

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590743  
 研究課題名(和文) 炎症性腸疾患におけるTh17型炎症の制御性T細胞による抑制に関する研究  
 研究課題名(英文) Suppression of Th17-inflammation in inflammatory bowel diseases by regulatory T cells  
 研究代表者  
 中村 和彦 (NAKAMURA KAZUHIKO)  
 九州大学・大学病院・助教  
 研究者番号：00274449

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患は腸に慢性の炎症を起こす難病で、腸での免疫応答の制御に異常があるとされる。制御性T細胞は免疫応答を抑制する細胞で炎症性腸疾患治療への応用が期待されている。近年、炎症性腸疾患ではT細胞を介した免疫応答の中でTh1型とTh17型反応の関与が示唆されている。制御性T細胞はTh1型大腸炎は抑制するが、Th17型大腸炎を抑制できるかどうか不明であった。本研究では、制御性T細胞がTh1型に加えてTh17型大腸炎を抑制できる事を示し、炎症性腸疾患にTh17型反応が関与していたとしても制御性T細胞が治療に応用できる事を示した。

研究成果の概要(英文)：Impaired regulation of immunity in the gut is implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). Regulatory T cells (Treg) possess immunoregulatory activity and are a possible tool for the treatment of IBD. Recent studies suggest that T helper (Th) 1 and Th17 responses are augmented in the gut of IBD. Treg are capable of suppressing Th1-mediated colitis. However, it has not been clarified whether Th17-mediated colitis can be suppressed by Treg. In this study, we demonstrated that Treg are capable of suppressing Th17-mediated colonic inflammation as well as Th1-mediated colitis. It is therefore reasonable to consider utilization of Treg for the IBD treatment even if Th17 is involved in its pathogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：下部消化管学(小腸、大腸)、炎症性腸疾患、Th17、制御性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(IBD)の成因は不明であるが、腸管での免疫制御異常の関与が考えられている。CD4<sup>+</sup>T細胞を介した免疫応答はT helper (Th)1型、Th2型、そして近年新しく発見されたTh17型反応に分類される。従来、クローン病(CD)はTh1型、潰瘍性大腸炎(UC)はTh2型の炎症とされてきたが、近年、CD、UC共にTh17型反応の関与を示唆するデー

タが報告されている。

制御性T細胞(Treg)は、広範囲に免疫応答を抑制する調節性細胞である。IBD動物モデルにおいてTregの欠如が大腸炎を誘導し、また、Treg移入により大腸炎が効果的に抑制される事より、TregのIBD治療への応用が期待されてきた。しかし、Tregは*in vitro*でTh1、Th2反応を抑制するものの、Th17反応はTGF- $\beta$ 産生を介して、むしろ促進する

事が報告された。*in vivo*で Treg は Th1、Th2 型大腸炎を強く抑制するが、Th17 型大腸炎に対する効果は不明であった。

## 2. 研究の目的

Tregにより Th17型大腸炎が抑制できるかどうか明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞移入大腸炎モデルの作成と Treg 移入による大腸炎抑制実験。

① Balb/c マウス脾細胞から磁気ビーズを用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離した。抗 CD25 抗体磁気ビーズを用いて、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞に分離、前者は Treg として用いた。後者は抗 CD62L 抗体磁気ビーズを用いて更に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞を分離し、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞として用いた。

②  $1 \times 10^6$  のナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を C. B-17 SCID マウスに腹腔内投与し IBD 類似の慢性大腸炎を誘導した。また、大腸炎抑制目的に  $1 \times 10^6$  の Treg をナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞と共に移入した。対照には細胞を移入していない SCID マウスを用いた。

③ マウスは毎週体重を測定し、5~6 週後に安楽死させ、大腸組織を採取、サイトカイン産生を RT-PCR 法 (real time PCR)、および粘膜固有層単核球 (LPMC) 培養上清の ELISA で解析した。

(2) ラパマイシン誘導 Treg による大腸炎抑制実験。

① 20 nM ラパマイシン存在下にナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体で 3 ラウンド刺激し培養増殖させた (rapa<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell)。Treg の誘導を、FoxP3 の細胞内染色・フローサイトメトリーで解析した。

②  $1 \times 10^6$  のナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を C. B-17 SCID マウスに腹腔内投与し大腸炎を誘導した。また、大腸炎抑制目的に  $1 \times 10^6$  の rapa<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell をナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞と共に移入した。比較のためラパマイシン非存在下に培養した rapa<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞を共移入した。

## 4. 研究成果

(1) Treg による Th17 型大腸炎の抑制

ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞の SCID マウスへの移入により、マウス体重は徐々に減少し (図 1)、組織学的にも大腸炎の誘導を認めた。Treg を共移入したマウスでは体重減少を認めず (図 1)、組織学的にも大腸炎は認めなかった。

ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞移入群では、大腸組織での IFN- $\gamma$  (Th1 型サイトカイン) と IL-17A (Th17 型サイトカイン) mRNA 発現が対照群と比べて増強していた。Treg 移入群では IFN- $\gamma$ 、IL-17A 共に発現が有意に抑制された (図 2)。

LPMC 培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-17 発現もナ

イーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞移入群で著明に増加しており、Treg 移入により IFN- $\gamma$ 、IL-17 発現共に有意に抑制された (図 3)。

以上の結果より、Treg は *in vivo*で Th1 反応のみならず Th17 反応も抑制し、大腸炎の発症を抑制する事が示された。この事より、IBD の腸管炎症に Th17 反応が関与していたとしても、Treg は IBD 治療に応用可能であると考えられた。

図 1

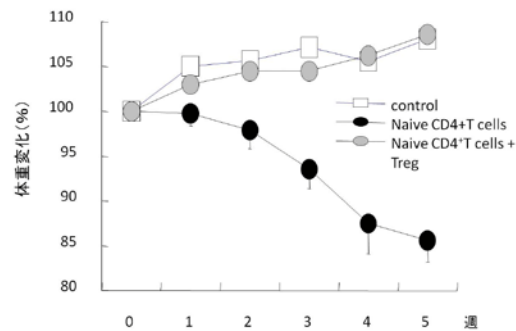


図 2

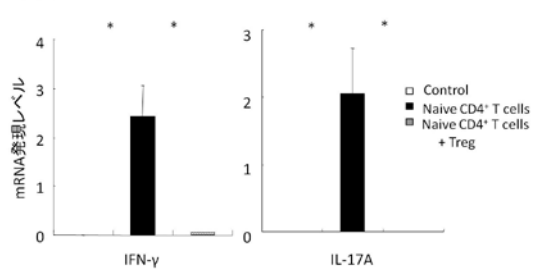
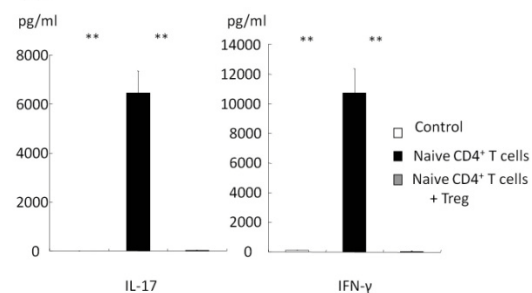


図 3



(2) ラパマイシン存在下に培養増殖した Treg による Th17 型大腸炎の抑制

ラパマイシン存在下に刺激培養した CD4<sup>+</sup> T 細胞 (rapa<sup>+</sup> CD4) は細胞総数が約 8 倍と増加し、その 40% が Treg マーカー FoxP3 を発現していた。一方、ラパマイシン非存在下培養の CD4<sup>+</sup> T 細胞 (rapa<sup>-</sup> CD4) 中の FoxP3 発現細胞の割合は 15% のとどまった (図 4)。以上よりラパマイシン処理により Treg を相対的に増加させる事ができた。

次に rapa<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の大腸炎抑制効果を検討した。ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入した

SCID マウスは大腸炎を発症し、有意な体重減少を示した。Rapa<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞を共移入した群は、control マウス同様、大腸炎は認めず、体重減少も認めなかった。Rapa<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞を共移入した群は、有意な体重減少の抑制を示さなかった (図 5)。

大腸におけるサイトカイン発現であるが、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞移入大腸炎マウスでは Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$ 、Th17 サイトカインである IL-17A、IL-17F が上昇していた。Rapa<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞共移入により IL-17A 発現の抑制は有意でなかったが、IFN- $\gamma$ 、IL-17F 発現は有意に抑制された。Rapa<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞移入は IFN- $\gamma$ 、IL-17A、IL-17F 発現を抑制しなかった (図 6)。

以上の結果より *ex vivo* に分離された naturally occurring Treg と同様にラバマイシンで培養、増殖した Treg も Th1、Th17 型大腸炎を抑制する事が示され、IBD 治療への応用が可能であると考えられた。

図4

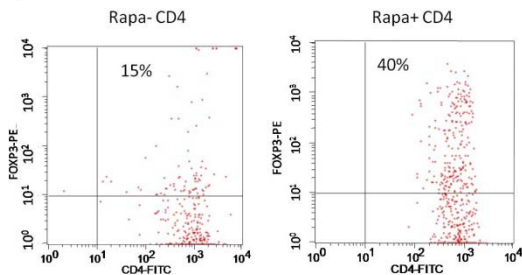


図5

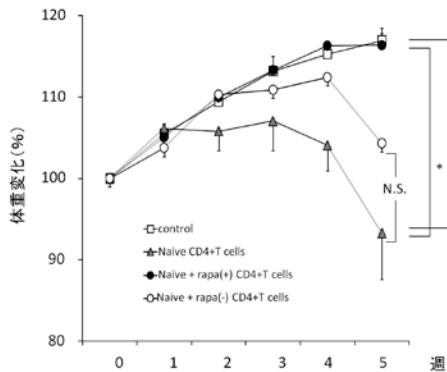
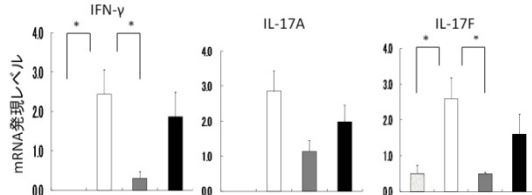


図6



## 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)

Ogino H, Nakamura K, Ihara E, Akiho H, Takayanagi R: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Suppress Th17-Responses in the Experimental Colitis Model. Digestive Diseases and Sciences 56: 376-386, 2011. 査読 有

中村和彦: 潰瘍性大腸炎に対する制御性 T 細胞移入療法の開発 消化器内科 51: 341-348, 2010. 査読 無

Sumida Y, Nakamura K, Kanayama K, Akiho H, Teshima T, Takayanagi R: Preparation of functionally preserved CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells from leukapheresis products from ulcerative colitis patients, applicable to regulatory T-cell-transfer therapy. Cytotherapy 10: 698-710, 2008. 査読 有

[学会発表] (計 2 件)

荻野治栄ほか, マウス Th1・Th17 混在型腸炎モデルにおける制御性 T 細胞の治療効果についての検討, 第 95 回日本消化器病学会総会 2009 年 5 月 8 日, 札幌

荻野治栄ほか, マウス Th1/Th17 混在型腸炎モデルに対する制御性 T 細胞の効果: 治療的投与に関する検討, 第 96 回日本消化器病学会総会, 2010 年 4 月 22 日, 新潟

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 和彦 (NAKAMURA KAZUHIKO)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：00274449

### (2) 研究分担者

秋穂 裕唯 (AKIHO HIROTADA)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：10380411  
牟田 浩実 (MUTA HIROMI)  
九州大学・医学研究院・特別教員  
研究者番号：40325478

### (3) 連携研究者

なし