

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590806

研究課題名（和文） NKT細胞を標的とした潰瘍性大腸炎新規治療法の開発

研究課題名（英文） Novel therapeutic strategy for ulcerative colitis by targeting NKT cells

研究代表者

長堀 正和 (NAGAHORI MASAKAZU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60420254

研究成果の概要（和文）：

本研究は申請者らが独自に研究を展開してきた CD1d 分子を介した NKT 細胞の機能調節に注目し、潰瘍性大腸炎の病態における免疫学的影響と新規治療標的としての可能性について着目している。その結果、本研究では当該研究期間において主に以下のような成果が得られた。1) 抗 CD1d 抗体を用いた免疫沈降による生化学的解析結果からは、腸上皮細胞において CD1d と MTP は互いに会合していること、そして細胞表面の CD1d の発現量が著しく低下していることが示唆された。2) MODE-K を用いた実験における MTP 特異的阻害剤添加や特異的 siRNA の導入によって、もしくは腸上皮特異的 MTP 欠損マウスにおいて MTP 発現は抑制されていることが mRNA レベルおよび蛋白質レベルで確認され、このとき共焦点顕微鏡下では細胞表面に発現する CD1d が減少し小胞体付近の核近傍などの細胞内に限局することが観察された。3) 腸上皮特異的 MTP 欠損マウスに NKT 細胞誘導性の実験腸炎を誘発したとき、それが著しく軽快することが臨床的、また病理組織学的に示唆された。これらの研究結果は MTP が小胞体における CD1d の脂質化と、その後の細胞内膜輸送に深く関与する事実、そして MTP の発現調節が最終的に NKT 細胞の機能を調節し得る可能性を暗示するものと思われる。さらにこの分子が炎症性腸疾患の病態においてその治療標的になりうることが示唆され、今後の研究成果が期待されるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：

Background and Aims: Inflammatory Bowel Disease (IBD) is characterized by unrestrained lymphocyte activation that results in the production of a variety of pro-inflammatory cytokines and other mediators. Understanding the mechanisms of lymphocyte regulation is therefore of significant importance to dysregulated mucosal inflammation in IBD. It has been reported that natural killer T (NKT) cells express pro-inflammatory cytokine such as IL-13 in the colonic tissues of patients with ulcerative colitis (UC). CD1d is a major histocompatibility complex class I-related molecule that functions in the presentation of glycolipid antigens to invariant (i) NKT cells. The mechanism(s) by which CD1d acquires glycolipid antigens for presentation to such cells is however unknown. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP), encoded by the *Mtpp* gene, is an endoplasmic reticulum resident protein expressed by intestinal epithelial cells (IEC) which is essential for the lipidation of apolipoprotein-B. The aim of this study was to demonstrate whether MTP also regulates CD1d-restricted antigen presentation by these cells. **Materials and Methods:** Protein lysates of intestinal epithelia from wild type (WT) C57BL/6 (B6) mice were immunoprecipitated with an anti-CD1d monoclonal antibody (mAb) and probed by Western blotting with an anti-MTP mAb to investigate CD1d and MTP interactions. Fresh cryosections of colons from the intestinal epithelia-specific MTP deficient mice or the murine IEC line, MODE-K, transfected with siRNA oligomers to silence *Mtpp* gene expression were stained with an anti-CD1d mAb to assess the distribution of CD1d expression. WT B6 or the MTP deficient mice were subjected to oxazolone-induced colitis and examined for clinical and pathological changes. **Results:** A direct biochemical association was observed between CD1d and MTP in intestinal epithelia. Confocal

microscopy showed that conditional deletion of *Mtpp* *in vivo* and gene silencing of *Mtpp* in MODE-K cells caused a redistribution of CD1d expression in the epithelia. Conditional deletion of the *Mtpp* gene *in vivo* provided protection from oxazolone-induced colitis, which is iNKT cell-mediated animal model. These studies showed that MTP, a lipid transfer protein, regulates CD1d function suggesting that blockade of MTP function may be a novel mechanism to treat NKT cell-mediated disorders such as ulcerative colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学（内科系臨床医学）

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、粘膜免疫、新規治療法、NKT細胞

1. 研究開始当初の背景

難治性の潰瘍性大腸炎はTh2型の炎症を主たる病態とする炎症性腸疾患(IBD)であり、発症後の患者は再燃と緩解を繰り返して生涯にわたる治療継続を余儀なくされる。これまで多くの症例に対しステロイドや免疫抑制剤による治療が施されてきた。しかしそれに対する抵抗例、およびその副作用による長期投与の限界や長期経過例の急増傾向から、副作用とQOLを考慮しつつ病態特異性に着目した新規治療法の開発が期待されている。一方、通常は正常腸管粘膜にほとんど存在しないはずのIL-13産生性NKT細胞が潰瘍性大腸炎の病変局所に多く浸潤し、この細胞集団が特異な病態を形成していることが近年報告された(J Clin Invest 2004)。これに先立ち我々も以前から、腸内細菌由来の分子によってヒトおよびマウスの腸上皮細胞におけるCD1dの発現調節がなされることを見出していた(Colgan, Nagaishi, et al. J Clin Invest 2003)。この発見に端を発し、腸上皮に多く発現するmicrosomal triglyceride transfer protein (MTP)を調節することでCD1dを介したNKT細胞の制御をすることができ、潰瘍性大腸炎のような腸管局所におけるTh2型の炎症に対する治療標的となることを見出した(Nagaishi, et al. Nat Med 2004)。すなわち活性化NKT細胞による特異的な獲得免疫反応の制御を標的にすることによって、潰瘍性大腸炎に対する疾患特異性の高い治療法が期待できると我々は確信している。

2. 研究の目的

こうした背景から我々は近年の潰瘍性大腸炎治療の進歩と併存する問題点に着目し、特定の獲得免疫反応を標的とした新規治療法開発の意義を提案する。すなわち本研究ではこれまで申請者らの蓄積してきた獲得免疫反応やIBDモデル、さらに腸上皮細胞の再生、分化など独自の研究成果や臨床経験を礎としつつ、潰瘍性大腸炎の特殊な病態メカニズムに対する新規治療法の開発戦略を展開する。

3. 研究の方法

(1) 腸上皮細胞特異的なMTP阻害療法の基礎解析

A) 腸上皮細胞に対するMTP阻害剤のCD1d機能調節の解析

マウス腸上皮細胞株CT26細胞もしくはMODE-K細胞をMTP阻害剤(Bristol-Myers Squibb社)存在下で培養し、CD1dの細胞内局在を共焦点顕微鏡下で観察する。また糖脂質抗原α-galactosilceramideやMTP阻害剤の存在下で培養したこれらの細胞の蛋白質試料を用いて、MTPとCD1dや抗原物質との生化学的会合を解析する。さらに糖脂質抗原の存在下でinvariant NKT細胞株と混合培養し、サイトカイン産生や増殖活性を測定する。

B) MTP阻害剤のin vivoにおけるCD1d/NKT

細胞機能調節の解析

野生型C57BL/6マウスにMTP阻害剤を腹腔内投与、経口もしくは注腸投与し、脾臓、肝臓、腸間膜リンパ節、粘膜下層リンパ球、ならびに腸上皮細胞など全身的な影響について解析し、その効果とともに安全性についても確認する。特にここではMTP阻害剤による細胞内膜輸送などに関する想定外の細胞機能異常の発生などの有無を確認する。つぎにこの阻害剤とともにOxazoloneの投与によるTh2型ハプテン誘発性実験腸炎モデルやTCR α 欠損マウスにおける自然誘発性慢性大腸炎モデルを作製し、*in vivo*におけるNKT細胞機能への影響および病理組織学的変化について評価を行う。

C) 腸上皮細胞におけるMTP遺伝子発現抑制による細胞機能への影響の解析

CT26細胞もしくはMODE-K細胞にsiRNAを導入することによってMTP遺伝子の発現を特異的に抑制したのちに、 α -galactosylceramideの存在下で培養する。これらの細胞の蛋白質試料を用いて、まずはMTPの発現レベルをRT-PCRおよびWestern blot法で確認する。この実験系におけるMTPのdown regulationを確認したのち、上記と同様の生化学的、細胞生物学的解析を行う。ここでは特にMTP阻害剤使用時と比較して、同等の効果が得られるか検討を行う。

D) 腸上皮特異的なMTP欠損モデルの作製とその解析、およびMTP遺伝子治療の検討

レトロウイルスベクターGFP-RVにMTP遺伝子に特異的なshRNAを挿入する。この挿入部位の下流にIRESを挟んでGFPが挿入されており、MTPの発現抑制をGFPで確認することができる。野生型(WT) C57BL/6マウスにこのウイルスを経腸的に感染させ、大腸組織中のGFP発現を確認する。この感染マウスから単離したNKT細胞の活性を測定する。またこのマウスに実験腸炎を誘発し、*in vivo*における効果について解析する。またここではMTP阻害剤と同様の効果が得られるかを確認するとともに、B)で副作用が確認された場合はこの実験系でそれが回避されるか否かを検討する。さらにウイルスの感染効率が良好でない場合を想定し、腸上皮特異的なMTP欠損マウスを作製する。Blumberg教授の協力によりMTP^{fl α} マウスを入手する予定であり、我々が既に所有しているT3b-Creトランスジェニックマウスと交配する。このマウスを用

いて実験腸炎など上記と同様の研究を行う。

(2) 幹細胞由来腸上皮前駆細胞を応用した細胞治療の開発基盤樹立

A) 腸上皮細胞を用いた MTP/CD1d 関連遺伝子の網羅的解析

阻害剤または siRNA で MTP 発現や CD1d 機能を抑制した腸上皮細胞株、もしくは MTP 欠損マウスの大腸上皮から mRNA を抽出し、アミノアリル dUTP を用いた *in vitro* transcription を含む行程を用いて蛍光ラベルした cRNA probe を作製する。これを用いて mRNA 発現パターンを RNA マイクロアレイ解析により比較解析し、発現上昇する MTP 関連遺伝子群を網羅的に同定する。

B) 実験腸炎モデルによる治療標的関連遺伝子の選択

実験腸炎を誘発したマウスの末梢血から幹細胞を単離し *in vitro* で腸上皮細胞への分化を誘導する。この上皮前駆細胞に上記 A) の網羅的解析によって抽出された遺伝子群の各々に特異的な shRNA を挿入した GFP-RV を感染させ、MTP ならびに CD1d の発現に与える影響を評価する。次にこれらの感染上皮前駆細胞を再び腸炎を発症したマウスに移入し、数週間後に大腸組織を採取して上皮内に移行した GFP 陽性細胞の存在を確認する。さらに免疫組織化学染色法を行い、GFP 発現と一致して MTP や CD1d の発現が上皮細胞内で低下しているか確認する。

(3) NKT 細胞選択的除去療法の技術基盤の樹立

A) invariant NKT細胞高親和性ビーズの作製とその特異性の確認

潰瘍性大腸炎における病態の中核となる NKT 細胞を標的とした新規治療の開発基盤の第一歩として、本邦で既に認可されている白血球除去療法の技術を応用し、NKT 細胞自体を直接除去することが実用化の最短距離と思われる。そこで本研究では初期段階としてそのビーズの作製を行う。CD1d 分子の細胞外ドメインをコードする遺伝子を CHO 細胞株に導入後、培養上清から精製した CD1d 蛋白質をビオチン化しアビジン分子と反応させてテトラマーを作製する。さらにこれを high-performance affinity ビーズに結合させ、NKT 細胞高親和性ビーズ(CD1-HPB)を作成する。これと健常ボランティアから採取した末梢血を反応させ、ビーズに結合した細胞や反応後の血液中に含まれる細胞の FACS 解析

を行い、NKT 細胞に対する親和性や特異性などを確認する。また同手法で invariant TCR 鎖遺伝子を精製することによって invariant TCR ビーズ(iTCR-HPB)も同様に作製し、CD1 発現性抗原提示細胞を標的とした治療法の可能性についても同時に検討する。

4. 研究成果

本研究は申請者らが独自に研究を展開してきた CD1d 分子を介した NKT 細胞の機能調節に注目し、潰瘍性大腸炎の病態における免疫学的影響と新規治療標的としての可能性について着目している。その結果、本研究では当該研究期間に以下のような成果が得られた。

1) マウス腸上皮細胞株 MODE-K を用いた実験では、MTP の阻害剤による機能抑制によって細胞表面に発現する CD1 d が減少し、小胞体付近の核近傍などの細胞内に限局することが観察された。2) また MTP 阻害剤を投与したマウスにおいて、特に重篤な副作用を呈する傾向は認められず、骨髄、脾臓、末梢リンパ節や腸管粘膜局所における T 細胞、B 細胞などの一般の免疫担当細胞に大きな変化を誘導しないことが確認された。3) さらに抗 CD1 d 抗体を用いた免疫沈降による生化学的解析結果からは、腸上皮細胞において CD1 d と MTP は互いに会合していること、そして細胞表面の CD1 d の発現量が著しく低下していることが示唆された。4) MODE-K を用いた実験では、MTP 特異的 siRNA の導入によって MTP の発現抑制が誘導されることが mRNA レベルおよび蛋白質レベルで確認された。5) そしてこのとき共焦点顕微鏡下で観察すると、細胞表面に発現する CD1 d が減少し小胞体付近の核近傍などの細胞内に限局することが、MTP 阻害剤による実験と同様に観察された。6) また siRNA の導入による MTP の発現抑制によって、MODE-K 細胞の MHC クラス II 分子の発現レベル、そしてその局在は影響されないことが確認された。7) Blumberg 教授の協力によって腸上皮特異的 MTP 欠損マウスの作製に成功した。このマウスにおいて大腸上皮特異的に MTP の発現抑制が誘導されることが mRNA レベルおよび蛋白質レベルで確認された。8) そしてこのマウスの腸管上皮を共焦点顕微鏡下で観察すると、細胞表面に発現する CD1 d が減少し小胞体付近の核近傍などの細胞内に限局することが、*in vitro* における実験と同様に観察された。9) またこのマウスの腸管上皮における MTP の発

現抑制によって、細胞の MHC クラス II 分子の発現レベル、そしてその局在は影響されないことが確認された。10) さらに NKT 細胞誘導性の実験腸炎を誘発したとき、腸上皮細胞において MTP が欠損するとそれが著しく軽快することが臨床的、また病理組織学的に示唆された。

これらの研究結果は MTP が小胞体における CD1 d の脂質化と、その後の細胞内膜輸送に深く関与する事実、そして MTP の発現調節が最終的に NKT 細胞の機能を調節し得る可能性を暗示するものと思われる。さらにこの分子が炎症性腸疾患の病態においてその治療標的になりうることが示唆され、今後の研究成果が期待されるものと思われる。

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)

(英文)

1. Yui S, Nakamura T, Nagaishi T, Okamoto R, Watanabe M et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5+ stem cell. **Nat Med** 18;618-623, 2012 査読有
2. Mizutani T, Nakamura T, Nagaishi T, Okamoto R, Watanabe M et al. Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured *in vitro*. **Biochem Biophys Res Commun** 419; 238-243, 2012 査読有
3. Nagaishi T, Yamaji O, Okamoto R, Watanabe M et al. The development of colitogenic CD4+ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with natural killer cell function in a murine model of colitis. **J Immunol** 188; 2524-2536, 2012 査読有
4. Hyun SB, Nagahori M, Araki A, Watanabe M et al. Magnetic resonance enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis** 11; 1063-1072, 2011 査読有
5. Watanabe T, Nagahori M, Watanabe M et al. Target biopsy or step biopsy? Optimal surveillance for ulcerative colitis: a Japanese nationwide randomized controlled trial. **J Gastroenterol** 46;11-16, 2011 査読有
6. Takamiya R, Nagaishi T, et al. High-mobility group box 1 contributes to lethality of endotoxemia in heme oxygenase-1 deficient mice. **Am J Respir Cell**

- Mol Biol** 41;129-135, 2009 査読有
7. Kuo T, Nagaishi T, et al. N-glycan moieties in FcRn determine steady-state membrane distribution and directional transport of IgG. **J Biol Chem** 284;8292-8300, 2009 査読有
 8. Nagaishi T, Onizawa M, Okamoto R, Watanabe M, et al. Signaling pathway via TNF α /NF κ B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 296;G850-G859, 2009 査読有
(邦文)
 9. 鈴木雅博、永石宇司、渡辺守. ここまでわかった自己免疫疾患 - Crohn病・潰瘍性大腸炎. 臨床検査 臨時増刊号 55 (11);1258-1264, 2011 査読無
 10. 永石宇司、渡辺守. 分泌メディエーターはヒトマクロファージにおける Nod2 誘導性寛容を調節する. **Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology** 6 (2);12-16, 2011 査読無
 11. 永石宇司、山地統、渡辺守. 腹部症状発現メカニズム解明への臨床的アプローチ: 腸内細菌、炎症と腹部症状. **Modern Physician** 31: 310-313, 2011 査読無
 12. 永石宇司. CEACAM1 によるシグナル伝達. **分子消化器病** 6;173-177, 2009 査読無
 13. 永石宇司、渡辺守. ヒスチジン栄養療法はマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制して腸炎モデルを改善させる. **Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology** 4 (2);42-45, 2009 査読無

[学会発表] (計 19 件)
(国際学会)

1. Nagahori M. Patient preferences in the choice of anti-TNF treatments in inflammatory bowel diseases. **Advances in Inflammatory Bowel Diseases- Crohn's & Colitis Foundation of America Clinical & Research Conference**. 2011.12.2. マイアミ
2. Naganuma M, Watanabe M et al. Serological test and vaccinations for Measles, Mumps, Rubella, and Varicella Zoster deserve considerations as early as possible after diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. **UEGW** 2011.10.25. ストックホルム
3. Nagaishi T, Yamaji O, Watanabe M, et al. Natural killer cells suppress a murine model of colitis by targeting the early stage of T cell development. **国際粘膜免疫学会議**. 2011. 7. 7. パリ
4. Yui S, Nakamura T, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Regeneration of damaged colonic tissue by transplanted colonic epithelial stem cells maintained and expanded in vitro. **GI Research Academy**. 2011.6.17. 京都
5. Yui S, Nakamura T, Nagaishi T, Okamoto R, Watanabe M, et al. Regeneration of damaged colonic tissue by transplantation of colonic epithelial stem cells maintained and expanded in vitro. **アメリカ消化器病学会**. 2011.5.7. シカゴ
6. Yamaji Y, Nagaishi T, Watanabe M, et al. NK cells regulate CD62L⁺CD44⁻ T cell subset in the development of pathogenic T cells in a murine model of colitis. **アメリカ消化器病学会**. 2011.5.7. シカゴ
7. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. TNF- α /NF- κ B pathways in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **The 4th Japan and US Collaboration Conference in Gastroenterology**. 2010.11.18. 東京
8. Yui S, Nagaishi T, Okamoto R, Watanabe M, et al. A well-defined culture system for colonic epithelial cells that allows efficient enrichment of LGR5⁺ stem cells. **The 1st JSGE International Topic Conference -Stem cells in digestive organs**. 2010.9.26. 鎌倉
9. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. TNF path-way in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **国際免疫学会議**. 2010.8.25. 神戸
10. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Myosin light chain kinase is associated with disruption of epithelial tight junction in an animal model of colitis-associated tumor. **アメリカ臨床免疫学会**. 2010.6.25. ボストン
11. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Myosin light chain kinase is associated with disruption of epithelial tight junction in colitis-associated tumor. **アメリカ消化器病学会**. 2010. 5.2. ニューオリンズ
12. Nagaishi T, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in intestinal epithelia may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **Advances in Inflammatory Bowel Diseases-Crohn's & Colitis Foundation of America Clinical & Research Conference**. 2009.12.4. マイアミ
13. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. TNF receptor signaling in intestinal epithelia may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **国際粘膜免疫学会議**. 2009. 7. 7. ボストン
14. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **アメリカ臨床免疫学会**. 2009.6.11. サンフランシスコ

コ

15. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. アメリカ消化器病学会. 2009.6.1. シカゴ
16. Nagaishi T. CEACAM1 regulates T cell function in IBD. Surface Barrier Immunology Study Group Meeting. 2009.3.7. 東京 (国内学会)
17. 山地統、永石宇司、渡辺守、ほか. マウス腸炎モデルにおける腸炎惹起性 CD4+ T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される. 日本消化器病学会大会. 2011.10.20. 福岡
18. 秋山純子、長堀正和、渡辺守. チオプリン、タクロリムス不応例潰瘍性大腸炎に対するインフリキシマブ(IFX)の検討. 日本消化器病学会総会. 2011.5.15. 東京
19. 鬼沢道夫、永石宇司、渡辺守、ほか. Neutralization of tumor necrosis factor suppresses the development of colitis associated tumor in mice. 日本炎症性腸疾患学会. 2009.2.7. 東京

[図書] (計2件)

1. 永石宇司、渡辺守. 医学書院. 炎症性腸疾患：腸管粘膜免疫の特殊性. 2010. 267-282
2. 永石宇司、渡辺守. シナジー. 臨床粘膜免疫学：潰瘍性大腸炎. 2010. 218-232

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：大腸上皮幹細胞の単離・培養技術とこれを用いた大腸上皮移植技術

発明者：渡辺 守・中村哲也

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特願

番号：2011-236469

出願年月日：平成23年10月27日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/gast/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長堀 正和 (NAGAHORI MASAKAZU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60420254

(2) 研究分担者

永石 宇司 (NAGAISHI TAKASHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60447464

荒木 昭博 (ARAKI AKIHIRO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80361690

岡本 隆一 (OKAMOTO RYUICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・寄附講座教員

研究者番号：50451935

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授

研究者番号：10175127

(3) 連携研究者

なし