

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19390137

研究課題名 (和文) 腸管局所樹状細胞における抑制性シグナルの同定と炎症性腸疾患

研究課題名 (英文) Regulatory signaling in intestinal dendritic cells preventing inflammatory bowel diseases

研究代表者

本田 賢也 (HONDA KENYA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60334231

研究成果の概要：

腸管樹状細胞を機能的に細分化し、シグナル伝達機構を明らかにし、炎症性腸疾患との関わりを検討することを目的として研究を推進した。新たに CD70 が活性化型と抑制型樹状細胞を区別するバイオマーカーとして利用できることが明らかにした。CD70 は消化管粘膜固有層特異的に存在する樹状細胞集団の一部において高発現しており、他の臓器にはそのような細胞を認めなかった。更に CD70 陽性粘膜固有層樹状細胞は、細胞外 ATP の受容体である P2X や P2Y 受容体を高発現しており、ATP 刺激によって、共培養したナイーブ CD4 T 細胞を IL17 を高産生する TH17 細胞へと分化させることも見出した。即ち CD70 陽性粘膜固有層樹状細胞は“活性化型樹状細胞”であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：サイトカイン・粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

クローン病(CD)や潰瘍性大腸炎(UC)は特定疾患に指定されている免疫難病であり、その膨大な医療費は社会問題となっている。現在の治療法は、免疫抑制薬や副腎ステロイドが中心であり、一定の効果はあるものの、免疫系全体に対する抑制作用などの副作用が患者にとって不利に働くことが少なくない。また、非常に厳しい食事療法は患者の QOL を大きく低下させるものである。したがって、より選択的、特異的で副作用の少ない治療法を開発することは緊急の課題となっている。

腸内抗原が侵入した際の、免疫系活性化と

抑制の双方の舵をとっているのは、腸管局所に存在する樹状細胞であると考えられる。近年、Toll like receptor (TLR) を介するシグナル伝達経路の解明が急速に進み、それによる樹状細胞の“活性化”機構は分子レベルで理解されてきている。我々もこれまで、インターフェロン制御因子(IRF)ファミリー転写因子群の機能を包括的に解析することで、樹状細胞の活性化誘導メカニズムの解明に貢献してきた。即ち、IRF 分子は 9 つのファミリー分子から構成されるが、中でも IRF1, IRF3, IRF5, IRF7 が TLR による遺伝子発現に必須であり、かつそれぞれが固有の遺伝子群を制御しているため、樹状細胞の多彩な活

性化プログラム発動の根幹を担っていることを示してきた (Honda et al., Nature 434:1035-1040, 2005, Honda et al., Nature 434:772-777, 2005, Negishi et al., PNAS 103: 15136-15141, 2006, Honda et al., Nature Reviews Immunology 6:644-658, 2006, Honda et al., Immunity 25:349-360, 2006)。したがって IRF ファミリー分子は、NF- κ B と同様、樹状細胞活性化シグナルの中軸を担っていると言つて良いと考えられる。

一方最近、副腎ステロイドは、IRF3 と NF- κ B を抑制のターゲットとしていることが報告されている(例えば Cell 122:707-721, 2005)。また、IRF5 や IRF7 の活性化上昇が、自己免疫疾患の感受性を高めているという genetic エビデンスも報告されている(例えば Nat Genet. 38:550-355, 2006)。更に腸管に於いては、腸内細菌叢による TLR を介する恒常的な刺激が、免疫系を活性化するよりむしろ腸管の恒常性を保っているとの報告もある(例えば、Cell, 2004, 118, 229-241)。こうした事実は、健全な消化管局所においては、IRF 転写因子をはじめとする活性型転写因子群を抑制する内因性の抑制性因子が存在していることを強く示唆している。しかしながら、樹状細胞があらゆる外的刺激に応じて如何にしてシグナルを制御しているか、その理解は甚だ不十分であり、特に抑制メカニズムについては殆ど分かっていない。

腸管樹状細胞には、活性型樹状細胞集団と抑制型樹状細胞集団が存在するというエビデンスが報告されている。この腸管特異的“抑制性樹状細胞”とよぶべき樹状細胞の一亜群が免疫抑制(トレランス誘導)の根幹を担っていると考えられ注目されているものの、その細胞マーカーが同定されていないため、抑制性シグナル伝達機構の本質が理解されにくい状況にあった。したがって、腸管局所環境における自然免疫系発動と抑制の有機的な連携に関与する新たな細胞と新たなファクターの同定は、炎症性腸疾患の病態理解と治療法の開発のブレークスルーとなる可能性があった。

2. 研究の目的

腸管における免疫系抑制機構については、IL-10 や TGF- β によるシグナルと、それによる転写因子 Stat3 や Smad 分子の活性化が重要との考えが主流である。しかしながら、Stat3・Smad が如何にして免疫系を抑制するのか、こうした既知の分子においてすらそのメカニズムの理解は不十分である。腸管局所において厳密に調整されている複雑なネットワークの制御メカニズムの根幹は、局所の細胞とその細胞内における活性型・抑制型シグナル伝達分子の時空間的制御にあると考えられる。従つて従来の如く、Cell line や骨

髄細胞を用いた培養細胞を用いた研究では不十分であり、腸管に局在する樹状細胞を *in vivo* で解析出来るシステムを構築し、その上で細胞内におけるシグナルの時空間制御メカニズムを検討することが必要である。

本研究においては、まず腸管特異的抑制性樹状細胞の characterization を行うことが第一目標である。これまで抑制性樹状細胞は抑制性サイトカインである IL-10 を多量に分泌することが知られているため、IL-10 遺伝子領域に GFP を knock-in したマウスを作製する。これにより GFP を indicator として抑制性樹状細胞を *in vivo* で characterize することが可能となる。さらに腸管抑制性樹状細胞における IRF 抑制因子を網羅的・系統的に検索・同定する。同定した分子について、遺伝子改変マウスを作製し、詳細に検討する。そして、上記によって同定した新規因子とともに、現在までに腸管における抑制性シグナルとして確立されている IL-10 や TGF- β によるシグナルとその転写因子である Stat3 や Smad 分子の機能について、タイムラプスイメージングによる時空間ダイナミクスの解析を行う。つまり、従来のような単純なシグナル伝達経路の解析ではなく、細胞内小器官がそれぞれに特異的にシグナルの質、長さ、強さを厳密にコントロールする場を提供しているという概念に立ち、抑制性分子の機能解析を行う。また、遺伝子誘導プロファイリングも行い、核内での抑制機構も詳細に検討し、抑制性分子の機能を明確にする。

以上で得られた結果を基に、炎症性腸疾患モデルマウス或いは実際の臨床検体を用い、抑制性シグナルと抑制性樹状細胞の疾患との関わりを検討し、炎症抑制のための選択的、特異的で副作用の少ない治療法の開発を目指す。

即ち、本研究は IRF 転写因子ファミリーの自然免疫制御におけるこれまでの細胞レベルでの研究成果を進展させ、腸管局所環境における自然免疫系発動と抑制の有機的な連携に関与する転写因子の時空間的活性化機構を、生体レベルで明らかにする事を目的としている。それは、単にノックアウトマウスのフェノタイプ解析ではなく、最新の細胞・分子動態イメージングを取り入れ、従来とは異なった視点から免疫応答系における時空間的解析を試みるものである。これによって免疫の制御機構に新しい展開をもたらすことが期待され、学術的にも大きな意義を持つと考えられる。

3. 研究の方法

腸管における抑制性樹状細胞を *in vivo* で characterize するとともに、抑制シグナル伝達機構を時空間的制御の観点から明らかにし、炎症性腸疾患との関わりを検討するため、

以下の方法により研究を推進した。

(1) 腸管樹状細胞の characterization

従来我々が行ってきた手法を駆使して、特に腸管における抑制性樹状細胞の characterization を行った。これまで抑制性樹状細胞は抑制性サイトカインである IL-10 を多量に分泌することが知られている。このことを手がかりとして、新たな抑制性樹状細胞のマーカーを検索することから研究を開始した。具体的には、まず、IL-10 遺伝子領域に蛍光タンパク質 Venus をノックインしたマウスを作製した。これにより Venus を indicator として、組織内での抑制性樹状細胞の局在や挙動を観察する事ができる。また、抑制性樹状細胞を sorting することが可能となり、in vitro での刺激に対する応答性を検討できる。

作製した IL-10-Venus ノックインマウスを詳細に検討したところ、樹状細胞集団に於いて IL-10 を発現するものは、殆ど認められなかった。そこで、まず、様々な抗体を用いた FACS 解析及び免疫組織染色→Sorting→機能解析、というサイクルを繰り返し、活性化型と抑制型樹状細胞を区別するバイオマーカーの同定を試みた。

同定したバイオマーカーを用いて Sorting した消化管樹状細胞の遺伝子発現プロファイリングを Gene chip をもちいて行った。抑制性樹状細胞をさらに効率よく単離解析する手段を確立すると同時に、詳細に抑制性樹状細胞の特徴を検討した。また、共培養した CD4 陽性 T 細胞の分化に与える影響を検討した。さらに疾患との関連を検討するため、ex vivo での遺伝子操作(レンチウイルスベクターを用いた)を試み、in vivo 移入実験による機能解析を試みた。

(2) 腸管炎症に与える影響

同定した樹状細胞は TH17 細胞誘導性樹状細胞であった。そこで腸炎モデルにおけるその影響を検討した。

(3) 新規 IRF 抑制性因子、Stat3、Smad 分子の機能解析

現在までに消化管に於いて抑制性シグナルとして確立されている IL-10 や TGF- β によるシグナルと、その転写因子 Stat3・Smad 分子の機能につき詳細に検討した。まず、IRF ファミリー分子或いは NF- κ B ファミリー分子との相互作用を検討した。蛍光タグを付けた分子を用い、分子間蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer ; FRET) 解析による細胞質における複合体形成の検討も行った。さらに Kaede と呼ばれる特徴ある蛍光蛋白質などを十分に活用し、タイムラプスイメージングによる抑制性分子の時空間ダイナミクスの解析を行った。この際、FRET 技術をベースとして、

Stat3 や Smad 分子の活性化状態を生きた細胞の中で追跡できる分子プローブの開発・活用も試みた。これにより in vivo で免疫系情報伝達分子の時空間ダイナミクスの解明を試みる事が可能となると考えた。

以上により IRF ファミリーメンバーの幾つかが、Stat3 と結合し、その活性を制御することを見いだした。逆に Stat3 が IRF ファミリー分子の活性を制御することも見出した。これを基に、IRF 遺伝子欠損マウスあるいは Stat3 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、その相互作用の生理的役割について検討した。

4. 研究成果

TNF 受容体ファミリーに含まれる CD70 が、消化管粘膜固有層の樹状細胞の、活性化型と抑制型とを区別する新たなバイオマーカーとして利用できることを明らかにした。CD70 は、消化管粘膜固有層特異的に存在する樹状細胞集団の一部において高発現しており、他の臓器にはそのような細胞を認めなかった。

更に CD70 陽性粘膜固有層樹状細胞は、細胞外 ATP の受容体である P2X や P2Y 受容体を高発現しており、実際 ATP 刺激に対して、IL6, IL23p19 等の炎症性サイトカインを高産生した。さらに ATP 刺激は、TGF β 活性化に関わる Integrin- α V と Integrin- β 8 を、CD70 陽性細胞に於いて強く発現誘導することもみいたした。さらに ATP 刺激された CD70 陽性樹状細胞は、共培養したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、IL17 を高産生する TH17 細胞へと分化させることも見出した。即ち CD70 陽性粘膜固有層樹状細胞は、TH17 細胞を強く誘導する“活性化型樹状細胞”であると考えられた。これらを論文として発表した (Nature. 455:808-12, 2008 等)。

一方 CD70 陰性粘膜固有層樹状細胞は、IL-10 産生性制御性 T 細胞を誘導しやすい“抑制型樹状細胞”であると考えられるデータも得られた。すなわち、免疫抑制性サイトカインである IL-10 遺伝子領域に Venus を knock-in したマウスを作製し、詳細に検討したところ、消化管粘膜固有層に存在する Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の多くが Venus 陽性であり、CD70 陰性粘膜固有層樹状細胞がその分化に関与していることを示唆するデータを得た (発表準備中)。

さらにこれら CD70 陽性・陰性粘膜固有層樹状細胞が、こういった分子メカニズムで TH17 細胞あるいは制御性 T 細胞を誘導しているのかを更に検討し、腸内細菌の刺激が重要であるというデータを得た (発表準備中)。

IRF ファミリーの機能解析に関しては、感染免疫応答や免疫細胞分化という文脈でさらに推進し、幾つかの知見を得た (Nature

Immunology 9: 34–41. (2008)やPNAS 105:20446-51. (2008)など)。

IRFファミリーメンバーとStat3との相互作用に関しては、特に制御性T細胞の機能における役割を中心に検討を進めた。それにより、Stat3と複合体を形成するIRFファミリーメンバーが、Foxp3陽性制御性T細胞の機能発揮に関与する可能性が示唆されるデータを得た(未発表)。

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. Honda K, Takeda K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol.* 2:187-96. (2009) 査読有り
2. Lang PA, Cervantes-Barragan L, Verschoor A, Navarini AA, Recher M, Pellegrini M, Flatz L, Bergthaler A, Honda K, Ludewig B, Ohashi PS, Lang KS. Hematopoietic cell derived interferon controls viral replication and virus induced disease. *Blood.* 113:1045-52. (2009) 査読有り
3. Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, Miller RC, Diemand S, Honda K, Kundig TM, Aguzzi A, Speck RF. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood.* 113:377-88. (2009) 査読有り
4. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K*, Takeda K*. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature.* 455:808-12. (2008) 査読有り
5. Negishi H, Osawa T, Ogami K, Ouyang X, Sakaguchi S, Koshiba R, Yanai H, Seko Y, Shitara H, Bishop K, Yonekawa H, Tamura T, Kaisho T, Taya C, Taniguchi T, Honda K. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *PNAS.* 105:20446-51. (2008) 査読有り
6. Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, Sato S, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M, Takeda K. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol.* 181:8521-7. (2008) 査読有り
7. Saito F, Kuwata H, Oiki E, Koike M, Uchiyama Y, Honda K*, Takeda K. Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *BBRC.* 375:113-8. (2008) 査読有り
8. Kayama H, Ramirez-Carrozzi VR, Yamamoto M, Mizutani T, Kuwata H, Iba H, Matsumoto M, Honda K, Smale ST, Takeda K*. Class-specific Regulation of Pro-inflammatory Genes by MyD88 Pathways and Ikbz. *J Biol Chem.* 283:12468-77. (2008) 査読有り
9. Mizutani, T., K. Tsuji, Y. Ebihara, S. Taki, Y. Ohba, T. Taniguchi*, K. Honda. Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling. *Exp Hematol.* 36:255-64. (2008) 査読有り
10. Kano SI., Sato K., Morishita Y., Vollstedt S., Kim S., Bishop K., Honda K., Kubo M., Taniguchi T. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and T(H)1 versus T(H)-17 differentiation of CD4(+) T cells. *Nature Immunology* 9: 34–41. (2008). 査読有り
11. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T*. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* 448:501-5. (2007). 査読有り

[学会発表] (計 5件)

1. 本田賢也、新幸二、竹田潔 腸内フロー

ラによる TH17 細胞誘導 第 82 回日本細菌学会総会 (2009 年 3 月 12 日、名古屋)

2. Kenya Honda, Koji Atarashi, Junichi Nishimura, Kiyoshi Takeda
“Extracellular ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation”
BMB2008 (2008 年 12 月 10 日、神戸)
3. Kenya Honda “Extracellular ATP activates intestinal lamina propria dendritic cells to induce TH17 cells” 第 10 回国際樹状細胞シンポジウム (2008 年 10 月 3 日、神戸)
4. Kenya Honda, Koji Atarashi, Junichi Nishimura, and Kiyoshi Takeda
“Extracellular ATP from commensal bacteria drives lamina propria TH17 cell differentiation” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (2008 年 4 月 22-26 日、New York).
5. Kenya Honda, Koji Atarashi, Junichi Nishimura, and Kiyoshi Takeda
“Extracellular ATP from commensal bacteria drives lamina propria TH17 cell differentiation” JSI-RCAI Workshop 2008 粘膜免疫機構の制御と破綻 (2008 年 3 月 14 日、横浜)

[図書] (計 1 件)

本田賢也「免疫系細胞における遺伝子発現の時空間制御」[免疫応答と免疫病態の統合的分子理解 南山堂 (谷口維紹、山本一彦編) 2007, p31-36]

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/ongene/project1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 賢也 (HONDA KENYA)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：60334231

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

竹田 潔 (TAKEDA KIYOSHI)
大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20309446

多屋 長治 (TAYA CHOUJI)
東京都医学研究機構・研究員
研究者番号：90175456

大場 雄介 (OHBA YUSUKE)
北海道大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30333503