

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：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790667
 研究課題名（和文）
 クローナルコンペティションによる炎症性腸疾患の病態解明と新規治療法の開発
 研究課題名（英文）
 Competition between colitogenic Th1 and Th17 cells as a new concept of IBD pathogenesis and new therapeutic target.
 研究代表者
 三上 洋平（MIKAMI YOHEI）
 慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）
 研究者番号：80528662

研究成果の概要（和文）：

申請者らは、炎症性腸疾患の炎症部位で腸炎惹起性 CD4+メモリーT 細胞のクローン間競争 (clonal competition)により病態形成がなされていると仮説し、以下の項目を示した。

- ① 炎症惹起性メモリーT 細胞間の Th1/Th17 干渉現象の存在と病態形成への寄与
- ② 腸炎状態で、腸管内で Th17→Th17/Th1→Th1(Alternative) という分化経路の存在
- ③ 制御性 T 細胞はこの Alternative pathway を抑制する事

以上より Alternative pathway の阻害が新規治療標的の候補であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that the interaction between Th17 cells and Th1 cells contribute to altering disease phenotypes. We have also demonstrated that Th17 and Th17/Th1 cells become colitogenic alternative Th1 cells via Th17, Th17/Th1, and Th1-like cells, independently of classical Th1 cells. We have also established that regulatory T cells suppress this pathway, resulting in accumulation of Th17 and Th17/Th1 cells. This alternative pathway, generating colitogenic Th1 cells, could be a new therapeutic target of Inflammatory bowel diseases (IBD).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、インターロイキン 17、インターフェロンガンマ、クローナルコンペティション

1. 研究開始当初の背景

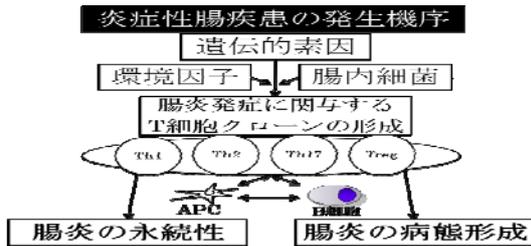
炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎及びクローン病は、近年本邦において若年を中心に増加の一途を辿り、再発と寛解を繰り返し年余にわたり治療の継続を余儀なくされ、就学・就業・妊娠や出産などの日常生活に大きな制限を患者は被る。しかし、今なお根本的な原因が不明で、根治療法がなく、治療法の開発は急務である。

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炎症の発現、持続がもたらされていることがわかってきた。

しかし、現在に至るまで、炎症罹患部位、下痢及び下血の重症度、腸管外病変の有無といった炎症性腸疾患の病態の差を引き起こす免疫学的、分子細胞生物学的メカニズムは全く不明であり、類似する潰瘍性大腸炎とクローン病の免疫学的発生病序の違いすら

現時点では解明されていない。数種類の遺伝子異常が潰瘍性大腸炎とクローン病患者間で統計学的有意差を持つのみである。



2. 研究の目的

以前より我々が仮説した『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』(Kanai T, et al. Review Article Inflamm Bowel Dis. 2009)に加え、Th1, Th2, Th17, Regulatory T cell (Treg)といった各 T細胞クローン間での干渉現象の結果として病態形成がなされているという独自の仮説に立脚して

- (1) 炎症惹起性メモリー T細胞間の Th1/Th17 干渉の解明
- (2) 炎症惹起性メモリー T細胞間のクローナルコンペティションの病態形成への関連性
- (3) リンパ球間のコンペティションの病態形成への関与と細胞療法への応用について追求する事を目的とする。

3. 研究の方法

クローナルコンペティションの腸炎病態形成への関与を観察するために

- (1) CD4CD45RB^{hi} adoptive transfer model (CD45RB^{hi} マウス), IL-10 KO マウスという 2 種類の腸炎モデルマウスの腸管 CD4 T細胞を Rag2KO マウスに共移入する事で、異なる 2 種類の T細胞クローン間での競合を観察し、その時のサイトカイン干渉についても詳細に検討する。
- (2) CD4CD45RB^{hi} マウスに野生型および IL-10 KO マウスを並体結合し、両者の差異を詳細に検討する事で、腸炎治療に重要な因子が IL-10、抑制性 T細胞に加え、クローナルコンペティションの寄与を示す。
- (3) Rag2KO マウスに異なるクローンの T, B細胞を共移入することで、B細胞クローンの変化の T細胞クローンへの影響、T/Bクローナルインタラクションを詳細に検討する。
- (4) Th17 の master regulator である ROR γ t レポーターマウスを用いる事で、in vivo で Th17, Th1 バランスを腸炎状態で検証した。

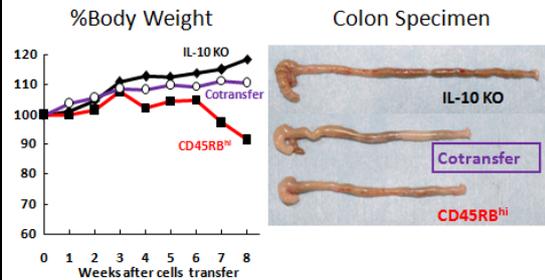
4. 研究成果

クローナルコンペティションの腸炎病態形

成への関与を観察するために

(1) CD4CD45RB^{hi} adoptive transfer model (CD45RB^{hi} マウス), IL-10 KO マウスという 2 種類の腸炎モデルマウスの腸管 CD4 T細胞を Rag2KO マウスに共移入し異なる 2 種類の T細胞クローン間での競合を観察した。その結果、共移入したマウスでは CD45RB^{hi} マウスの様な著明な腸管肥厚を伴う腸炎の形態を示す一方で、体重減少に関してはむしろ IL-10 KO マウスに類似した両者のマウスの中間型の表現形を示した。さらに、Th1 優位な CD45RB^{hi} マウス由来の IFN γ 産生細胞は減少、Th1/Th17 混合型である IL-10 KO マウス由来の IFN γ 産生細胞および IL-17 産生細胞の減少を認め、クローナルコンペティションの結果サイトカイン産生細胞の減少および腸炎の表現形の混和を認めた。

(2) CD45RB^{hi} マウスに腸炎発症後の IL-10 KO マウスを並体結合したところ、両者の腸炎の



改善を認めた。腸管粘膜固有層における T細胞は並体結合の結果減少し、また両者由来の T細胞の混和を認めていた。以上より先述のクローナルコンペティションによるサイトカイン干渉の結果腸炎の改善を認めた可能性が示唆された。

(3) CD45RB^{hi} マウスに野生型および腸炎未発症の IL-10 KO マウスを並体結合したところ、CD45RB^{hi} マウスの腸炎の著明な改善を認めた。しかしながら、IL-10 KO とマウス並体結合した CD45RB^{hi} マウスでは腸炎の改善が野生型マウス並体結合群より劣っていたことからクローナルコンペティションに IL-10 の関与があるが、関与は大きくないことが示唆された。

(4) 我々は ROR γ t/gfp ノックインマウス由来の Ly5.2+45RB^{high} 及び野生型 Ly5.1+TR を RAG2KO マウスに移入し、さらにその腸炎マウス腸管より T細胞 (LPCD4) を分離し GFP陽性、GFP陰性を再度 RAG2KO マウスに共移入した。45RB 単独移入群では腸炎を発症し、45RB+TR 群では腸炎を抑制した。腸炎発症群では 45RB+TR 群に比し Ly5.2+ IFN γ +CD4+T細胞 (Th1) の増加を認めたが、驚くべきことに 45RB+TR 群は GFP陽性細胞比率の増加及び

Ly5.2+IL-17A+ IFN γ + (TH17/1) 及び IL-17A+

IFN- γ -CD4+T細胞 (Th17) の増加を認めた。また、45RB腸炎を起こしたT細胞ではGFP陽性細胞においてもT-bet陽性であった。さらに腸炎を発症した腸管のT細胞よりGFP陽性、陰性細胞をそれぞれRAG2KOマウスに移入をしたところ両群とも腸炎を発症した。

Th1/Th17細胞はIFN- γ /IL-17産生を競合し共生する相互干渉が存在すること、細胞間干渉においてTreg細胞はTh17側に偏向する機構が存在すること、Treg細胞はTh17 \rightarrow Th1様細胞分化を阻害することを証明した。

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 Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Littman DR, Hibi T. Regulatory T cells suppress development of colitis, blocking differentiation of T-helper 17 into alternative T-helper 1 cells. *Gastroenterology*. 査読有 2011 Sep;141(3):1014-23. Epub 2011 Jun 7.

② 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*. 査読有 2010 Sep;40(9):2409-22.

③ Ojira K, Ebinuma H, Nakamoto N, Wakabayashi K, Mikami Y, Ono Y, Po-Sung C, Usui S, Umeda R, Takaishi H, Yamagishi Y, Saito H, Kanai T, Hibi T. MyD88-dependent pathway accelerates the liver damage of Concanavalin A-induced hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2010 Sep 3;399(4):744-9.

[学会発表] (計9件)

① Yohei Mikami

腸炎モデルマウスにおける肝免疫攪乱
消化管学会総会 Feb 10, 2012 仙台国際センター, Sendai

② Yohei Mikami,

Liver tolerance is maintained by tolerogenic immature CCR9+ pDCs and their breakdown is caused by activated

macrophages in IBD model mice, 15th International Conference of Mucosal Immunology, July 7, 2011. the Grand Hall of the Université Paris Descartes, Paris, France,

③ Yohei Mikami

炎症性腸疾患において CD4+CD25+制御性 T 細胞における Th1/Th17 細胞バランス是正機構

The 35th Annual Meeting of the Japanese Society of Lymphology June 3, 2011 東京ステーションコンファレンス, Tokyo,

④ Yohei Mikami

炎症性腸疾患マウスにおける肝臓内抗原提示細胞の攪乱

消化器病学会総会 May 15, 2011 Keio Plaza Hotel, Tokyo,

⑤ Yohei Mikami,

The breakdown of liver tolerance in colitic conditions induced by the disappearance of immature CCR9+ pDCs and the emergence of activated macrophages in liver,

Digestive Disease Week 2011, May 8 2011 Chicago,

⑥ Yohei Mikami

T-bet 分子を発現する腸炎惹起性 Th1 CD4 T細胞と Th17 から発生する Th1 様 CD4 T細胞、消化管学会総会 (workshop), Kyoto , Feb. 10 2011

⑦ Yohei Mikami

Competition between colitogenic T helper 1 and 17 CD4+ T cells contributes to the amelioration of colitis, The 4th Japan and US Collaboration Conference in Gastroenterology, Digestive Diseases and Sciences, 2010, Volume 55, Number 18 10, Pages 2697-2705, Tokyo, Nov 18, 2010

⑧ Yohei Mikami

Competition between colitogenic T helper 1 and 17 CD4+ T cells contributes to the amelioration of colitis, US-Japan GI Executive Meeting 2010, Tokyo, June 18 2010.

⑨ Yohei Mikami

Competition between colitogenic T helper 1- and 17- CD4+ T cells contributes to the amelioration of colitis, Digestive Disease Week 2010, New Orleans, May 5 2010.

〔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

<http://www.keio-med.jp/gastro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 洋平 (MIKAMI YOHEI)

慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）

研究者番号：80528662