

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891024

研究課題名(和文) IL-27により誘導されるIL-10産生自然リンパ球の同定

研究課題名(英文) Identification of IL-27-induced IL-10-producing innate lymphoid cells.

## 研究代表者

古澤 純一 (Furusawa, Jun-ichi)

東京医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：80570796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン(IL)-27はIL-6/IL-12サイトカインファミリーであり、炎症性腸疾患(IBD)の抑制に重要な役割を果たすIL-10の産生をT細胞(Tr1)から誘導することが知られている。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)投与による腸炎モデルマウスにおいて、内在性のIL-27シグナルにより、CD11b+CD11c+CD64+マクロファージから早期にIL-10産生が誘導されることで腸炎を抑制する機構が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Interleukin (IL)-27 is one of the IL-6/IL-12 family cytokines, and it is known to induce IL-10-producing T cells (Tr1) to suppress inflammatory response in colitis. In this study, we demonstrated that CD11b+CD11c+CD64+ macrophages produce IL-10 by endogenous IL-27 signal at an early phase of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis model and suppress inflammatory response. In contrast to T cell-mediated adoptive immune response, it was suggested that IL-27-induced IL-10-producing macrophages contribute to anti-inflammatory innate immune response in inflammatory bowel disease (IBD).

研究分野：免疫学

キーワード：潰瘍性大腸炎 IBD IL-10 IL-27 マクロファージ DSS

## 1. 研究開始当初の背景

近年、自然免疫系において獲得免疫系のヘルパーT(Th)細胞サブセットに対応するサイトカイン産生パターンを示す自然リンパ球という細胞群が次々と同定されている。その一方で、腸管の恒常性を維持する抗炎症サイトカインである Interleukin(IL)-10 を産生する制御性T細胞(Treg)に対応した自然リンパ球は発見されていなかった。研究代表者らは樹状細胞(DC)やマクロファージなどから産生され、IL-10 産生を誘導する IL-6/12 サイトカインファミリーに属する IL-27 を血中に高濃度発現しているトランスジェニックマウス(Tg)を用いたところ、腸管粘膜固有層(Lamina propria: LP)において野生型マウスと比較して IL-10 を数十倍高く発現する T細胞や B細胞でない自然免疫細胞様の集団が存在することを発見し、IL-27 によって誘導される新たな自然リンパ球サブセットが存在するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、IL-27 誘導性 IL-10 産生自然免疫様細胞集団が腸管粘膜固有層に特異的に存在することを見出し、この細胞が腸管の炎症時においてナイーブ CD4<sup>+</sup>T細胞が Th細胞へと分化し、活性化した状態で IL-10 を産生する獲得免疫系が成立するまでの間、IL-27 に反応して早期に IL-10 を産生することで腸炎を抑制する自然リンパ球あるいはマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞なのではないかと考えた。本研究では、IL-10 遺伝子座に蛍光タンパク Venus をノックインしたレポーターマウスである IL-10<sup>Venus</sup> マウス、IL-10<sup>Venus</sup> マウスに IL-27 Tg マウス、あるいは IL-27 受容体構成分子である WSX-1 欠損マウスをそれぞれ交配させたレポーターマウスを用いて、IL-27 誘導性 IL-10 産生細胞が未だ明らかにされていない自然リンパ球、あるいは別のミエロイド系サブセットなのかを詳細に同定し、さらに IL-27 が腸炎発症時において自然免疫細胞からの IL-10 産生を誘導することによって腸炎を抑制しうるのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) IL-27 により誘導される IL-10 産生細胞の詳細な表現系の同定

腸管における IL-27 誘導性 IL-10 産生細胞が、未だ明らかになっていない自然リンパ球であるのか、あるいは他の自然免疫細胞であるのかを明らかにする。まず、レポーターマウスを用いて IL-10 産生細胞が自然リンパ球の大きな特徴である、既知の細胞系譜マーカー(Lineage)陰性の細胞であるのかを、樹状細胞やマクロファージマーカーを含む幅広い Lineage マーカーの抗体を用いて FACS により検討する。Lineage 陽性、特に CD11b あるいは CD11c 陽性の細胞であった場合、樹状

細胞あるいはマクロファージ様の自然免疫細胞であることが考えられる。したがって、IL-10 産生細胞を腸管における代表的な樹状細胞サブセット [1. CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup>DC、2. CD103<sup>+</sup>DC] あるいはマクロファージサブセット [CD11b<sup>int</sup>CD11c<sup>int</sup>CD64<sup>+</sup>] のいずれの表現系を示すのかを検討し、IL-27 誘導性 IL-10 産生細胞が自然リンパ球であるのか、あるいはミエロイド系の自然免疫細胞であるのかを明らかにする。

### (2) IL-27 により誘導される IL-10 産生自然免疫細胞を介した腸炎抑制機構

#### IL-27 Tg マウスにおけるによる腸炎抑制

IL-27 は IL-10 産生 T細胞 (Tr1) を誘導することが知られている。しかしながら、獲得免疫系において機能する T細胞は、その活性化までに時間を要することから、研究代表者らが IL-27 Tg マウスにおいて見出した IL-10 産生自然免疫様細胞が腸炎の拡大や悪化を T細胞に先立って抑制している可能性が示唆される。そこで、IL-27 Tg マウスを用いた際に、野生型マウスと比較して腸炎が抑制されるのかを明らかにするために、1.5%デキストラン硫酸ナトリウム(Dextran sodium sulfate: DSS)を溶解した水を7日間自由飲水させることで実験的に腸炎を誘導し、経時的に体重減少、下痢、血便それぞれの重症度を判定しスコアリングを行った。

### 内在性の IL-27 シグナルを介した IL-10 産生細胞の誘導による腸炎抑制

DSS 投与による腸炎誘導時に内在性の IL-27 シグナルにより IL-10 産生自然免疫様細胞が誘導されることで、腸炎抑制に寄与しているのかを明らかにすることを目的とした。IL-10<sup>Venus</sup> マウス及び WSX1 KOxIL-10<sup>Venus</sup> マウスに DSS を投与し、IL-10 産生細胞の出現を FACS により解析した。さらに、経時的に体重減少率、下痢、血便の重症度をスコアリングし、内在性の IL-27 シグナルが腸炎の重篤化を抑制しているのかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-27 により誘導される IL-10 産生細胞の詳細な表現系の同定

IL-27 Tg マウスの腸管において増加している IL-10 産生細胞がどのような細胞なのかを、IL-10<sup>Venus</sup> マウス及び IL-10<sup>Venus</sup>xIL-27 Tg マウスを用いて FACS により詳細に解析を行ったところ、IL-10<sup>Venus</sup> マウスと比較して IL-10<sup>Venus</sup>xIL-27 Tg マウスの LP において、自然リンパ球サブセットではない Lineage(CD3、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD11b、CD11c、B220、NK1.1、TER119、Gr1、Fc $\gamma$ R1 $\alpha$ )陽性細胞における Venus の発現率が野生型マウスと比較して数十倍高く増加していた。この細胞集団を詳細に解析したところ、CD11b<sup>int</sup>CD11c<sup>int</sup>CD64<sup>+</sup>の表現型を示すマクロファージと思われる細胞における

Venus 陽性率が最も亢進していた。さらに、その他の臓器における Venus 発現レベルについても検討したところ、LP 以外の臓器(骨髄、脾臓、腸間膜リンパ節、胸腺、パイエル板)では Venus の発現は非常に低く、IL-27 Tg マウスを用いた際の顕著な発現上昇も見られなかった。したがって、IL-27 は腸管粘膜固有層に存在するマクロファージからの IL-10 産生を特異的に誘導していることが示唆された。

## (2) IL-27 により誘導される IL-10 産生自然免疫細胞を介した腸炎抑制機構の解明

### IL-27 Tg マウスにおけるによる腸炎抑制

次に、IL-10 産生マクロファージが増加している IL-27 Tg マウスでは、DSS により誘導される腸炎が抑制されるのかを検討するために、野生型マウス及び IL-27 Tg マウスに DSS を自由飲水させることで腸炎を誘導し、経時的(day3-7)に体重減少率、下痢及び血便のレベルをそれぞれ測定し、それらを総合した腸炎の重症度をスコアリングした。その結果、体重減少率、総合スコアのどちらも IL-27 Tg マウスでは野生型マウスと比較して有意に抑制されることが明らかになった。

### 内在性の IL-27 シグナルを介した IL-10 産生細胞の誘導による腸炎抑制

まず、野生型マウスにおいて腸炎誘導時に IL-10 産生マクロファージが誘導されるのかを確認するために、IL-10<sup>Venus</sup> マウスに DSS を授与して腸炎を誘導し、5 日後に FACS 解析を行った。その結果、DSS を投与したマウスでは LP において Venus 陽性 CD11b<sup>int</sup>CD11c<sup>int</sup>CD64<sup>+</sup>マクロファージが DSS を投与していない定常状態の LP と比較して 5 倍ほど増加することが確認された。

そこで、IL-10 産生マクロファージが内在性の IL-27 シグナルにより誘導されることで、腸炎抑制に寄与しているのかを検討した。IL-10<sup>Venus</sup> マウス及び WSX1 KOxIL-10<sup>Venus</sup> マウスに DSS を投与したところ、LP マクロファージにおける Venus 陽性率が、IL-10<sup>Venus</sup> マウスと比較して WSX1 KOxIL-10<sup>Venus</sup> マウスでは約 1/5 に減少していることが分かった。細胞数に関しても、WSX1 KOxIL-10<sup>Venus</sup> マウスでは有意に Venus 陽性マクロファージが減少していることが明らかになった。

最後に、IL-10<sup>Venus</sup> マウス及び WSX1 KOxIL-10<sup>Venus</sup> マウスに DSS を投与して経時的(day3-7)に腸炎の重症度を測定した。その結果、体重減少率、総合スコアのいずれも、DSS 投与による IL-10 産生マクロファージの出現が抑制される WSX-1 KO マウスでは野生型マウスよりも有意に悪化していることが分かった。また腸管の縮小においても、WSX-1 KO マウスでは野生型マウスよりも強く起こっていることから、WSX-1 KO マウスでは腸炎が悪化していることが分かった。本研究の結果から、腸炎発症時には内在性の IL-27 シグナ

ルにより IL-10 産生マクロファージが誘導されることで症状を抑制する機構が存在することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, **Furusawa J**, Chiba Y, Mizuguchi J, Tauchi T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Immunological control of chronic myeloid leukemia leading to treatment-free remission. *J. Hematol. Transfus.* 2014 2(3): 1024.

Yoshimoto T, Mizoguchi I, Katagiri S, Tauchi T, **Furusawa J**, Chiba Y, Mizuguchi J, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Immunosurveillance markers may predict patients who can discontinue imatinib therapy without relapse. *Oncimmunology.* 2014 14;3:e28861.

Terayama H, Yoshimoto T, Hirai S, Naito M, Qu N, Hatayama N, Hayashi S, Mitobe K, **Furusawa J**, Mizoguchi I, Kezuka T, Goto H, Suyama K, Moriyama H, Sakabe K, Itoh M. Contribution of IL-12/IL-35 common subunit p35 to maintaining the testicular immune privilege. *PLoS One.* 2014 23;9(4):e96120.

Qu N, Xu M, Mizoguchi I, **Furusawa J**, Kaneko K, Watanabe K, Mizuguchi J, Itoh M, Kawakami Y, Yoshimoto T. Pivotal Roles of T-Helper 17-Related Cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in Inflammatory Diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013:968549.

## 〔学会発表〕(計 6 件)

**Furusawa J**, Chiba Y, Mizoguchi I, Xu M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes the differentiation of hematopoietic stem cells into multipotent myeloid progenitor cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府)、2014 年 12 月 12 日

Chiba Y, **Furusawa J**, Mizoguchi I, Xu M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes the differentiation of hematopoietic stem cells into multipotent myeloid progenitor cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府)、2014 年 12 月 11 日

**Furusawa J**, Chiba Y, Mitobe K, Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes the differentiation of bone marrow cells into DC progenitor cells. DC2014 -13<sup>TH</sup> International Symposium on Dendritic Cells-、ツール(フランス)、2014 年 9 月 15 日

**古澤 純一**、善本隆之、IL-27 による造血幹細胞からのミエロイド系前駆細胞の分化・増殖誘導、新学術領域「細胞運命制御」若手の会、浜名湖口イヤルホテル(静岡県)、2014年4月19日

**古澤 純一**、溝口 出、水戸部佳奈、樋口 要、金子幸太郎、角田廉、水口純一郎、久田将之、粕谷和彦、土田明彦、善本隆之、癌DCワクチン療法への応用を目指したIL-27を用いたDC前駆細胞の分化・増殖誘導法の開発、第3回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、東京薬科大学(東京都)、2013年12月14日

**Furusawa J**, Mizoguchi I, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 promotes the differentiation of bone marrow cells into DC progenitor cells. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉県)、2013年12月12日

**古澤 純一**、溝口 出、水戸部佳奈、樋口 要、金子幸太郎、角田廉、水口純一郎、久田将之、粕谷和彦、土田明彦、善本隆之、IL-27によるDC前駆細胞の分化・増殖誘導、第90回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会、東京医科大学病院(東京都)、2013年11月5日

〔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.tokyo-med-ims.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古澤 純一 (FURUSAWA JUN-ICHI)  
東京医科大学・医学部  
ポスト・ドクター  
研究者番号：80570796

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

