

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790529

研究課題名（和文）腸管好酸球の恒常性維持と破綻における役割

研究課題名（英文）The role of eosinophil in the gut homeostasis

研究代表者

中西 祐輔（NAKANISHI YUSUKE）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：20579411

研究成果の概要（和文）：好酸球はアレルギーや喘息といった病態形成に深く関与していることが知られている細胞群である。しかし、これらの細胞群が消化管で果たしている役割については不明のままである。本研究では、炎症性腸疾患の発症において、好酸球が果たす役割について解析した。その結果、好酸球は、侵入した微生物の排除において一定の役割は果たすものの、炎症細胞ではなく、炎症性腸疾患の発症には深く関与していないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is well known that eosinophil plays a critical role in the development of allergy or asthma. However, the role of eosinophil in the intestinal mucosa remains unknown. Here, we investigated the role of eosinophil in the development of ulcerative colitis, a representative inflammatory bowel disease (IBD). We found that, although eosinophil contributed to eliminate invading commensal bacteria, they did not play a major role in the development of ulcerative colitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省指定特定疾患（難病）の1つである炎症性腸疾患（IBD）は、消化管の免疫システムが腸内共生細菌に対して異常に反応することが発症原因の1つとして考えられている。しかし、特定の細菌や特定の細胞が炎症性腸疾患の病態形成に果たす役割が明らかになっていないことから、その詳細な発症メカニズムは不明のままである。このことから、未だに有効な予防・治療方法が確立されていない現実がある。よって、炎症性腸疾患発症のメカニズムを細胞生物学的に解析し、新規治療法を開発することが求められている。

2. 研究の目的

生体に侵入した微生物を感知し、それらを排除するための適切な免疫応答を誘導するためには自然免疫系の細胞群が必須の細胞である。自然免疫系を担う中心的な細胞として樹状細胞（DC）やマクロファージが挙げられる。しかし、予備実験の結果から、定常状態の消化管には、これらの細胞群以外にも単球や好酸球がそれなりの頻度で局在していることが明らかになった。

好酸球はアレルギー応答や寄生虫の排除において重要な役割を果たしていることが知られている。一方、潰瘍性大腸炎の患者の生検には、健康な人よりも好酸球の数が多

ことが報告されており、更に主要塩基タンパク (MBP)、好酸球ペルオキシダーゼ (EPO) の産生量が高いことが示されている。これらの報告は、消化管に局在する好酸球が IBD において、炎症の中心的役割を果たしている可能性を示唆している。よって本研究では、炎症性腸疾患における好酸球の役割について検討した。

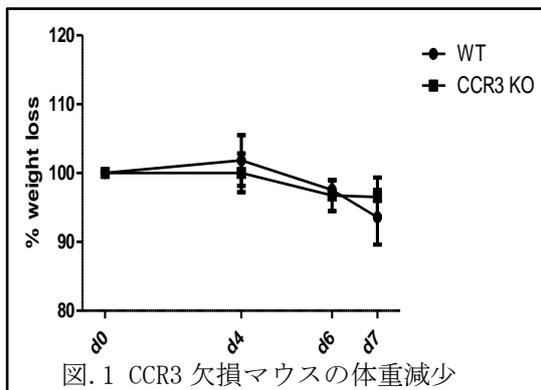
3. 研究の方法

既述のように、予備実験の結果から消化管にはそれなりの頻度で好酸球が局在していることを見出した。これらの好酸球はケモカインレセプター CCR3 および Siglec-F を発現していることを確認した。よって CCR3 欠損マウスにデキストラン硫酸塩 (DSS) を用いて腸炎を誘発し、消化管に局在する好酸球の役割について検討する。

4. 研究成果

最初に、DSS で腸炎を誘導してきたときに浸潤してくる細胞群をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、大腸炎症部位には、CCR3⁺Siglec-F⁺SSC^{high} の好酸球の他、Ly6G^{high}Ly6C^{int} の好中球、Ly6C^{high}MHC-II⁻の単球および Ly6C^{high}MHC-II⁺の単球由来のマクロファージが定常状態の大腸と比較して、多量に増加していることが明らかになった (データ非掲載)。

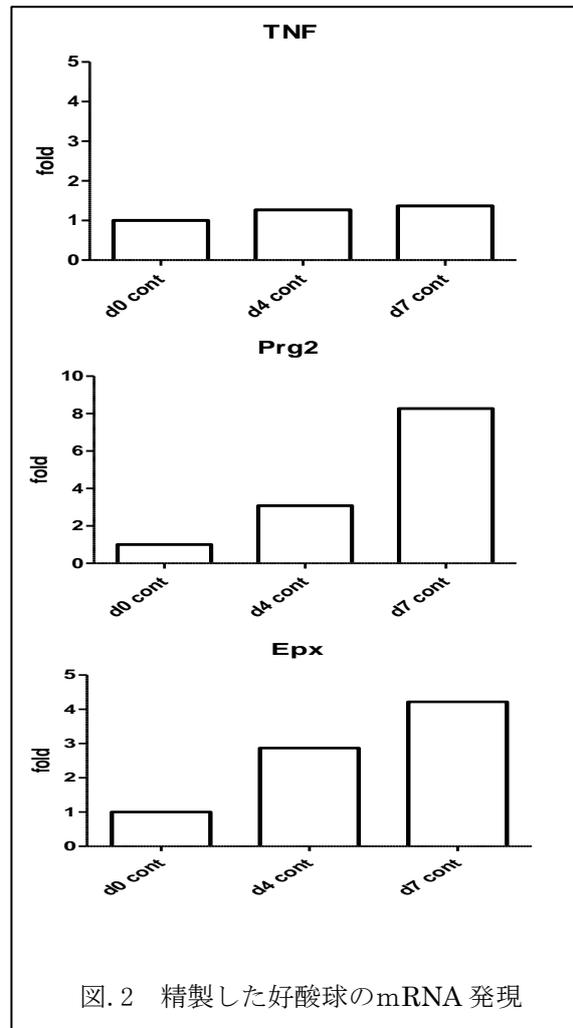
次に、消化管に局在する好酸球が、炎症性腸疾患の病態形成に果たす役割について検討するため、CCR3 欠損マウスに DSS 腸炎を誘導し、その体重減少を観察した。CCR3 欠損マウスは野生型 WT マウスと比較して、若干の体重減少の抑制傾向は認められたものの、統計的に有意な差は得られなかった。(図 1)



炎症時の CCR3 欠損マウスの好酸球の局在をフローサイトメーターで確認したところ、それらは、野生型マウスと比較して優位

に低下していた。更には、大腸の長さや組織学的所見においても、軽減の傾向はあるものの、野生型と比較して有意な差は得られなかった。

次に、炎症時に局在している好酸球の役割について検討するため、野生型マウスに DSS 腸炎を誘導し、浸潤してきた好酸球を Siglec-F の発現に基づき、セルソーターで精製し、mRNA の発現レベルについて検討した (図 2)。



その結果、炎症性サイトカインである TNF- α の発現量は、病態形成過程において上昇しなかった。一方、好酸球特異的に産生される MBP をコードしている Prg2 や EPO をコードしている Epx の発現は上昇していた。これらのことから、好酸球は、炎症性腸疾患の病態形成において、侵入してきた細菌の除去にある一定の役割を果たしているものの、炎症性サイトカインを積極的に産生している細胞ではなく、病態形成に深く関与していない細胞群であると推察された。

記述のように、好酸球は積極的に炎症サイトカインを産生しているわけではなく、IBDの病態形成に積極的に関与している細胞群ではなかった。これらの結果から、大腸炎症部位へと浸潤してくる細胞群の中から、他の細胞群が積極的に炎症作用に貢献していると推察された。よって、DSS腸炎を誘導した野生型マウスの大腸粘膜固有層を精製し、細胞内サイトカイン染色法を用いてTNF- α を産生している細胞群の同定を試みた(図3)。

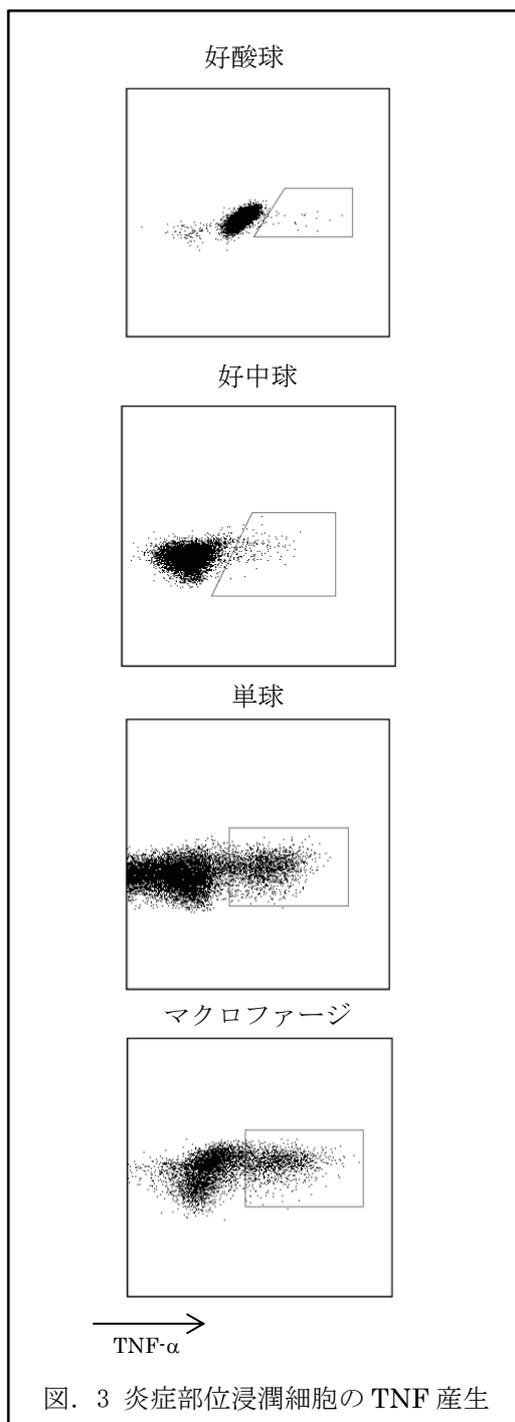


図3 炎症部位浸潤細胞のTNF産生

その結果、主にTNF- α を産生している細胞は好酸球ではなく、Ly6C^{high}の単球およびMHC-II⁺の単球由来マクロファージであることが明らかとなった。

単球は、骨髄で生産されたのち、血中へと移行して生体内をパトロールし、感染が確認されると、その場所へと速やかに浸潤し、感染防御の初期反応を誘導する細胞として知られている。骨髄内で生産された単球が末梢へと移行する際は、ケモカインレセプターのCCR2が必須であることが知られており、このCCR2欠損マウスは、単球が骨髄内から血中へと移行できないことから、骨髄内に蓄積し、血中および末梢のリンパ組織内では単球および単球由来のマクロファージがほとんど存在しないことが知られている。

よって、単球および単球由来マクロファージが炎症性腸疾患の病態形成において果たす役割を検討するため、CCR2欠損マウスにDSS腸炎を誘導して、その体重減少を野生型マウスと比較した(図4)。

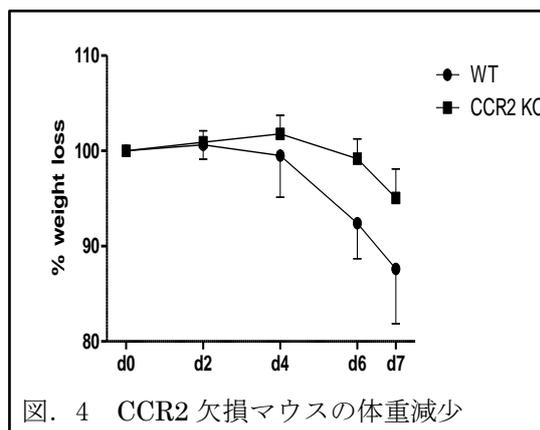


図4 CCR2 欠損マウスの体重減少

その結果、CCR2欠損マウスの体重減少は、野生型よりも統計的に有意に抑制されていた($p < 0.01$)。DSS投与7日目の炎症部位を固定して、免疫組織学的に解析するとCCR2欠損マウスの大腸は、野生型マウスの大腸よりも、消化管の形状が維持されていた(データ非掲載)。これらの結果は、CCR2を発現している単球および単球由来マクロファージが炎症性腸疾患の病態形成において、積極的に炎症性サイトカインを産生することによって寄与していることを強く示唆している。

これらの結果を踏まえ、今後は、炎症時に浸潤してくる単球および単球由来マクロファージの浸潤メカニズムに着目して解析を進める予定である。具体的には、腸内共生細菌の特にどの細菌群が単球やマクロファージ浸潤のきっかけとなるのかについて検討する。予備実験の結果から、単球およびマク

ロファージはグラム陽性菌を認識するのに必須な TLR2 を選択的に発現していることが明らかになった。従って、腸内共生細菌のグラム陽性菌を抗生物質で処理し、そのマウスに DSS 腸炎を誘導して、単球およびマクロファージの浸潤を解析する予定である。

当該研究課題を継続的に遂行することにより大きく2つの成果が期待される。1つは単球およびマクロファージの浸潤メカニズムを解析することによって、炎症性腸疾患の治療戦略上のターゲット細胞およびエフェクター分子を明示することが可能となる。例えば、単球およびマクロファージの浸潤を統御しているケモカインを同定することによって、同ケモカインの中和抗体や阻害剤の有用性を提起できる。2つ目は、胃癌の引き起こすことが知られているヘリコバクターピロリ菌の発見のように、炎症性腸疾患の原因細菌を同定することにより、その性状に基づいた除菌薬の開発が可能となり、発症リスクの低下を狙った予防戦略にも繋がることが期待される。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 祐輔 (NAKANISHI YUSUKE)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号:20579411