

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19926

研究課題名(和文) ヒト腸管粘膜固有層のCD14陰性マクロファージの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of CD14 negative macrophages in human intestinal mucosa

研究代表者

武田 昂樹 (Takeda, Koki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20768965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌症例非癌部腸管において細分化した後、May-Giemsa染色をしたところ、CD14+MおよびCD14-Mともに形態学的には内部に小胞を有するN/C比が比較的大きい細胞であった。Phagocytosis assayではCD14+M、CD14-Mともに末梢血単球に比較し貪食能が軽微であったが、CD14-MはCD14+Mに比較し貪食能は低かった。クローン病ではCD14-Mは炎症状態の腸管では減少し、CD14+Mは炎症状態の腸管では増加していた。上記結果よりCD14-Mは貪食能が弱く炎症性腸疾患において減弱していることから、免疫寛容の働きを持っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As a result of May-Giemsa staining, both CD 14 + M and CD 14-M morphologically were cells with relatively small N / C ratio with vesicles inside. In the Phagocytosis assay, phagocytotic capacity of CD14 + M and CD14-M was slight compared to peripheral blood monocytes, but CD14-M had lower phagocytic ability than CD14 + M. In Crohn's disease, CD14 - M decreased in inflamed intestinal tract, CD 14 + M increased in inflamed state intestinal tract. From the above results, it is suggested that CD14 - M has a weak phagocytic ability and is attenuated in inflammatory bowel disease, so it may have the function of immune tolerance.

研究分野：抗原提示細胞

キーワード：抗原提示細胞 腸管粘膜固有層 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管における自然免疫と炎症性腸疾患

腸管組織における常在細菌・食餌抗原・病原体などの環境因子に対する免疫寛容と免疫応答のバランス保持が生体の恒常性維持に重要である。腸内常在細菌に対する免疫系の異常な活性化はクローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患 (IBD) の発症に深く関与することが報告されている。近年、自然免疫制御の破綻が獲得免疫系の異常を誘発することで IBD の病態形成に深く関与することがマウスおよびヒト腸管免疫系の解析から明らかとなりつつある。腸管組織には起源や機能の異なる多様な自然免疫細胞が局在しており、様々なパターン認識受容体により腸内常在細菌を認識し、多様なシグナル伝達経路を介して活性化が制御されることで腸管におけるエフェクターT細胞および制御性T細胞の分化に重要な役割を果たすと考えられている。

(2) マウスにおける腸管マクロファージと炎症性腸疾患の関連

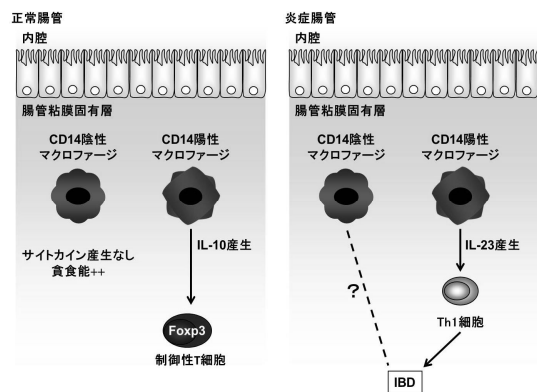
腸管マクロファージは多数の病原体が存在する腸管においてそれらの腸内細菌に対する過剰な免疫反応を引き起こさないように制御されていると考えられている。炎症性腸疾患では腸内細菌に対する腸管マクロファージの免疫制御機構が破綻し、腸内細菌に対し過剰な免疫反応が誘導されていると考えられる。すなわち、正常マウスの腸管マクロファージは IL-10 高産生の抑制性マクロファージであり、腸内細菌への過剰な免疫反応を制御する一方、炎症性腸疾患モデルである IL-10 ノックアウトマウスでは内因性 IL-10 の欠損のため腸管マクロファージが異常な分化を遂げ、腸内細菌に対し IL-12 や IL-23 といった Th1 誘導性のサイトカインを過剰産生する (Kamada N. J Immunol. 2005)。

(3) ヒトにおける腸管マクロファージと炎症性腸疾患についての関連

ヒト腸管組織においてマウスと同様の腸管免疫制御機構が機能しているかについては不明な点が多かったが、近年ヒト腸管免疫系の解析が進み、マウスで同定された自然免疫細胞サブセットに相当する細胞がヒト腸管組織に存在すること、さらにその機能と IBD 発症の関係が明らかになりつつある。腸管マクロファージに関してはヒトにおいては CD14 陽性マクロファージと CD14 陰性マクロファージが報告されている (Smith, P. D. Mucosal Immunol. 2011)。CD14 陽性マクロファージは腸内細菌刺激により過剰な IL-23 産生することで、腸管 T 細胞の過剰な活性化を誘導し、炎症形成に深く関わっているとされ

る (Kamada N. J Immunol. 2009)。

一方、CD14 陰性マクロファージは空腸で同定され、PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) を介した刺激によりサイトカインを産生することはなく、血中 monocyte を凌駕する最近貪食能を有すると報告されている (Smythies, L. E. J Clin Invest. 2005)。CD14 陰性マクロファージに関しては炎症性腸疾患に関連した報告はなく、炎症性腸疾患におけるその機能は解明されていないが、炎症性腸疾患においては腸管粘膜バリアの破綻により炎症性が惹起されるという報告 (Zhang J. Mucosal Immunol. 2014) があることを考慮すると、貪食能に優れた CD14 陰性マクロファージの機能が炎症性腸疾患の病態に何らかの関連を持っていると考えられる。

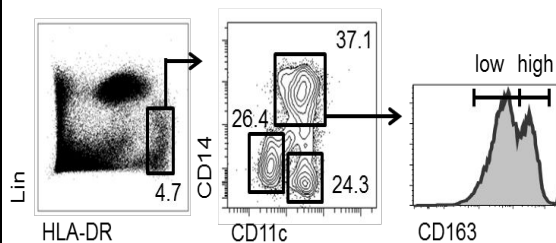


2. 研究の目的

CD14 陽性マクロファージは、炎症腸管において IBD の原因となると考えられている一方で CD14 陰性マクロファージと炎症性腸疾患の関連は明らかではない。そのため、炎症性腸疾患における CD14 陰性マクロファージの機能を解析するために以下の手法により CD14 陰性マクロファージと炎症性腸疾患の病態との関連を解明する。本研究では CD14-CD11c^{low} 細胞に腸管マクロファージが含まれると仮定し、ヒト腸管におけるこれら細胞集団の炎症性腸疾患に対する病態を明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

当科においてヒト腸管粘膜固有層に局在する抗原提示細胞の解析を行った結果、HLA-DR^{high}Lin⁻細胞には CD14-CD11c^{low}、CD14-CD11c^{high}、CD14+CD163^{low}、CD14+CD163^{high} で特徴づけられる4つの自然免疫細胞サブセットが存在することが分かった。



さらに CD14+CD163low を末梢血中のナイーブ T 細胞と共培養すると IL-17 産生性 CD4+T 細胞の分化が誘導されたことより、ヒト腸管粘膜固有層に局在する CD14+CD163low 細胞が IL-6, IL23p19, TNF, IL1- 依存的に Th17 細胞の分化を誘導することが明らかになり、マウスの CX3CR1intermediateCD11b+CD70+ に相当することが示唆されている (Ogino T. Gastroenterology 2013)。

本研究では、以下の3つのアプローチにて炎症性腸疾患における CD14 陰性マクロファージの機能を解析する。

CD14-CD11c low 細胞集団からよりマクロファージの性質に近い集団を抽出する。

抽出した細胞集団のサイトカイン産生能、貪食能、T 細胞誘導能を評価する。

炎症性腸疾患と正常腸疾患から得られた検体を用いて機能を比較解析する。

4. 研究成果

(1) CD14-CD11c low 細胞集団からよりマクロファージの性質に近い集団の抽出

大腸癌症例非癌部腸管において CD13 による CD14-CD11c low 細胞の細分化を行った。採取した細胞を表面抗原マーカー (lineage marker) (CD3, CD16, CD19, CD20, CD56), CD11c, CD13, HLA-DR) で染色し FACS により展開し、Lin-HLA-DR+CD11c low CD14+ (CD14+M)、Lin-HLA-DR+CD11c low CD14-CD13+ (CD14-M) を sorting した。

Lin-HLA-DR+ 細胞に占める CD14-M と CD14+M の population はそれぞれ約 30% および 10% であり、CD14-M の方が多い結果であった。これらの細胞を May-Giemsa 染色をしたところ、CD14+M および CD14-M とともに形態学的には内部に小胞を有する N/C 比が比較的大きい細胞であり、両者ともに貪食能を持っていることが示唆された。また、sorting した細胞の cDNA ライブラリーを作成した。

当初、当研究室で行われているプロトコルで抗原提示細胞を採取し、FACS を行っていたが、本研究で対象とする CD14-M の採取が一定しないことが問題となった。原因としてはサンプルサイズにより採取できる腸管粘膜固有層の単核球の数が限られており、採取できる細胞数が少ないためと考えられた。また、CD13 による細分化を行う際にうまく FACS で細胞群を展開できず、実験系を確立するのに時間を要した。

細胞数が少なければ sort 後の実験に支障をきたし十分な解析が行えない。特に mRNA 抽出においては細胞数が少なすぎ quality のよい十分な mRNA が抽出できず、cDNA ライブラリーの作成は困難を極めた。検体入手が手術症例であるため手術の有無及び切除腸管の大きさ、術前の腸内環境が実験施行及び実験結果に大きく影響している。また、大腸の部位や術前の患者の栄養状態を含めた全身

状態、基礎疾患によっても抗原提示細胞の population に違いがあり、十分な症例数を用いて解析する必要があると考えられる。今後、炎症性腸疾患においても同様の細胞を採取し、解析する必要があるが、炎症性腸疾患の手術症例は大腸癌の症例数に比し少なく検体入手はさらに困難を極めると考えられる。上記の制約下でも検体の酵素処理および sorting 方法の見直しにより上記の実験実績を挙げることができている。

(2) 抽出した細胞集団のサイトカイン産生能、貪食能、T 細胞誘導能を評価する。

末梢血の単球 (CD45+CD14+) をコントロールとして、Alexa Fluor 488 に標識された大腸菌を用いて Phagocytosis assay を行った。CD14+M、CD14-M とともに末梢血単球に比較し貪食能が軽微であったが、CD14-M は CD14+M に比較し貪食能は低かった。

今後は sorting した CD14-M と CD14+M に TLR ligand による刺激を加え、サイトカイン産生を ELISA により解析する。CD14-M と CD14+M の局在を評価するため切除標本のパラフィンブロックを作製し、免疫染色により評価する。

(3) 炎症性腸疾患と正常腸疾患から得られた検体を用いて機能を比較解析する。

クローン病で腸管切除を行った3例の切除検体を用いて非炎症部および炎症部より上記と同様の方法で CD14+M と CD14-M を回収した。CD14-M は炎症状態の腸管では減少し、CD14+M は炎症状態の腸管では増加していた。上記結果より CD14-M は貪食能が弱く炎症性腸疾患において減弱していることから、免疫寛容の働きを持っている可能性が示唆された。

今後は炎症性腸疾患の手術症例を用いて CD14-M と CD14+M の cDNA ライブラリーを作成し、qRT-PCR によりサイトカインと TLR の mRNA の発現解析を行う。さらに TLR リガンドによる刺激によるサイトカイン産生を ELISA により解析し、Naïve T cell との共培養により T 細胞の分化誘導能を評価する。

また、CD14-M と CD14+M の細胞の局在を免疫染色により評価する。上記解析の結果を正常腸管における解析と比較検討し、炎症性腸疾患における CD14-M と CD14+M の機能を明らかにする。ただし、炎症性腸疾患の症例は限られており、検体入手に難渋することが予想される。そのため他施設から検体入手が可能となるよう手配を進めているところである。

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)
取得状況(計 0 件)
〔その他〕
ホームページ等(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 昂樹 (TAKEDA, Koki)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20768965

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし