

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590750

研究課題名(和文)

クローン病マクロファージの機能解析:オートファジーから見た細菌応答・分化異常

研究課題名(英文)

Defective autophagy system against bacteria in Crohn's macrophages

研究代表者

岡本 晋 (SUSUMU OKAMOTO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70255446

研究成果の概要(和文)：腸管の慢性的な炎症を引き起こすクローン病は、若年者に好発し食事・学業・就業などに大きな影響を及ぼしうることで、患者数が増加していること、などから社会的にも注目を受ける疾患である。根本原因はいまだ不明であるが、本来、腸管内の常在細菌や食餌成分に対しては過剰反応せず、共存状態を保つはずの免疫細胞が異常に活性化して炎症を引き起こすことが想定されている。われわれの研究室では、以前より、特にマクロファージ(貪食細胞)の異常に注目してきたが、今回、腸内細菌を貪食した後のオートファジーという処理システムに異常がある可能性を抗LC3抗体を用い検討した。海外では、大規模な遺伝子解析によりオートファジー関連遺伝子がクローン病の発症に関係するとの報告もあったが、本研究期間内ではヒト検体・動物モデルにおいて、クローン病におけるオートファジー異常は証明しえなかった。現在、レトロウイルスベクターや遺伝子改変マウスを用いた新たな実験系の確立を検討している。

研究成果の概要(英文)：The hypothesis of this study was that intestinal macrophages from Crohn's disease may have defect in autophagy system against intestinal bacteria. I performed immunohistochemistry and western blotting for samples both from human and murine Crohn's inflamed intestine using anti-LC3 antibody. Disappointingly, I could not show any significant difference between normal control and Crohn's specimens in any series of experiments performed in this term. Now I am considering whether other experimental systems such as retroviral vectors or genetically engineered mice may be worth testing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化管免疫

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：クローン病、オートファジー、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患はいまだ根本的な原因が不明であり根治療法がなく、若年を中心に発症数が増加していること、難治例では食事や勤労などの日常生活に大きな制限を受けることから社会的問題にもなっている。しかしながら、これまでの幾多の精力的な研究により、患者の遺伝的素因、食事や腸内細菌などの環境因子、免疫学的側面が複雑に絡み合っていることがわかってきた。我々の研究室でも炎症性腸疾患を主に免疫学的異常の面から多角的に解析し、特に近年ではクローン病患者の単球・マクロファージ系細胞に焦点をあて、これらの細胞の菌体成分や細菌刺激による反応性の異常を報告してきた。すなわち、健常の腸管マクロファージは他臓器マクロファージの「炎症惹起型」性質に対し、細菌刺激に対してむしろ炎症抑制性サイトカインであるIL-10を高産生することから「炎症抑制」型であることを提唱してきた。これは常に腸管内腔に無数の腸内細菌や食餌抗原が存在することを考えれば非常に合目的であると考えられる。しかしながら、クローン病患者のマクロファージは、細菌刺激に対してIL-12, IL-23などの炎症性サイトカインを高産生するため、むしろ「炎症惹起型」に性質を変化させている。この細菌に対する異常反応の原因として、クローン病マクロファージの細胞内での処理異常、特に最近、腸上皮細胞の菌体処理に関与することが報告されたオートファジーに注目した。

本研究の準備中に、海外の研究所より、患者群の統計学的遺伝子解析にて、二つのオートファジー関連遺伝子、ATG16L1ならびにIRGMがクローン病の関連遺伝子として同定されたとする報告がなされ、クローン病とオ

ートファジーは俄かに注目を集めるテーマとなった。

2. 研究の目的

我々はこれまで、健常の腸管マクロファージは他臓器マクロファージの「炎症惹起型」性質に対し、細菌刺激に対してむしろ炎症抑制性サイトカインであるIL-10を高産生することから「炎症抑制」型であることを提唱してきた。しかしながら、クローン病患者のマクロファージやクローン病類似の慢性腸炎を自然発症するIL-10ノックアウトマウス腸管マクロファージは、細菌刺激に対してIL-12, IL-23などの炎症性サイトカインを高産生する。これらのマクロファージにおける炎症性サイトカイン異常産生の機序の一つとして、細菌貪食後の処理過程に異常がある可能性を想定しているが、最近、海外の研究所より二つのオートファジー関連遺伝子、ATG16L1ならびにIRGMがクローン病の関連遺伝子として同定されたとする報告がなされた。オートファジーは飢餓状態における自己蛋白再利用のみならず、多種にわたる細菌の排除にも重要であることが相次いで報告されている。

本研究ではクローン病マクロファージの機能異常を、オートファジーを切り口として検討し、クローン病の病態解明につながる成果を期待するものである。

3. 研究の方法

クローン病マクロファージにおけるオートファジーの機能異常の有無につき以下の実験を行い検討する。

(1) 単球由来マクロファージにおける検討
通常のオートファジー誘導

クローン病患者10名の末梢血よりMACSを用

いて分離した単球 (CD14 陽性細胞) を使用する。対照として潰瘍性大腸炎患者、健常者の単球を用いる。この分離単球を一週間増殖因子 (hrM-CSF 10⁴U/ml) で培養し、マクロファージに分化させた後、以下の方法にてオートファジーを誘導し、Rabbit Anti-LC3 Polyclonal Antibody (MBL または ABR) を用いて免疫染色およびウエスタンブロット法にて検討する。

(i) アミノ酸飢餓; 細胞を Earle's balanced salts solution (EBSS) (Sigma) にて培養する。

(ii) 通常の RPMI/10%FCS 培養液に rapamycin (0.1nM -1000nM) を添加する。

マクロファージ特異的オートファジー誘導法

(i) recombinant human IFN- γ 10⁴-1000U/ml

(ii) LPS 1-1000ng/ml

(iii) LPS 以外の PAMPs による刺激

peptidoglycan および他の TLR2 リガンド Pam3Cys4、さらには flagellin (TLR5), R837 (TLR7/8), CpG (TLR9)

(iv) *Saccharomyces cerevisiae* 由来の Zymosan

(v) 細菌刺激 *E. faecalis*, *E. coli*, *B. vulgatus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, BCG

(2) ヒト腸管切除標本における検討

正常腸管 (大腸癌摘出時の非癌部組織) クロウン病・潰瘍性大腸炎切除標本の炎症部位・非炎症部位におけるオートファジーの動態を LC3 の抗体を用い免疫染色法にて検討した。

(3) 腸炎モデルマウスにおける検討

II と同様のオートファジー実験を下記の3種

類のマウス大腸炎モデルを用いて検討する。

TNBS 免疫大腸炎モデル

これは当研究所で申請者の岡本らが確立したクローン病のマウスモデルである。

(Okamoto et al, A synthetic mimetic of CD4 is able to suppress disease in a rodent model of immune colitis. Eur J Immunol. 1999 Jan;29(1):355) 6-8 週齢の雌性 Balb/c および C57BL/6 マウスを用い、第 1 日、TNP-BSA 1 mg (0.1 ml) を CFA とともに皮下免疫する。第 15 日同量で追加免疫し、第 22 日、肛門より 2 cm まで挿入したポリエチレンチューブから 30%エタノール 0.2 ml に溶解した TNB 10 mg を注腸する。

CD45RBhi CD4 陽性細胞 transfer モデル

Balb/c および C57BL/6 マウスの脾細胞より MACS カラムを用いて CD4 陽性細胞を分離した後、PE 標識抗マウス CD4 抗体と FITC 標識抗マウス CD45RB 抗体で 2 重染色し、FACS sorter を用いて CD45RBhi 分画 (20%) と CD45RBlo 分画 (20%) を回収する。それぞれの分画の細胞 2.5x10⁵ 個を 200 μ l の PBS に suspend し、同系の RAG-2 null マウスに腹腔内投与する。

IL-10 ノックアウト腸炎自然発症モデル

4. 研究成果

(1) 単球由来マクロファージにおける検討

健常人 3 名、クローン病患者 3 名、潰瘍性大腸炎患者 3 名の末梢血より MACS を用いて分離した単球 (CD14 陽性細胞) を hrM-CSF で培養し、マクロファージに分化させ実験に用いた。通常のオートファジー誘導、マクロファージ特異的オートファジー誘導、を行なったが、いずれの方法においても抗 LC-3 抗体を用いた western blot 法では、オートファジーの誘導は確認できるものの、3 間で有意な差は認められなかった。

(2) ヒト腸管切除標本における検討

本邦のクローン病患者由来のマクロファージにおけるオートファジーの機能異常の有無を検討する目的で、正常腸管（大腸癌摘出時の非癌部組織）、クローン病・潰瘍性大腸炎切除標本の炎症部位・非炎症部位におけるオートファジーの動態を LC3 の抗体を用い免疫染色法にて検討した。粘膜固有層のマクロファージに加え、細菌との応答にオートファジーが関与しているとされる上皮細胞にも注目したが、一定の傾向は得られなかった。また、粘膜固有層リンパ球を分離し、さらに CD14 陽性細胞を分離し、ウエスタンブロット法を試みたが、タンパク量の制限の問題とともに、やはり正常腸管・炎症性腸疾患で明らかな差は見出せなかった。

(3) 腸炎モデルマウスにおける検討

クローン病のマウスモデルとして汎用されている TNBS 惹起大腸炎モデルおよび自然腸炎発症モデルである IL-10 ノックアウトマウスを用い、クローン病腸管局所におけるオートファジーの動態を、特にマクロファージを中心に解析することを試みた。TNBS 大腸炎については、以前から報告が見られるように、炎症の惹起にばらつきが大きく、今回も安定したクローン病類似腸管炎症の惹起は困難であった。このため、IL-10 ノックアウトマウスに切り替え、検討を行なった。われわれの研究所においては、SPF 飼育下での IL-10 ノックアウトマウスの自然腸炎発症率は 3 割程度である (Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis. Kamada N et al, *Inflamm Bowel Dis* 2005(5):455-463)。これまでと同様、抗 LC-3 抗体を用いて免疫染色を行なったが、正常腸管と炎症腸管で、マク

ロファージ・上皮ともに染色状態に明らかな差異を見出せなかった。昨年までのヒト検体における検討からも、同抗体では腸管、特にマクロファージにおけるオートファジーの動態を解析することは困難と結論される。

(4) 考察

いずれの実験においても抗 LC-3 抗体の感度・特異性の問題と思われるが、一定の傾向をつかむに至らなかった。現在、ヒト単球にレトロウイルスベクターである GFP-LC3 を導入した *in vitro* および遺伝子操作マウスを用いた *in vivo* の実験系を検討中である。

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4件)

- 1: Mikami Y, Kanai T, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Okazawa A, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Okamoto S, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Hibi T. Competition between colitogenic Th1 and Th17 cells contributes to the amelioration of colitis. *Eur J Immunol.* 2010 Sep;40(9):2409-22.
査読あり
- 2: Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2010 Sep;139(3):882-92, 892.e1-3.
査読あり
- 3: Kobayashi T, Naganuma M, Okamoto S, Hisamatsu T, Inoue N, Ichikawa H, Takayama T, Saito R, Sujino T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Rapid endoscopic improvement is important for 1-year avoidance of colectomy but not for the long-term prognosis in cyclosporine A treatment for ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2010 Nov;45(11):1129-37.
査読あり

4: Naganuma M, Ichikawa H, Inoue N, Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Novel endoscopic activity index is useful for choosing treatment in severe active ulcerative colitis patients. J Gastroenterol. 2010 Sep;45(9):936-43.
査読あり

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 晋 (OKAMOTO SUSUMU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70255446

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし