

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590718
 研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における腸炎惹起性免疫記憶T細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発
 研究課題名（英文） Immunosenescent colitogenic CD4⁺T cells convert to regulatory cells and suppress colitis.
 研究代表者
 戸塚 輝治（TOTUKA TERUJI）
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：70447465

研究成果の概要：

炎症性腸疾患の病因として炎症惹起性 CD4⁺T 細胞が広く知られているが、長期生存した腸炎惹起性 CD4⁺T 細胞がどのような形質を獲得するかは未だ不明である。そこで我々は、CD4⁺CD45RB^{high} 移入大腸炎を作製し、大腸炎を発症したマウスの大腸より取り出した lamina propria (LP) CD4⁺T 細胞を再度免疫不全マウスの腹腔内に移入、LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返す事により長期生存炎症惹起性 CD4⁺T 細胞を作製、この細胞の機能について検討した。

大腸炎を発症したマウスの大腸より取り出した LPCD4⁺T 細胞を再度免疫不全マウスの腹腔内に移入、LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返し、大腸炎の発症を経時的に検討した。また、同時に IFN- γ 、TNF- α 、IL-17 などの Th1、Th17 サイトカインの産生能を検討した。次に LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返し7世代で腸炎未発症マウスの LPCD4⁺T 細胞、1世代で腸炎を発症したマウスの LPCD4⁺T 細胞を naïve CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞と共移入し、腸炎抑制能を検討した。

LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返すことで、腸炎発症までの期間が延長し、6世代までは全例腸炎を発症したが7世代以降は腸炎未発症マウスが出現し大腸炎発症率も減少した。また、7世代マウスは、Th1、Th17 サイトカイン産生が低下した。1世代 LPCD4⁺T 細胞を共移入した群は腸炎を発症したが、腸炎未発症7世代 LPCD4⁺T 細胞を共移入した群は腸炎を発症しなかった。

これは、病的 CD4⁺T 細胞が、その病的 CD4⁺T 細胞を抑制する制御性 CD4⁺T 細胞に変化したことを示した画期的な業績である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞、炎症性腸疾患、マウスモデル、新規治療法

1. 研究開始当初の背景

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、内科的な治療が困難な症例に対しては腸病変の外科的局所切除が行なわれてきた。そして、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全状態にリセットされたと判断されてきた。しかしながら、ほぼ 100%の患者で術後に手術以前と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・難治性の原因として免疫の記憶 (メモリー) という概念を提唱してきた (Kanai T, Totsuka T, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: 1051-8, 2006)。すなわち、疾患の責任細胞は腸内細菌抗原を特異的に認識し記憶する免疫記憶 CD4⁺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永続的に潜在する腸炎責任免疫記憶 CD4⁺T 細胞の腸内細菌存在による再活性化が再燃を引き起こす。しかしながら、臨床現場では発症後数十年の炎症性腸疾患長期経過例において発症期に比べ、緩解または病勢の軽症化をしばしば経験する。我々はこの現象の原因として、潜在する腸炎惹起生免疫記憶 CD4⁺T 細胞の免疫学的加齢 (immunosenescence) の関与に着眼した。すなわち、従来の正確ではない概念、‘免疫記憶細胞の不死性’とは相反し、常に抗原 (腸内細菌) に暴露されている腸炎惹起生免疫記憶 CD4⁺T 細胞の加齢 (老化) に伴う免疫学的機能性の劣化 (exhaustion) を逆に利用し、この免疫学的機能性の劣化を生体外で人為的に推進する細胞治療によって炎症性腸疾

患治療における緩解導入を試みた。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎およびクローン病は若年者を襲い様々な副作用に直面する治療の継続を余儀なくされる難病である。本邦において、罹患数は潰瘍性大腸炎 7 万人、クローン病 3 万人と増加の一途をたどり、さらに、ひとたび罹患すると生涯に渡り疾患を背負うため、社会的にも極めて重要な疾患ととらえられている。両疾患とも、免疫学的因子、環境因子、遺伝因子など様々な病態が考えられているが、その複雑性、多様性から治療に難渋することが多い。臨床においては亢進した免疫を非特異的にステロイド剤や免疫抑制剤などによってコントロールするのが実情でなおも緩解と増悪を繰り返す。多くの症例が自己免疫類似疾患と捉えられて、ステロイドや免疫抑制剤など非特異的免疫制御による治療が施されるが、その副作用の問題や、さらに治療抵抗例も多く、現在の治療法では限界があることは明らかであり、画期的な新規治療法開発は国民的要請であり急務である。我々は今回のプロジェクトにおいて、炎症性腸疾患新規治療法の開発を目的に、炎症性腸疾患における腸炎惹起性メモリー T 細胞の老化促進を推進することを応用したまったく新しい免疫学概念に立脚した新規治療法の開発について追求する。

3. 研究の方法

(1) マウス CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞移入大腸炎粘膜内腸炎惹起性免疫記憶 CD4⁺T 細胞の再移入

モデル

① 正常マウス脾細胞よりMACS beadsにてCD4⁺T細胞を単離、FACS VantageにてCD4⁺CD45RB^{high}T細胞を分離し、1匹あたり3×10⁵個のCD4⁺CD45RB^{high}T細胞を免疫不全マウスの腹腔内に投与する。

② 移入後大腸炎発症時にマウス大腸粘膜よりLPCD4⁺T細胞を単離し、単離した腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞を再度免疫不全マウスの腹腔内に投与する(Totsuka T, et al. Gastroenterology. 124: 410-421, 2003)。

③ ②の再移入を繰り返し、腸炎発症頻度、発症までの期間を検討する。

④ 毎回の腸炎発症時(初期体重10%減)の臨床スコア、腸炎組織学的スコアを検討する。

⑤ 脾臓、腸間膜リンパ節、大腸粘膜CD4⁺T細胞数の検討

⑥ 大腸粘膜内CD4⁺T細胞の細胞表面抗原の発現のフローサイトメトリーによる検討

⑦ 大腸粘膜内CD4⁺T細胞のサイトカイン産生能を細胞質染色フローサイトメトリーとELISA法(IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、TGF- β)による検討

⑧ 制御性T細胞の関するCD25、GITR、CTLA-4、Foxp-3発現と細胞増殖抑制in vitroアッセイによる検討

(2) 加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の腸炎発症抑制の検討

① 上記(1)の再移入プロトコールにおいて約6世代で、腸炎を発症しない個体が出現する。腸炎未発症マウス脾臓および腸間膜リンパ節より分離した免疫記憶CD4⁺T細胞を分離し、(1)同様に細胞形態および機能をin vitroで解析する。

② 腸炎未発症マウス加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の腸炎発症抑制能を検討する目的に、得られた加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞(3×10⁵/mouse)を正常マウス脾臓CD4⁺CD45RB^{high}T細胞(3×10⁵/mouse)と新しい免疫不全マウスへ共

移入する。コントロールとして正常マウス脾臓CD4⁺CD45RB^{high}T細胞のみ(3×10⁵/mouse)を免疫不全マウスへ移入する群を設定する。

③ 経時的に腸炎発症の観察を行う。

④ さらに、上記の検討をLy5.1⁺マウス脾臓CD4⁺CD45RB^{high}T細胞とLy5.2⁺加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞に識別するコンジュニック系を用いることにより、抑制機能の場を追求する。

(3) in vitro腸炎抑制性加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の確立

① CD4⁺CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎マウス炎症粘膜より粘膜内CD4⁺T細胞を分離する。

② 分離した粘膜内CD4⁺T細胞を抗CD3抗体/抗体CD28抗体抱合ビーズおよびIL-7にて長期培養を行う。

③ CD4⁺CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎マウス糞便を採取する。得られた糞便をホモジェネートし無菌化後、正常マウス骨髄細胞から分離した樹状細胞へパルスする。糞便腸内細菌抗原パルス樹状細胞を定期的に作成し、分離した粘膜内CD4⁺T細胞との長期培養を行う。

④ 以上の長期培養での分裂能をCFSEラベルした粘膜内CD4⁺T細胞を用いて検証する。

⑤ 長期培養後の粘膜内CD4⁺T細胞の細胞表面抗原の発現のフローサイトメトリーを用いた検討。

⑥ 長期培養後の粘膜内CD4⁺T細胞の細胞増殖抑制能をin vitroアッセイにて検討。

⑦ 長期培養後の粘膜内CD4⁺T細胞のテロメア長を測定する。

⑧ 以上の検討により加齢化および抑制能を有する培養粘膜CD4⁺T細胞のin vivo腸炎抑制能を検討する目的に、得られた培養加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞(3×10⁵/mouse)を正常マウス脾臓CD4⁺CD45RB^{high}T細胞(3×10⁵/mouse)と新しい免疫不全マウスへ共移入する。コントロールとして正常マウス脾臓CD4⁺CD45RB^{high}T細胞のみ(3×10⁵/mouse)を免疫不全

マウスへ移入する群を設定する。

⑨ 経時的に腸炎発症の観察を行う。

(4) ヒト炎症性腸疾患における加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の検討

① 十分なインフォームド・コンセントのもとに、手術時、内視鏡時に得られた大腸炎粘膜のCD4⁺T細胞にMACSビーズを使用し単離する。

② 単離した粘膜内CD4⁺T細胞をFACSにて、CD3/CD4、CD62L/CD44、CD4/IL-7R、CD4/Foxp-3、CD3/PD-1、CD4/TCRVβを二重染色にて解析する。

③ 抗CD3/抗CD28抗体刺激による粘膜内CD4⁺T細胞の培養上清を回収しELISA法にて、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10、TNF-α、TGF-β濃度を測定する。

④ 単離した粘膜内CD4⁺T細胞の制御性T細胞機能をin vitroアッセイにて検討する。

⑤ 単離した粘膜内CD4⁺T細胞のテロメア長を測定する。

⑥ 以上のデータと発症後経過年数との比較を検討する。

4. 研究成果

(1) マウスCD4⁺CD45RB^{high} T細胞移入大腸炎粘膜内腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞の再移入モデル

正常マウス脾細胞よりMACS beadsにてCD4⁺T細胞を単離、FACS VantageにてCD4⁺CD45RB^{high}T細胞を分離し、1匹あたり 3×10^5 個のCD4⁺CD45RB^{high}T細胞を免疫不全マウスの腹腔内に投与し、移入後大腸炎発症時にマウス大腸粘膜よりLPCD4⁺T細胞を単離し、単離した腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞を再度免疫不全マウスの腹腔内に投与、LPCD4⁺T細胞移入を繰り返すことで、腸炎発症までの期間が延長し、6世代までは全例腸炎を発症したが7世代以降は腸炎未発症マウスが出現し大腸炎発症率も減少した。また、7世代マウスは、

Th1、Th17サイトカイン産生が低下した。

(2) 加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の腸炎発症抑制の検討

7世代で、腸炎を発症しない個体が出現する。腸炎未発症マウス脾臓および腸間膜リンパ節より分離した免疫記憶CD4⁺T細胞を分離する。得られた加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞(3×10^5 /mouse)を正常マウス脾臓CD4⁺CD45RB^{high}T細胞(3×10^5 /mouse)と新しい免疫不全マウスへ共移入した結果、1世代LPCD4⁺T細胞を共移入した群は腸炎を発症したが、腸炎未発症7世代LPCD4⁺T細胞を共移入した群は腸炎を発症しなかった。

これらの結果より、炎症性腸疾患における腸炎惹起性メモリーT細胞の老化促進を推進することを応用したまったく新しい免疫学概念に立脚した新規治療法の開発に結びつくものと考えられる。

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 11 件)

1. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Tsuchiya K, Sakamoto N, Okamoto R, Watanabe M: Immunosenescent colitogenic CD4(+) T cells convert to regulatory cells and suppress colitis. *Eur J Immunol.* 38(5): 1275-1286, 2008. 査読有
2. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Nozaki K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Watanabe M: Colitogenic CD4⁺ effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis.* 14(12): 1630-1640, 2008. 査読有
3. Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Fukuda T, Miura O, Yagita H, Watanabe M: Negative feedback regulation of colitogenic CD4(+) T cells by increased granulopoiesis. *Inflamm Bowel Dis.* 14(11):

- 1491-1503, 2008. 査読有
4. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Watanabe M: Continuous generation of colitogenic CD4(+) T cells in persistent colitis. *Eur J Immunol*. 38(5): 1264-1274, 2008. 査読有
 5. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. *J Immunol*. 180(8):5291-5299, 2008. 査読有
 6. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. *J Immunol*. 180(1):383-390, 2008. 査読有
 7. Ito Y, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Yoshioka A, Tomita T, Nagaishi T, Sakamoto N, Sakanishi T, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4+ T cell-mediated colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 294(1): G199-207, 2008. 査読有
 8. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol*. 178(8):4937-4946, 2007. 査読有
 9. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: IL-7 Is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol*. 178(8): 4737-4748, 2007 査読有
 10. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology*. 132(1):176-189, 2007. 査読有
 11. Kanai T, Makita S, Kawamura T, Nemoto Y, Kubota D, Nagayama K, Totsuka T, Watanabe M: Extracorporeal elimination of TNF-alpha-producing CD14(dull)CD16(+) monocytes in leukocytapheresis therapy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 13(3):284-290, 2007. 査読有 [学会発表] (計 10 件)
1. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Watanabe M: Colitogenic CD4+ T Cells convert to regulatory cells to suppress colitis in the process of the immunosenescence. DDW 2008. 2008. 5. 20. San Diego.
 2. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Shinohara T, Kameyama K, Totsuka T, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. 日本免疫学会総会・学術集会. 2007. 11. 22. 東京
 3. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Makita S, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. ICMI2007. 2007. 7. 11. 東京
 4. Kanai T, Nemoto Y, Shinohara T, Fujii T, Ito Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Watanabe M: Uniqueness of colitogenic lamina propria CD4+ T cells for the perpetuation of colitis. ICMI2007. 2007. 07. 11. 東京
 5. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: Bone marrow is a reservoir for persistent colitogenic CD + TEM cells in IL-7 dependent manner. ICMI2007. 2007. 07. 11. 東京
 6. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and persistence of chronic colitis. DDW 2007. 2007. 5. 22. Washington. D. C
 7. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. DDW 2007. 2007. 5. 22. Washington. D. C
 8. Ito Y, Kanai T, Fujii Y, Nemoto Y, Makita S, Totsuka T, Tsuchiya K, Yagita H, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-NKG2D in CD4+ cell-mediated murine model of chronic colitis. DDW 2007. 2007. 5. 21. Washington. D. C
 9. Tomita T, Kanai T, Fujii Y, Nemoto Y, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: Continuous recirculation of colitogenic CD4+ T cells may be

required for perpetuation of chronic colitis. DDW 2007. 2007.5.21. Washington, D.C

10. Onizawa M, Kanai T, Nemoto Y, Oshima S, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Yagita H, Watanabe M: Blockade of TNF- α inhibits tumor progression in colitis-associated cancer. DDW 2007. 2007.5.20. Washington, D.C

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸塚 輝治 (TOTUKA TERUJI)
東京医科歯科大学医学部附属病院・消化器内科・助教
研究者番号：70447465

(2) 研究分担者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU) (H19)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・消化器病態学・教授
研究者番号：10175127

金井 隆典 (KANAI TAKANORI)
慶應義塾大学・内科・准教授 (H19)
研究者番号：40245478

荒木昭博 (ARAKI AKIHIRO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教 (H19)
研究者番号：80361690

(3) 連携研究者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU) (H20)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・消化器病態学・教授
研究者番号：10175127

金井 隆典 (KANAI TAKANORI)
慶應義塾大学・内科・准教授 (H20)
研究者番号：40245478

荒木昭博 (ARAKI AKIHIRO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教 (H20)
研究者番号：80361690