

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21179

研究課題名(和文)新規培養法を用いて同定したマーカーは炎症性腸疾患の治療ターゲットとなりうるか？

研究課題名(英文) Can the cell surface marker detected by our new culture system be a therapeutic target for inflammatory bowel disease (IBD)?

研究代表者

高原 政宏 (Takahara, Masahiro)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80738427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 独自に開発した新規培養法で同定したマーカー、CD25に関して、炎症性腸疾患の治療ターゲットになりうるかどうかを検討した。腸炎マウスの腸管粘膜CD4T細胞(LPCD4+Tcells)を刺激下で培養し、その後、炎症性サイトカインの産生をCD25陽性、陰性の部分で比較検討した。また、LPCD4+ TcellsをCD25陽性、陰性に分けて、腸炎惹起能を検討した。

CD25には、CD4+CD25+Foxp3+の制御性T細胞の分画を含まれるため、この分画を除いて検討したところ、サイトカイン産生においては、両群に違いはなかった。腸炎惹起能においては、検討中である。

研究成果の概要(英文)： We investigated whether CD25, which was detected by our new culture system, could be a therapeutic target on inflammatory bowel disease. The lamina propria (LP) CD4+ T cells of colitis mice were cultured under standard mitogen stimulation and collected. The collected LPCD4+ T cells were compared to the inflammatory cytokines productions by flow cytometric analysis. Additionally, we sorted CD25 positive and negative cells from LPCD4+ T cells of colitis mice and transferred each fractions separately into new immunodeficiency mice and compared the severity of colitis.

As the CD25 positive cells contain CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells (Treg cells), we excluded the Treg cells fraction and compared the inflammatory cytokines production with the CD25 negative cells. The cytokines production was not different between the Treg negative CD25 positive cells and the CD25 negative cells fraction. We are now investigating the in vivo experiments.

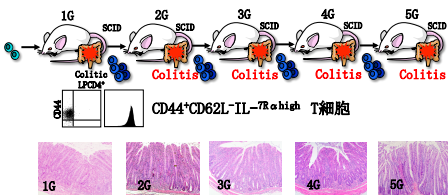
研究分野： 消化器病学 炎症性腸疾患 粘膜免疫

キーワード： CD25 CD4+T細胞 制御性T細胞 炎症性腸疾患

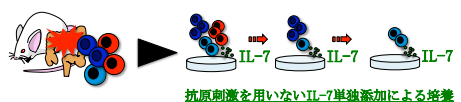
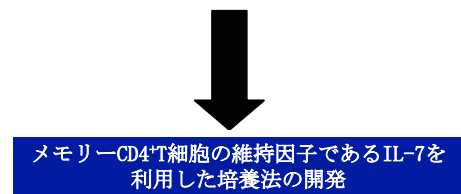
1. 研究開始当初の背景

- ① 炎症性腸疾患は慢性的な消化管の炎症を主体とし、再発・寛解を繰り返し、未だ根本治療がない難治性疾患である。難治性の原因として寛解期においても生体内で長期にわたり生存する“病原性メモリーCD4⁺T細胞”の関与が考えられている。すなわち、この“病原性メモリーCD4⁺T細胞”が存在する限りは、治療により寛解に至っても、再燃を繰り返すこととなる。このため、この細胞こそ真の治療ターゲットであり、この細胞を制御することがIBD根治療法に繋がるのではないかと考えられているが、“病原性メモリーCD4⁺T細胞”をターゲットにした有効な治療は現在確立されていない。
- ② CD4⁺CD45Rb^{high} 移入腸炎マウスモデルにおいて、大腸粘膜固有層に多数浸潤しているCD4⁺T細胞が、長期生存能、腸炎惹起能を有する特徴をもっており、“病原性メモリーCD4⁺T細胞”と考えられている。申請者は、メモリーCD4⁺T細胞の維持にはIL-7が必要な要素であることをヒントにCD4⁺CD45Rb^{high} 移入腸炎マウスモデルの腸管粘膜内CD4⁺T細胞(LPCD4⁺T細胞)から、IL-7のみを単独添加する新規培養法を確立した。この培養法で培養した後の細胞は、腸炎惹起能を有し、より長期間培養した方が、腸炎惹起能が高いことがわかった。

腸炎モデルマウス腸管粘膜内CD4⁺T細胞の移入により5世代まで腸炎が再現される

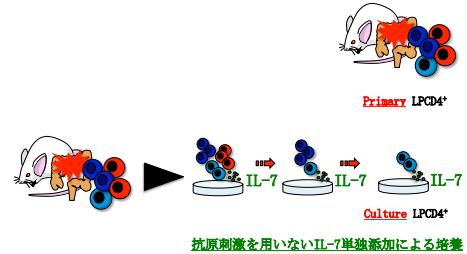


大腸粘膜内CD4⁺T細胞=病原性メモリーT細胞

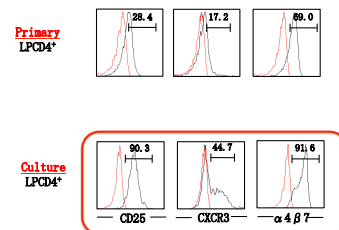


メモリーT細胞維持因子IL-7単独添加による生存能/腸炎惹起能の高い細胞の純化

- ③ 新規培養法で培養した細胞は、CD25、 $\alpha 4 \beta 7$ 、CXCR3を高発現しており、中でもCD25は著名に高発現していた。これらのマーカーは生存能/腸炎惹起能の高い細胞のマーカーになることが示唆された。



培養前後で発現するマーカーの違い



培養後細胞は、CD25、CXCR3、 $\alpha 4 \beta 7$ を高発現

2. 研究の目的

本研究は、新規培養法で同定した上記マーカーが炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)の病態に深く関わっているか、また、新規の治療ターゲットとなりうるかを検証し、新たな治療標的の基盤となることを目的とした。我々が同定したマーカーのうち、 $\alpha 4 \beta 7$ に関しては、抗体製剤として使用される予定であり、また、CXCR3も有用性に関する報告があるため、CD25に絞って検討することにした。

3. 研究の方法

- ① 同定したマーカーは、IL-7単独下での培養下により人工的に発現が亢進した可能性も否定できないため、IL-7単独培養前の細胞においても評価する必要がある。このため、LPCD4⁺T細胞から、目的のマーカーの炎症性サイトカインの発現の差異をフローサイトメトリー

で検討した。

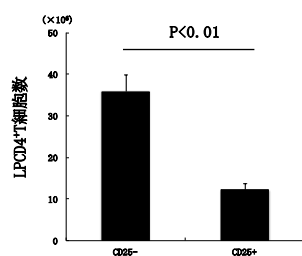
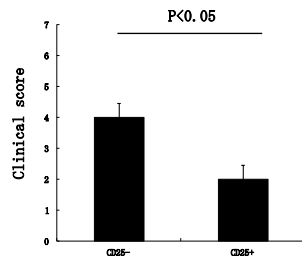
- ② 慢性腸炎マウスモデルの LPCD4⁺T 細胞から、CD25 を含む分画と除いた分画を分取し、新たな免疫不全マウスに移入することで、各分画の腸炎惹起能を比較検討した。

4. 研究成果

- ① 慢性腸炎マウスモデルの LPCD4⁺T 細胞を PMA、Ionomycin の刺激下で約 1 2 時間培養、その後、細胞を回収した。その後、この腸炎マウスモデルで分泌される主要な炎症性サイトカインである IFN- γ 、IL-17A 産生細胞を、CD25 陽性、陰性の分画に分けて、フローサイトメトリーを用いて測定した。IFN- γ 、IL-17A 産生細胞共に、CD25 陽性、陰性群で大きな変化は認めなかった。

CD25 に関しては、培養前細胞には細胞内転写因 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の分画 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) が存在するため、この分画を除いて検討する必要がある。そこで、同様な条件下で、制御性 T 細胞を除いて、IFN- γ 、IL-17A 産生細胞を評価したが、CD25 陽性、陰性群で大きな変化は認めなかった。

- ② 慢性腸炎マウスモデルの LPCD4⁺T 細胞を CD25 陽性、陰性の分画に分けて分取し、新たな免疫不全マウスに移入することで、各分画の腸炎惹起能を比較検討した。腸炎の重症度や腸管粘膜の細胞数や炎症性サイトカイン産生細胞を評価したが、CD25 陽性を移入したマウスの方が、腸炎の程度が軽かった。



今回の検討は制御性 T 細胞の分画を含んだ検討であった。腸炎の抑制に腸管粘膜に誘導された制御性 T 細胞も重要であることは示唆されたが、当初の目標を検討するには制御性 T 細胞の分画を除いた検討が必要である。制御性 T 細胞の分画の一つである Foxp3 は細胞内の転写因子であり、生細胞のまま、この分画を分取することはできない。このため、制御性 T 細胞を生きのまま分取できる Foxp3 レポーターマウスを使用しての検討が必要である。現在、このレポーターマウスを入手し、サイトカインの検討の再検も含めて、検討を行っている。

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)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高原政宏 (Takahara Masahiro)

岡山大学 医学部 客員研究員

研究者番号：80738427

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
高木 章乃夫 (Takaki Akinobu)
平岡 佐規子 (Hiraoka Sakiko)