

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590695

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患治療ターゲットとしての腸炎惹起性メモリーT細胞IL-7受容体の解析

研究課題名（英文） The functional analysis of IL-7 receptor in colitogenic memory T cell.

研究代表者

岡田 英理子 (OKADA ERIKO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20376784

研究成果の概要（和文）：

炎症性腸疾患(IBD)の病態解明および画期的な根治療法の開発を最終目標として、疾患フェノタイプを“記憶”し、生涯にわたり生体内に潜在し続ける“腸炎惹起性メモリーT細胞”に着目し、その維持機構における IL-7/IL-7 受容体(IL-7R)シグナルの重要性を証明してきた。本研究において IBD に対する IL-7/IL-7R シグナルターゲット療法の実現化のために、1) 腸炎惹起性メモリーT細胞における IL-7R 発現制御機構の解明（より有効な治療標的分子の網羅的検索）、2) 腸炎モデルT細胞および非T細胞における IL-7/IL-7R シグナル重要性の比較検討（より有効な治療標的細胞の検索、より安全で確実な治療法の開発）を行った。正常マウスおよび腸炎マウスにおいて IL-7Ra は CD4+T 細胞に最も高発現しており、腸炎の発症とともに CD4+T 細胞では IL-7Ra の発現が亢進した。IBD の遷延性における重要な因子である IL-7/IL-7R シグナルには CD4+T 細胞における IL-7Ra 発現が必須であり、炎症性腸疾患の分子ターゲット療法として CD4+T 細胞における IL-7/IL-7R シグナル阻害が有力な標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

As the final goal for the development of epoch-making radical treatment to inflammatory bowel disease (IBD), we have focused "colitogenic memory T cell" that continues being underlying in the body throughout the life. We have then proved the importance of the IL-7/IL-7 receptor (IL-7R) signal in the mechanism for the maintenance of colitogenic memory T cell and the importance of IL-7R signaling in colitis model. IL-7Ra was expressed in CD4+T cell in both normal mouse and colitis mouse. And the expression of IL-7Ra was up-regulated in the CD4+T cell with the onset of the colitis. These results suggested that IL-7/IL-7R signal in the CD4+T cell might be novel target for the therapy of the inflammatory bowel diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：IL-7, IL-7R, メモリーT細胞, 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

IBD は、再燃と緩解を繰り返し生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる難病である。近年我が国の患者数は増加の一途をたどるが、未だに原因不明で根本的な治療がなく、病態解明と新規治療法の開発は社会的にも重要な責務である。IBD は従来から消化管に限局した疾患として捉えられ、内科的な治療の継続が困難な症例に対しては外科的局所切除が必要とされてきた。しかし IBD の病態は術後緩解状態にリセットされる一方で、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ことが知られている。このような背景に我々は本疾患を単なる消化管の炎症としてとらえるのではなく、疾患を“記憶”した、腸内細菌抗原に過剰に反応する病原性メモリー T 細胞が全身に播種された“良性白血病”ともいべき全身性疾患と捉える概念を提唱してきた。炎症局所を切除しても全身に潜在する病原性メモリー T 細胞が残存する限り、疾患の“記憶”は失われることなく再燃することとなる。我々の研究の最終目的は炎症性腸疾患における全身性病原性メモリー T 細胞をターゲットとした、疾患の“記憶”を“リセットする”究極の根治療法の開発である。このような最終目的にむけて我々は今までに主に炎症性腸疾患における病原性メモリー T 細胞の維持機構について以下の点を解明してきた。

(1)腸炎モデルマウスにおいて腸炎惹起性メモリー CD4⁺T 細胞が腸管に多数浸潤し、骨髄など全身のリンパ装置によって維持されている

我々はこれまでに複数の腸炎モデルマウスにおいて腸管局所に多数の CD44⁺CD62L⁺CD45RB^{low}メモリータイプの CD4⁺T 細胞が浸潤しており、これらの細胞を新たな RAG^{-/-}マウスあるいは SCID マウスに再移入することで腸炎が再現されることから、我々は本細胞を腸炎惹起性メモリー T 細胞と定義づけた。(Nemoto Y, et al. Gastroenterology 2007.) CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入腸炎モデルマウスにおいては腸炎惹起性メモリー T 細胞を 5 世代まで新たな SCID マウスに再移入しても大腸炎が再現されることが確認されており(Totsuka T et al, Eur J Immunol 2008.)、腸炎永続性において重要な役割を果たすと考えられる。またこれらの細胞は脾臓、腸間膜リンパ節、さらには骨髄において、長期にわたり維持されており IBD に対する局所療法や一時的な免疫抑制

療法は無効であると考えられた。(Nemoto Y, et al. Gastroenterology 2007. Nemoto Y, et al, J Immunol 2009.)

(2)腸炎惹起性メモリー T 細胞は IL-7R を高発現し、in vitro および in vivo において IL-7 依存的に維持される

これまでに基礎系の研究者らによって IL-7 がメモリー CD4⁺T 細胞の生存に必須であることが明らかとされたが (Bradley LM, et al. Trends Immunol. 2005)、我々は独立して、IBD の一連の研究で IL-7 が腸管上皮細胞から産生されることを発見した。(Watanabe M, et al. JCI 1995.) CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入腸炎モデルマウスの腸炎惹起性メモリー T 細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーにおいて検討したところ IL-7R α を高発現し、in vitro における生存と増殖には IL-7 が必須であった。

(Okada E, et al. Am J Physiol GI Liver 2005.) さらに、腸炎惹起性メモリー T 細胞を IL-7^{-/-} x Rag-1^{-/-}マウスへの移入し、腸炎の発症認めなかったことより、慢性大腸炎永続性に IL-7 が必須であることを明らかとしてきた(Totsuka T, et al. J Immunol 2007)。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患 (IBD) の病態解明および画期的な根治療法の開発を最終目標として、我々はこれまでに疾患フェノタイプを“記憶”し、生涯にわたり生体内に潜在し続ける“腸炎惹起性メモリー T 細胞”に着目し、その維持機構における IL-7/IL-7 受容体 (IL-7R) シグナルの重要性を証明してきた。本研究において我々は IBD に対する IL-7/IL-7R シグナルターゲット療法の実現化のために、1) 腸炎惹起性メモリー T 細胞における IL-7R 発現制御機構の解明 (より有効な治療標的分子の網羅的検索)、2) 腸炎モデル T 細胞および非 T 細胞における IL-7/IL-7R シグナル重要性の比較検討 (より有効な治療標的細胞の検索、より安全で確実な治療法の開発) を行う。

3. 研究の方法

1) 腸炎惹起性メモリー T 細胞における IL-7R 発現制御機構の解明

1、腸炎および正常マウス腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞における IL-7R α 発現可塑性の比較検討 (担当: 根本)

正常マウスおよび IL-2^{-/-}マウス, IL-10^{-/-}マウス, TCR α ^{-/-}マウス, CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入マウスの脾臓、大腸腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞を磁気ビーズおよびセルソーターによって分取し、in vitro における培養系を構築

する。既に正常マウス生体内において IL-7R の発現を抑制することが知られている TCR シグナルと IL-7 を用いて抗 CD3 抗体単独刺激、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体併刺激、IL-7 単独刺激、抗 CD3 抗体/IL-7 共刺激による各細胞の IL-7R の発現をフローサイトメトリーによって検討する。より精密な IL-7R 発現のダイナミクスを観察する目的で、各種刺激の抗体、サイトカイン濃度を振り、タイムコースを追って検討する。これにより IL-7 および TCR 刺激に対する腸炎マウスおよび正常マウスの CD4⁺T 細胞 IL-7R 発現の反応性の相違が検討できるのみでなく、脾臓と腸管の臓器間の相違も観察可能である。また単一のモデルでなく、複数の腸炎モデルを用いることによって、得られた結果がユニバーサルな現象であるか検証できる。本研究は腸管粘膜内リンパ球の単離、培養、IL-7Rα のフローサイトメトリーによる検出に熟練している当研究室でこそ実現可能と思われる。

2、in vitro における CD4⁺T 細胞の IL-7Rα 発現制御因子の網羅的検索 (担当：岡田)

上記培養系が確立し、各種刺激によって IL-7R の発現が抑制される適正濃度および適切なタイムコースの観察ポイントを設定し種々の因子を付加して IL-7R 発現可塑性に及ぼす影響を検討する。腸管粘膜内腸炎惹起性メモリーT細胞の IL-7R 高発現を促進する因子としては下表左の4群が考えられる。絞り込みのため対応する右の因子を培養上清に付加し、スクリーニングを行う。スクリーニングによって絞り込まれた因子群をさらに分けて付加し、目的となる因子を同定する。

2) 腸炎モデルT細胞および非T細胞における IL-7/IL-7R シグナル重要性の比較検討

1、腸炎モデルマウスにおける IL-7R 高発現細胞の網羅的検索 (担当：岡田)

正常マウスおよび IL-2^{-/-}マウス、IL-10^{-/-}マウス、TCRα^{-/-}マウス、CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入マウスの CD4⁺T 細胞、B 細胞、他の血球系細胞、上皮細胞、間葉系細胞等の IL-7R の発現をフローサイトメトリー、免疫染色等で比較検討する。

2、T細胞特異的 IL-7R 欠損モデルの確立(担当：根本)

①IL-7Rα^{-/-}マウスおよび正常マウスより CD4⁺T 細胞の表面マーカー (CD62L, CD44, CD45RB 等メモリー/ナイーブマーカー、CD69, CD25 などの活性化マーカー、CD25,

Foxp3 等の制御性 T 細胞マーカー、Bcl-2, Bcl-xL など抗アポトーシス分子、TCR Vβレパトアシリーズ) を比較検討する。

②IL-7R α^{-/-}および正常マウス脾臓より CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞を分取し、in vitro における細胞分裂活性を CFSE および 3H-サイミジンを用いたプロリフェレーションアッセイにて検討する。

3、非T細胞特異的 IL-7R 欠損モデルの確立(担当：根本)

①IL-7Rα^{-/-}マウスと RAG2^{-/-}マウスを交配し、IL-7Rα^{-/-},RAG2^{-/-}マウスを作製する。

<平成23年度以降>

1) 腸炎惹起性メモリーT細胞における IL-7R 発現制御機構の解明

①in vivo における IL-7R 発現促進機構の検討 (担当：岡田)

前述の様に定義された IL-7R 発現促進作用を有すると考えられる因子に関しては、腸炎マウスに対する中和抗体等を用いたブロック実験を行い、腸炎惹起性メモリーT細胞の IL-7Rα発現を in vivo において減弱しうるか、またそれにより腸炎が改善するかを検討する。

2) 腸炎モデルT細胞および非T細胞における IL-7/IL-7R シグナル重要性の比較検討

①T細胞特異的 IL-7R 発現モデルにおける腸炎の誘導 (担当：岡田)

in vivo において下図実験1の移入実験を行い、8週間後に解析。腸炎スコア、病理スコア、各臓器の細胞数、細胞のメモリーフェノタイプ、Vβレパトア、IL-7R、腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞のサイトカイン分泌能等を解析する。

②非T細胞特異的 IL-7R 発現モデルにおける腸炎の誘導 (担当：岡田)

in vivo において下図実験2の移入実験を行い、8週間後に解析。腸炎スコア、病理スコア、各臓器の細胞数、細胞のメモリーフェノタイプ、Vβレパトア、IL-7R、腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞のサイトカイン分泌能等を解析する。

4. 研究成果

炎症性腸疾患(IBD)の病態解明および画期的な根治療法の開発を最終目標として、我々はこれまでに疾患フェノタイプを“記憶”し、生涯にわたり生体内に潜在し続ける“腸炎惹起性メモリーT細胞”に着目し、その維持機構におけるIL-7/IL-7受容体(IL-7R)シグナルの重要性を証明してきた。

本期間において我々はIBDに対する IL-7/IL-7Rシグナルターゲット療法の実現化のために、腸炎モデルCD4⁺T細胞およびCD4⁺細胞におけるIL-7/IL-7Rシグナル重要性の比較検討を行った。1) 正常マウスおよび腸炎

マウスにおいてIL-7R α はナチュラルキラー細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球等血球系細胞に広く発現していたが、CD4⁺T細胞に最も高発現していた。さらに腸炎の発症とともに他の血球系細胞ではIL-7R α の発現が低下するのに対してCD4⁺T細胞ではIL-7R α の発現が亢進した。2) CD4⁺T細胞のみIL-7R α ⁺マウス脾臓よりCD4⁺CD25⁺T細胞あるいはCD4⁺CD44⁺CD62L⁺T細胞をRAG-2^{-/-}マウスに移入したところ腸炎の発症が見られず、腸管粘膜におけるCD4⁺T細胞のアポトーシス亢進が見られた。3) IL-7R α ^{+/x}RAG-2^{-/-}マウスに正常マウスのCD4⁺CD25⁺T細胞を移入したところRAG-2^{-/-}マウスをレシピエントに用いた群と同等の腸炎を発症した。4)同数のLy5.1⁺IL-7R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺T細胞およびLy5.2⁺IL-7R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺T細胞をRAG-2^{-/-}マウスに移入したところ6週後に大腸炎を発症するもののLy5.1⁺IL-7R α ^{+/+}細胞の著明な減少を認めた。5)4)の実験において腸炎マウス大腸粘膜由来IL-7R α ^{+/+}CD4⁺T細胞はIL-5.1⁺IL-7R α ^{+/+}細胞と同等のIFN- γ /IL-17産生能を有し、IL-7/IL-7Rシグナルはエフェクター能の発現には必須ではない事が分かった。

以上の結果からIBDの遷延性における重要な因子であるIL-7/IL-7RシグナルにはCD4⁺T細胞におけるIL-7R α 発現が必須であり、他の細胞におけるIL-7R α の発現は必須ではない事がわかった。炎症性腸疾患の分子ターゲット療法としてCD4⁺T細胞におけるIL-7/IL-7Rシグナル阻害が有力な標的となり得ることが示唆された。

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5件)

1: Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Watanabe M. Modified single-operator method for double-balloon endoscopy. Dig Endosc. 2012 24(6):470-4. 査読有
doi: 10.1111/j.1443-1661.2012.01321.x.

2: Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Suzuki S, Akiyama JM, Fujii T, Okamoto R, Watanabe M. Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy for the diagnosis of inverted Meckel's diverticulum: a case report. J Med Case Rep. 2012 28;6(1):328. 査読有
doi: 10.1186/1752-1947-6-328.

3: Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Toriihara A, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe M. Magnetic resonance enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2011 17(5):1063-72. 査読有
doi:10.1002/ibd.21510.

4: Iwasaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Zheng X, Kano Y, Okamoto E, Okada E, Araki A, Suzuki S, Sakamoto N, Kitagaki K, Akashi T, Eishi Y, Nakamura T, Watanabe M. Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4. J Gastroenterol. 2011 Feb;46(2):191-202. 査読有 doi: 10.1007/s00535-010-0346-x.

5: Okada E, Araki A, Suzuki S, Watanabe H, Ikeda T, Watanabe T, Kurata M, Eishi Y, Watanabe M. Histological Diagnosis of Follicular Lymphoma by Biopsy of Small Intestinal Normal Mucosa. Dig Endosc. 2012 22. 査読有
doi:10.1111/j.1443-1661.2012.01386.x.

[学会発表] (計1件)

① 岡田英理子 ダブルバルーン内視鏡を用いた潰瘍性大腸炎患者の小腸所見の検討
第81回日本消化器内視鏡学会総会
2011年8月18日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 英理子 (OKADA ERIKO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20376784

(2) 研究分担者

根本 泰宏 (NEMOTO YASUHIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 20456213
渡辺 守 (WATANABE MAMORU)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 10175127