

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390233

研究課題名（和文） 免疫系リセットによる炎症性腸疾患の画期的根治療法の開発

研究課題名（英文） Permanent cure strategy of inflammatory bowel diseases by inducing immunological reset

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（和文）：

白血病が骨髄移植の恩恵で根治する時代になったが、IBD は良性疾患にも関わらず根治が困難である。我々は IBD 関連腸炎惹起性メモリーT細胞が全身に長期に潜在することを突き止めた。その維持には IL-7 と腸内細菌が必須であることを明らかとしてきた。そのメモリーT細胞には Th17 細胞と Th1 細胞が重要であるが、腸炎生体内で両者は干渉する現象を見つけた。さらに、Th17 細胞と Th1 細胞の発生に Th17 Th1 細胞の経路があることを見出し、我々は alternative Th1 細胞と命名し、この alternative Th1 細胞が classical Th1 細胞よりも腸炎には重要ではないかと提唱していた。さらに、制御性T細胞はこの Th17 Th1 細胞の経路を阻害することで非腸炎状態で Th17 細胞の蓄積という現象を見つけた。

研究成果の概要（英文）：

Despite the advent of an age when “malignant” leukemia is cured by bone marrow transplantation, “benign” inflammatory bowel diseases (IBD) are still intractable lifelong diseases. We showed that immune memory T cells that remember the disease are formed in IBD, and perceiving them as “benign T-cell leukemia”-like lifelong pathology that spreads throughout the body, We demonstrated that interleukin-7 (IL-7) and commensal bacteria are essential as a survival factor for the maintenance and proliferation of colitogenic CD4⁺ memory T cells, in IBD. Although IL-17A is thought to be preferentially produced by T_H17 cells and to play a critical role in autoimmune disease development, it seems to inhibit development of T_H1 cells in some circumstances. Colitogenic T_H1 cells and T_H17 cells seem to interfere with each other *in vivo* under inflammatory conditions. At least in inflammatory conditions, colitogenic T_H1 cells and T_H17 cells are not independently generated; rather the linear sequential developmental pathway from T_H17 to T_H1 cells seems to dominate. Further study is needed to determine whether the classical T_H1 cells directly generated from naïve T cells in an ROR γ t-independent manner are also involved in IBD pathogenesis. The pathway from T_H17/T_H1 cells to alternative T_H1 cells is suppressed by T_{reg} cells, resulting in the accumulation of T_H17 cells by T_{reg} cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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、新規治療法、免疫統御

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。21世紀に突入し、炎症性腸疾患に生物学的製剤の臨床応用が開始され従来の治療法に比べ格段と進歩したが決して根治に至るものではない。しかし、人類は英知を結集して天然痘を克服したように、炎症性腸疾患もいつか必ず根治するという信念のもとに、斬新なアイデアからスーパー新規治療法の開発のゴール達成まで執念する必要がある。今回、我々は炎症性腸疾患の根本は、疾患のプロトタイプを記憶してしまった細胞、すなわち、移動可能な(mobile)腸炎惹起性記憶(メモリー)T細胞が生涯にわたって全身に播種した病態であるという独自の仮説(Kanai T, et al. Review Article Inflamm Bowel Dis [in press])に立脚し、記憶を‘悪性’から‘良性’へとコンバートする免疫学的メカニズムを明らかにし、炎症性腸疾患の根治につながる基盤的研究に挑戦する。

2. 研究の目的

実施期間内に以下の項目について追求したい。(1) 腸炎惹起性メモリーT細胞の生体維持機構の解明(2) 腸炎惹起性メモリーT細胞の加齢現象と緩解の関連性(3) 血液幹細胞移植による免疫系のリセットによるIBD治療。従来から炎症性腸疾患は小腸や大腸を侵す腸に限局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康状態にリセットされたとしても、ほぼ100%の患者で術後に手術前と同一の疾患、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。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仮説している。重要なことは、脳の記憶システムと異なり、免疫の記憶システムは移動可能な

(mobile)免疫記憶リンパ球によって成立することである。

したがって、腸炎責任免疫記憶T細胞は白血球細胞であることから白血球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 2007)。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. Review Article. Expert Opin on Biol Ther)。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、我々は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-octylphenylethyl}-1,3-propanediol; Fingolimod)が炎症性腸疾患モデルにおいて有効であると報告している(Fujii R, Kanai T, et al. Am J Physiol. Gastroent. Liver 2004. Fujii T, Kanai T, et al. Eyr J Immunol [in press])。具体的に本基盤研究プロジェクトにおいて以下のことを明らかとしたい。

(1) 腸炎惹起性メモリーT細胞の生体維持機構の解明

腸内細菌の存在が慢性大腸炎の発症・維持機構に必須と考えられているが、腸内細菌の抗原、Toll-like受容体リガンド、あるいは未知分子が必須であるかは未だ不明であり、この疑問を明らかとしたい。また、我々が世界に先駆けて見出した腸炎惹起性メモリーCD4 T細胞の生存に必須とされるサイトカインIL-7(Totsuka T, Kanai T, et al. J. Immunol. 2007, Tomita T, Kanai T, et al. J Immunol. 2008)と腸内細菌との関連に関しても追求したい。

(2) 腸炎惹起性メモリーT細胞の加齢現象と緩解の関連性

炎症性腸疾患は若年に発症し生涯疾患が継続することはよく知られているが、発症20年以上を経過した高齢者炎症性腸疾患患者ではその病勢が抑制されることを経験する。

興味深いことに、脳の記憶は同一の記憶であっても、生体は経時的に異なった感受性を示すことがある。若い古い記憶は、数十年後には良い記憶として変化することがある。免疫記憶は特異抗原を記憶する。この特異抗原が変わることは決してない。同一抗原を認識する T 細胞には、Th1, Th2, Th17 細胞、免疫を負に制御する制御性 T 細胞と種々のタイプが存在する。我々は Th1 あるいは Th17 タイプの病的と決めつけている腸炎惹起性記憶 T 細胞を再考し、人為的に *in vitro*, *in vivo* 両面において、病的細胞から抑制細胞へのコンバートのメカニズムを明らかにし、炎症性腸疾患の根治を目指した基盤研究としたい。この臨床的現象は免疫学的加齢メカニズムが深く関与することを想定し、このメカニズムを明らかにすることで、免疫学的加齢現象を逆に促進するという斬新なアイデアのもとに治療法の開発を試みる。

(3) 血液幹細胞移植による免疫系のリセットによる IBD 治療

我々のグループは世界に先駆けて、腸炎惹起性記憶 T 細胞が全身に播種していることを証明してきた (Tomita, T, Kanai T, et al. *Inflam Bow Dis* [in press])。すでに、難治性炎症性腸疾患患者において骨髄移植が欧米で少数試行されている。しかし、骨髄幹細胞による修復プロセスについてはまったく詳細は明らかとされていない。すなわち、骨髄の血液幹細胞、間葉系幹細胞のいずれが腸炎根治に必須な抑制機能を発揮するかは極めて重要な研究課題であり、本研究パートで明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 腸炎惹起性メモリー T 細胞の生体維持機構の解明

これまでに我々の研究グループは腸炎惹起性メモリー T 細胞が腸内細菌存在下で CD4+CD45RB^{high} T 細胞移入慢性大腸炎マウスの炎症局所ばかりではなく、骨髄を含む全身に潜在することを証明した。さらに、腸炎惹起性メモリー T 細胞の維持に腸内細菌と IL-7 いずれも必須であることを明らかとした

(2, 19, manuscript in submission)。しかし、驚くべきことに、腸管 IL-7 は慢性大腸炎発症・維持には必須ではなく、骨髄を含む全身性の IL-7 が必須であることを示した。以上の実績から、我々は腸炎惹起性メモリー T 細胞の維持には腸粘膜、腸管外での維持機構がそれぞれ腸内細菌、IL-7 と異時性、異所性に制御されているという概念を提唱した。

本プロジェクトでは我々の仮説が臨床的事実といかに関与するのかについても追求するとともに確実な立証を行なう。

腸管 IL-7 が不要であることと炎症性腸疾

患維持との関連の追及

我々はサイトカイン例えば IL-2 と抗原刺激の同時存在下に発生する

Acitivation-induced cell death(AICD)という免疫学的現象に注目する。すなわち、これまでの研究成果から慢性大腸炎維持には腸管 IL-7 欠乏自体が必要であるのではないかという逆転の発想で、腸管粘膜内腸炎惹起性メモリー T 細胞が *in vitro* にて腸内細菌抗原の同時刺激によって細胞死を誘導するか否かを追求する。本仮説は、健常人において、約 10¹⁴ 個の腸内細菌と一層の腸管上皮細胞を隔てて対峙する生体にとって恒常的に病的リンパ球の排除という腸管免疫恒常性の維持メカニズムとリンクする重要課題と考える。

IL-7 を産生する皮膚、肝臓と炎症性腸疾患腸管合併症との関連の追及

炎症性腸疾患にはしばしば、腸管外合併症として、皮膚炎、骨粗鬆症、自己免疫肝臓疾患を合併することは広く知られているが、一方、全身性エリテマトーデスなど典型的な膠原病の合併はまれである。さらに興味深いことに、炎症性腸疾患の腸管外合併症が発症する部位(皮膚、骨、肝臓など)はすべて IL-7 を産生することで知られていることに着眼した。すなわち、これらの腸管外合併症が腸炎惹起性メモリー細胞の IL-7 依存的迷入に起因するという仮説をたて、以下の実験を実施する。a) CD4+CD45RB^{high} T 細胞移入慢性大腸炎マウスの皮膚および肝臓より CD4+ T 細胞を分離し、性状解析をおこない、さらに、分離した細胞を新規 RAG-2 欠損マウスへ再移入し、腸炎および腸管外合併症の発症有無について検討する。さらに、皮膚に対しては腸内細菌抗原+アジュバント皮下注、肝臓に対しては Concanavarin A 静脈注を行い、腸管外合併症発症の促進を行い、同様の検討をおこなう。b) 一方、炎症性腸疾患には膠原病を合併は少ないことの免疫学的機序として、図 3 に示すように、生体は腸内細菌抗原または自己抗原に反応するリンパ球は生体に恒常的な競合が存在すると仮説した。そこで、CD4+CD45RB^{high} T 細胞移入慢性大腸炎マウス(Ly5.1 由来リンパ球で作製)および SLE モデル *lpr/lpr* マウス(Ly5.2 由来)のリンパ節から分離した CD4+ T 細胞を分離し、新規 RAG-2 欠損マウスへ共移入を行なうことで明らかとする。

(2) 腸炎惹起性メモリー T 細胞の加齢現象と緩解の関連性

すでにこれまでの準備段階の実験にて、CD4+CD45RB^{high} T 細胞移入慢性大腸炎マウスより分離した腸炎粘膜内 CD4+ T 細胞を新規 SCID マウスに移入し再び発症した腸炎粘膜内 CD4+ T 細胞の再移入を繰り返す *in vivo* 系において、6 世代以降(総計 2 年以上)に

なると、腸炎の減弱、発症期の延長、発症率の減少を認めることを報告した。重要な事実として、未発症マウスから分離した CD4+ T 細胞を新たに分離した CD4+CD45RBhigh T 細胞と新規 SCID マウスへ共移入すると腸炎の発症を抑制することを明らかとした。さらに、未発症マウス CD4+ T 細胞には抑制性共刺激分子 PD-1 を強く発現していることを見出した。以上の準備研究での事実から、腸炎惹起性メモリーT細胞は生体において免疫学的加齢過程で抑制性メモリーT細胞へコンバージョンし得ることを示した。そこで、本研究プロジェクトでは、PD-1 遺伝子導入による腸炎惹起性メモリーT細胞から抑制性メモリーT細胞へコンバージョンを目指したリプログラミングに挑戦する。

(3)血液幹細胞移植による免疫系のリセットによる IBD 治療

我々のこれまでの検討では、炎症性腸疾患は腸管の疾患ではなく、腸炎惹起性メモリーT細胞が全身に播種した良性白血病様病態とする仮説に基づき、炎症性腸疾患の安全に根治を目指す基盤的検討を実施する。実際、我々は準備研究として、これまで根治が困難とされてきた CD4+CD45RBhigh T 細胞移入慢性大腸炎モデルを正常マウスとのパラピオース（並体結合）手術により腸炎は手術後 3 週間という短期間で根治する。本事実、骨髄移植による炎症性腸疾患の根治性の根拠となる基礎検討である。本プロジェクトでは、パラピオース手術による根治の過程で、いかなる免疫担当細胞が抑制的に腸管に援軍として機能しているかを、さらには、いかなる過程で腸炎マウスの骨髄、胸腺が免疫系を再構築するかを Ly5.1/Ly5.2 系を用いて検討する。さらに、実際にマウス末梢から分離した CD34+細胞による移植による根治療法の基盤研究に着手する。

4 . 研究成果

白血病が骨髄移植の恩恵で根治する時代になったが、IBD は良性疾患にも関わらず根治が困難である。我々は IBD 関連腸炎惹起性メモリーT細胞が全身に長期に潜在することを突き止めた。その維持には IL-7 と腸内細菌が必須であることを明らかとしてきた (J Immunol 2011)。そのメモリーT細胞には Th17 細胞と Th1 細胞が重要であるが、腸炎生体内で両者は干渉する現象を見つけた (Eur J Immunol 2011)。さらに、Th17 細胞と Th1 細胞の発生に Th17 Th1 細胞の経路があることを見出し、我々は alternative Th1 細胞と命名し、この alternative Th1 細胞が classical Th1 細胞よりも腸炎には重要ではないかと提唱していた (Gastroenterology 2011, Mucosal Immunol 2012)。さらに、制御性 T 細胞はこの Th17 Th1 細胞の経路を阻害する

ことで非腸炎状態で Th17 細胞の蓄積という現象を見つけた。

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 17 件)

Nakamoto N, Kanai T, et al. (他 8 名、3 番目) CCR9+ macrophages are required for acute liver inflammation in mouse models of hepatitis.

Gastroenterology 査読有 142 : 2012 P366-376

Kanai T, et al. (他 5 名、1 番目) ROR γ t-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation.

Mucosal Immunology 査読有 2012 In press

Saeki K, Kanai T, et al. (他 12 名、2 番目) CCL2-Induced Migration and SOCS3-Mediated Activation of Macrophages Are Involved in Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice.

Gastroenterology 査読有 142 : 2012 P1010-1020

Takada Y, Kanai T, et al. (他 14 名、12 番目) Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset.

J Immunol. 査読有 184:2011 P2671-2676

Sujino T, Kanai T, et al. (他 11 名、2 番目) Regulatory T cells suppress development of colitis, blocking differentiation of T helper 17 into alternative T helper 1 cells.

Gastroenterology 査読有 141 : 2011 P1014-1023

Shinohara T, Kanai T, et al. (他 8 名、3 番目) Upregulated IL-7 receptor (alpha) expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis.

J Immunol 査読有 186 : 2011 P2623-2632

Takayama T, Kanai T, et al. (他 11 名、12 番目). Imbalance of NKp44(+)/NKp46(-) and NKp44(-)/NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 査読有 139 : 2010 P882-892

Ojiro K, Kanai T, et al. (他 12 名、13 番目) MyD88-dependent pathway accelerates the liver damage of Concanavalin A-induced hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 399 : 2010 P744-749

Mikami Y, Kanai T, et al. (他 12 名、2 番目) Competition between colitogenic Th1 and Th17 cells contributes to the amelioration of colitis. *Eur J Immunol.* 査読有 40 : 2010 P2409-2422

Onizawa M, Kanai T, et al. (他 11 名、3 番目) Signaling pathway via TNF /NF B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 査読有 296 : 2009 PG850-859

Okamoto R, Kanai T, et al. (他 6 名、5 番目) Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 査読有 296 : 2009 PG23-35

Tomita T, Kanai T, et al. (他 8 名、2 番目) IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4+ memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol.* 査読有 39 : 2009 2737-2747

Kanai T et al. (他 5 名、1 番目) Persistent retention of colitogenic CD4+ memory T cells causes inflammatory bowel diseases to become intractable. *Inflamm Bowel Dis.* 査読有 15 : 2009 P926-934

Nemoto Y, Kanai T, et al. (他 10 名、2 番目) Long-lived colitogenic CD4+ memory T cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis. *J Immunol.* 査読有 183 : 2009 P5059-5068

Totsuka T, Kanai T, et al. (他 10 名、2 番目) RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+CD25+ regulatory T cells in chronic colitis. *J Immunol.* 査読有 182 : 2009 P6079-6087

Kanai T, et al. (他 5 名、1 番目) 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.* 査読有 22 : 2009 P306-313

Kamada N, Kanai T, et al. (他 10 名、1 番目) Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. *J Immunol.* 査読有 183 : 2009 P1724-1731

[学会発表](計9件)

金井隆典

免疫記憶と免疫加齢からみた IBD 粘膜免疫の病態 小児 IBD へのヒント 第 38 回日本小児栄養消化器内科肝臓学会 2011 年 10 月 8 日 岩手県

金井隆典

腸管慢性炎症性疾患における Treg, Th17, Th17/Th1, Th1 細胞の産生誘導、競合性、可塑性に関する総括的検討 第 39 回日本臨床免疫学会総会 2011 年 9 月 16 日 東京

金井隆典

わが国の炎症性腸疾患の疫学、病因、病態の最新情報 第 140 回日本医学会 2011 年 6 月 9 日 東京

金井隆典、松岡克義、岡本晋

炎症性腸疾患における生物学的製剤による治療法の進歩 Infliximab 計画的維持投与とクローン病症例からみた長期治療効果の検討 日本消化器病学会 2010 年 10 月 5 日 東京

金井隆典、松岡克義、岡本晋

炎症性腸疾患における生物学的製剤による治療法の進歩 Infliximab 計画的維持投与とクローン病症例からみた長期治療効果の検討 日本消化器病学会 2010 年 10 月 5 日 東京

根本泰宏、金井隆典、松本敏、渡辺守

Long-lived Colitogenic CD4+ Memory T Cells can be Maintained Outside the Intestine in the Absence of Commensal Bacteria Japan & US Collaboration Conference 2009 年 11 月 20 日 東京

根本泰宏、金井隆典、渡辺守
腸肉細菌から直接的自然免疫と抗原刺激を受ける炎症性腸疾患メモリ CD4+T 細胞の維持機構
日本消化器病学会 2009年10月15日東京

根本泰宏、金井隆典、渡辺守
炎症性腸疾患治療標的としての IL-7 高産生細胞の同定
日本消化器免疫学会総会 2009年7月24日松山市

根本泰宏、金井隆典、渡辺守
Long-lived Colitogenic CD4+ Memory T Cells Residing Outside the Intestine Participate in the Perpetuation of Chronic Colitis
International Congress of Mucosal Immunology 2009年7月7日ボストン

〔図書〕(計1件)
金井隆典、他 診断と治療社：クローン病 新しい診断と治療 2011 2018

〔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
<http://www.keio-med.jp/gastro/>

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

なし

(3) 連携研究者

なし