Mikami S, Matsuura M, Chiba T. Importance of early detection of cytomegalovirus infection in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:364. (査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 宇座徳光、仲瀬裕志、千葉 勉 実験的腸炎モデルにおけるケモカインSR-PSOX/CXCL16の役割. 第44回日本消化器免疫学会. 平成19年7月9日、東京

〔その他〕

特記事項なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇座 徳光 (UZA NORIMITSU)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号：30447958

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。