

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590736

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における骨髄IL-7による病原性メモリーT細胞維持機構の解明

研究課題名（英文） Colitogenic memory T cells are maintained by IL-7-producing cells in bone marrow.

研究代表者

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・GCOE拠点形成特任教員

研究者番号：20456213

研究成果の概要（和文）：

本研究は炎症性腸疾患難治性・永続性の要因である疾患フェノタイプを記憶した“腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞”の維持機構を解明し、疾患記憶を“リセット”する究極の炎症性腸疾患根治療法の開発することを目標とする。今回の検討において以下の事を明らかにした。1) 腸内細菌抗原は腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞がエフェクター細胞へと分化し、腸炎を発症するためには必須の因子であるが、メモリーT細胞の維持においては必須ではなく、骨髄IL-7は腸内細菌抗原非依存的に腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を維持する事を、無菌マウスシステムおよび抗IL-7受容体抗体を用いたIL-7/IL-7受容体シグナルの中和実験によって証明した。2) 腸炎惹起性メモリーT細胞の維持機構における骨髄IL-7の必要十分性を、IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスへのIL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウス由来骨髄移植を行い、骨髄特異的IL-7発現RAG-2<sup>-/-</sup>マウスを作製し、CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T細胞移入腸炎を誘導することにより証明した。3) 骨髄間葉系幹細胞(MSC)を純化培養し、IL-7の発現を検討したところ本細胞が40世代以上の継代培養においてIL-7のmRNAを発現した。また蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーによる検討においてIL-7蛋白を発現することを示した。4) IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウス骨髄由来MSC(IL-7<sup>+/+</sup>MSC)とCFSEラベルを行った腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を供培養したところ、4週間以上にわたりメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の分裂、維持が確認された。一方IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウス骨髄由来MSC(IL-7<sup>-/-</sup>MSC)とメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の供培養群では分裂、維持が見られなかった。5) IL-7<sup>+/+</sup>MSCあるいはIL-7<sup>-/-</sup>MSCをIL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスへ移植し、3週後にCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T細胞を移入したところIL-7<sup>+/+</sup>MSC移植群のみ慢性大腸炎を発症し、同マウス骨髄においてIL-7産生細胞と接してCD4<sup>+</sup>T細胞が維持されていた。

以上の結果から腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の維持機構においては、骨髄に存在するIL-7産生性間葉系幹細胞が重要な役割を有することが示された。本知見は炎症性腸疾患難治性の要因として、腸管外リザーバー臓器の重要性を明らかにするのみならず、本機構をターゲットとした治療法の可能性を示唆する非常に重要な進歩である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to clarify the maintenance system of colitogenic memory CD4<sup>+</sup>T cells, which possess the “pathogenic memory” of inflammatory bowel disease, and to develop the epoch-making treatment for this disease.

We have proved following things. 1) Although intestinal bacteria is essential for the development of colitis and cytokine production from effector T cells, it is not essential for the maintenance of colitogenic memory CD4<sup>+</sup>T cells. 2) IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup> mice were transplanted with BM cells of RAG-1<sup>-/-</sup> (IL-7<sup>+/+</sup>→IL-7<sup>-/-</sup>) or IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup> mice (IL-7<sup>-/-</sup>→IL-7<sup>-/-</sup>). IL-7 mRNA and protein were detected in BM, but not in colon, of in IL-7<sup>+/+</sup>→IL-7<sup>-/-</sup> mice, but not from IL-7<sup>-/-</sup>→IL-7<sup>-/-</sup> mice. IL-7<sup>+/+</sup>→IL-7<sup>-/-</sup>, but not IL-7<sup>-/-</sup>→IL-7<sup>-/-</sup> recipients, transferred with CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T cells 4 weeks after transplantation, developed colitis. 3) Bone marrow mesenchymal stem cells (MSC), even over the 40<sup>th</sup> passage, expressed higher levels of IL-7 mRNA and protein than those of freshly isolated IL-7<sup>+</sup> BM cells. 4) Co-culture with IL-7 producing MSC induced extensive proliferation of

CFSE-labeled colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*. 5) CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cell-transferred IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup> mice previously transplanted with IL-7 producing MSC developed Th1/Th17-mediated colitis.

Collectively, IL-7 producing bone marrow MSC play the important role in the maintenance system of colitogenic memory CD4<sup>+</sup> T cells. These findings are the progress in the investigation of IBD pathogenesis, suggesting the possibility of novel effective treatment, which targets this system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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：(1)炎症性腸疾患 (2)IL-7 (3)メモリーT細胞 (4)骨髄 (5)腸内細菌

(6)無菌マウス (7)間葉系幹細胞 (8)CD4<sup>+</sup> T細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は炎症性腸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”ともいう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”は失われることは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病原性メモリーT細胞が腸管局所に多数浸潤する

我々は CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T 細胞移入大腸炎モデルマウスにおいて、CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>メモリーT細胞が脾臓、腸間膜リンパ節、腸管粘膜内に多数浸潤し、腸管粘膜内のCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞を新たな SCID マウスに再移入することにより同様に Th-1 type の大腸炎を発症することを発見し、本細胞を病原性メモリーT細胞と定義づけた (Kanai T, et al. Am J Physiol GI Liver. 2006.)。

#### ② 腸炎モデルマウスにおいて病原性メモリーT細胞の維持にIL-7の存在は必須である

我々は以前から IBD の一連の研究にて

IL-7 が腸管上皮細胞から産生される (Watanabe M, et al. JCI 1995)、腸炎惹起性病的メモリーCD4<sup>+</sup> T細胞の増殖因子であることを世界に先駆けて報告してきた (Watanabe M, et al. J Exp Med. 1998. Yamazaki M, et al. J Immunol. 2003)。また、腸炎惹起性 TEM細胞は *in vitro* においてその生存と増殖には IL-7 が必須であることを明らかとした (Yamazaki M, et al. J Immunol 2003, Okada E, et al. Am J Physiol GI Liver 2005.)。さらに、腸炎惹起性 TEM細胞を IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスに移入すると再び慢性大腸炎を発症持続するのに対して、IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスへの移入では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た (Totsuka T, et al. J Immunol 2007)。

#### ③ 腸炎モデルマウスにおいて骨髄は局所的IL-7によって病原性メモリーT細胞を維持するリザーバーとして機能する

以上の結果から我々は腸管外の臓器に IL-7 産生性の病原性メモリーT細胞のリザーバーが存在し、腸炎の永続性に重要な役割を果たすと考えた。そこで我々は IL-7 の主たる産生部位であり、近年一次リンパ装置だけでなく二次リンパ装置としての機能も報告される骨髄に着目した。骨髄が腸炎における病原性メモリーT細胞を維持するリザーバー臓器であると仮定した。CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T細胞移入6週後の慢性大腸炎マウスにおいて骨髄中 CD4<sup>+</sup> T細胞は全骨髄細胞中約 0.4% に存在した。同細胞は CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>high</sup> の effector-memory T細胞 (TEM) であ

った。大腸炎骨髄 CD4<sup>+</sup> T 細胞は細胞分裂活性 (BrdU 活性) と Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) 産生能を有した。さらに大腸炎骨髄 CD4<sup>+</sup> T 細胞を SCID マウスに再移入することにより慢性大腸炎を再び発症した。大腸炎骨髄 CD4<sup>+</sup> T 細胞は骨髄内で IL-7 産生細胞に隣接して存在した。腸炎骨髄 CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> 細胞を新規 SCID マウスに移入したところ大腸炎を発症した。さらに、IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup> マウスに腸炎骨髄 CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> 細胞を移入したところ、大腸炎は発症せず、骨髄 CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> 細胞の著減を認めた。以上の結果から慢性大腸炎において、腸炎惹起性 CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> 細胞は末梢血を介した血流動態によって骨髄に移行し骨髄内 IL-7 によって維持されていると考えられた (Nemoto Y, et al. Gastroenterology 2007)。

## 2. 研究の目的

以上の我々独自に見いだしてきた実験結果から我々は骨髄IL-7こそが炎症性腸疾患における病原性メモリーT細胞維持における重要因子であることを示唆してきた。そこで本研究プロジェクトでは炎症性腸疾患における骨髄IL-7による病原性メモリーT細胞の維持機構の解明のため以下の点を明らかにする。

### 1、無菌環境を利用した骨髄IL-7による病原性メモリーT細胞維持機構の腸内細菌抗原への非依存性の検討

前述のように炎症性腸疾患の病原性メモリーT細胞維持においてIL-7の存在は必須因子であるが一方で炎症性腸疾患の発症における必須因子として腸内細菌の存在が挙げられる。炎症性腸疾患にアンチバイオティクス、プロバイオティクス、プレバイオティクスといった、腸内細菌を調節する薬剤が有効であることは知られており、またほとんどの炎症性腸疾患モデル動物が無菌環境下では腸炎を発症しない事実からも腸内細菌抗原の存在は腸炎の発症と維持における必須因子であると考えられる。一方でこれまでの我々の検討により腸内細菌が存在しないと考えられる骨髄中においても病原性T細胞は維持されており、我々は今回、骨髄における病原性T細胞維持においてはIL-7のみが必須因子であり、腸内細菌の存在は必須ではないと仮定し、無菌環境下SCIDマウスにCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T細胞移入腸炎マウス由来メモリーT細胞を移入し、同細胞が骨髄において維持されるかを検討する。さらに移入4週後の無菌環境下マウスをSPF環境下に移行し、病原性T細胞の腸炎惹起性が維持されているか否かを検討する。

### 2、炎症性腸疾患における病原性メモリーT細胞維持における骨髄IL-7必要十分性の検討

これまでの研究で骨髄が IL-7 依存性に慢

性大腸炎モデルマウスにおける病原性メモリーT細胞のリザーバーとして機能することを示してきた。しかし、骨髄以外の腸管外IL-7産生臓器もリザーバー臓器として機能する可能性は未解決である。IL-7産生部位として知られている胸腺、肝臓、皮膚といった部位でのリザーバー機能の可能性を検討する必要がある。一方、慢性大腸炎発症永続性への骨髄IL-7唯一性、特異性についての検討を進展させたい。すなわち、骨髄IL-7のみが慢性大腸炎永続性に必須であるか否かを追求する目的に我々は骨髄移植を用いて骨髄にのみIL-7を発現するマウスを作製し、CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T細胞移入大腸炎モデルにおいて、腸炎が発症するか検討する。本実験により骨髄IL-7の腸炎永続性および病原性メモリーT細胞の維持における必要十分性を検討する。

## 3. 研究の方法

### 1、無菌環境を利用した骨髄IL-7による病原性メモリーT細胞維持機構の腸内細菌抗原への非依存性の検討

骨髄における腸炎惹起性メモリーT細胞の維持機構が腸内細菌抗原の非存在下においてもIL-7依存性に機能することを以下の実験によって証明する。

SPF環境下にて大腸炎を発症させたCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T細胞移入SCIDマウス大腸粘膜由来CD4<sup>+</sup>T細胞を以下の3群のマウスに移入し、大腸炎を発症するか検討する。

- A, 無菌環境 (Germ free : 以下 GF) の SCID マウス
- B, 無菌環境の SCID マウス→4 週後 SPF へ移動
- C, SPF SCID マウス

以上の実験に必要な無菌設備はヤクルト中央研究所と共同研究を行い、同研究所の設備を使用する。

### 2、炎症性腸疾患における病原性メモリーT細胞維持における骨髄IL-7必要十分性の検討

慢性大腸炎における骨髄中IL-7の重要性、すなわち骨髄にのみIL-7が存在すれば慢性大腸炎を発症しうると仮定し以下の実験を行う。

- ① IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスにIL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウス骨髄細胞移植を実施する。
- ② 上記骨髄移植成立後に各種臓器を採取、IL-7発現を高感度PCR法を用い骨髄のみのIL-7発現性を検討する。
- ③ ②のマウスに正常マウス脾臓由来CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T細胞を移入し大腸炎を発症するか検討する。
- ④ 更に骨髄のどの細胞がIL-7を高産生するのかを同定し、同細胞が腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を維持するか、in vitro, in vivoにおいて検討する。

## 4. 研究成果

## 1、無菌環境を利用した骨髄IL-7による病原性メモリーT細胞維持機構の腸内細菌抗原への非依存性の検討

### 1-1、SPF 環境における腸炎マウスの各臓器にはメモリーT細胞が多数浸潤していた

SPF 環境下において CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T 細胞を移入し、大腸炎を発症した SCID マウスの脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、大腸粘膜固有層において CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>high</sup> であるエフェクターメモリーT細胞が多数浸潤していた。これらの細胞を新たな SCID/RAG<sup>-/-</sup>マウスに移入することにより慢性大腸炎が再現できることから我々は本細胞を腸炎惹起性メモリーT細胞と定義した。本細胞は *in vitro* において IL-7 単独で維持可能であり、さらに IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスに移入しても大腸炎を発症しないことから、IL-7 は腸炎惹起性メモリーT細胞の重要な維持因子であると考えられた。

### 1-2、腸炎惹起性メモリーT細胞は無菌環境においても脾臓、骨髄において維持されていた

CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T 細胞移入腸炎マウス脾臓よりメモリーCD4<sup>+</sup> T 細胞を採取し、GF および SPF 環境の SCID マウスに再移入したところ、移入6週後 SPF では腸炎を発症した。一方、

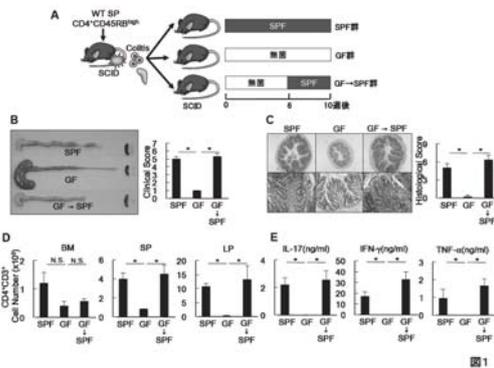


図1

GF 群は腸炎の発症を認めなかったが、驚いたことに、骨髄、脾臓において一定数のメモリーCD4<sup>+</sup> T細胞が維持されていた。しかしこれらの細胞は *ex vivo* による CD28/CD3 の刺激によってサイトカイン分泌能を有さなかった。移入6週後の GF 群を SPF に移動したところ、移動4週後に SPF 群と同等の腸炎が発症した (図1)。

以上の結果から腸炎惹起性メモリーT細胞は無菌環境においては腸管外で resting の状態で維持され、腸内細菌の暴露に際してエフェクターT細胞に分化し腸炎を惹起すると考えられた。

### 1-3、腸炎惹起性メモリーT細胞は無菌環境において骨髄 IL-7 産生細胞に近接して維持されていた

腸炎惹起性メモリーT細胞を移入された無

菌 SCID マウス骨髄の免疫染色において、CD4<sup>+</sup> T細胞は IL-7 産生細胞に近接して維持されていた。

### 1-4、無菌環境におけるメモリーT細胞の維持機構は IL-7 依存的であった。

最後に腸炎惹起性メモリーT細胞維持機構が無菌環境においても IL-7 依存的であるかを検討する目的で、腸炎マウス脾臓由来メモリーCD4<sup>+</sup> T細胞を GF SCID マウスに移入し、抗 IL-7R $\alpha$ モノクローナル抗体あるいはコントロール抗体を投与したところ、抗 IL-7R $\alpha$ 抗体投与群において有意な細胞数の減少を認めた。

## 2、炎症性腸疾患における病原性メモリーT細胞維持における骨髄IL-7 必要十分性の検討

### 2-1、IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウス骨髄細胞を移植した IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスは骨髄に IL-7 を高発現した。

骨髄特異的 IL-7 産生マウスを作製し、CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T細胞移入大腸炎モデルに使用する目的で、我々はまず、IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスおよび IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウス骨髄細胞を採取し、放射線照射した IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスに骨髄移植する実験を行った。移植後の各臓器 mRNA RT-PCR の検討において、IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>骨髄移植群では骨髄に IL-7 発現を認める一方で腸管には IL-7 の発現を認めなかった。

### 2-2、骨髄 IL-7 高産生マウスは IBD を発症する

次に上記 IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>骨髄移植マウスおよび IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>骨髄移植マウスに正常マウス脾臓由来の CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T細胞を移入し、骨髄 IL-7 発現マウスが IBD を発症するか検討した。移植20週後においても IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>骨髄移植マウスでは腸炎を発症しなかったのに対して、IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>骨髄移植マウスでは下痢、体重減少、腸管壁の肥厚を伴う腸炎が発症し、臨床スコア、病理スコアでも有意差をもって腸炎の発症を確認した。

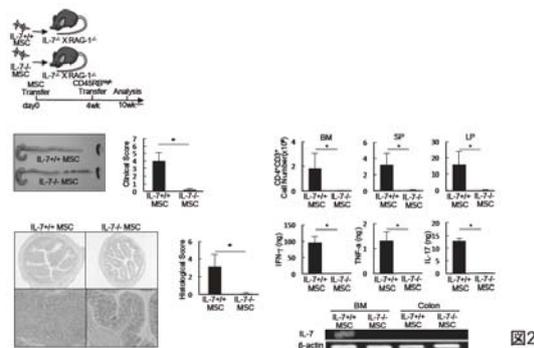


図2

### 2-3、骨髄特異的 IL-7 産生マウスは腸炎惹起性メモリーT細胞維持能を有する。

IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>骨髄移植マウスの各臓器の細胞数の検討では骨髄および腸管に多数の CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>hi</sup>メモリータイプ T 細胞の浸潤を認め、免疫染色による検討では多数の CD4<sup>+</sup>T 細胞が骨髄 IL-7 産生細胞に近接して存在することが確認された。以上の結果から骨髄 IL-7 が腸炎の発症と、腸炎惹起性メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞の維持機構における十分条件であることが証明された。

#### 2-4、骨髄間葉系幹細胞は IL-7 を高産生する

次に我々は骨髄細胞のうちどの細胞が IL-7 を高産生するのかを検討した。骨髄には多様な造血系細胞と間葉系細胞が存在するが、このうち既報では特に間葉系細胞が IL-7 を産生すると報告されており、我々は *in vitro* における培養系が確立している骨髄間葉系幹細胞に着目した。

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell 以下 MSC) はマウス骨髄細胞を単離後、Stem Cell テクノロジー社の MSC complete medium で 5%CO<sub>2</sub>、37°C 環境下にて培養、継代を繰り返し純化した。このように純化された細胞は 7 継代以降血球系マーカーを発現せず、また Stem cell マーカーである Sca-1 を高発現することが確認された。

次に我々は IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>および IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスから MSC を純化した。MSC による IL-7 発現の有無に関してはこれまで controversial であったが、今回このように得られた MSC は mRNA の RT-PCR において、元の骨髄細胞よりも IL-7 を高発現した。また、免疫染色、フローサイトメトリーでも IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>MSC の IL-7 蛋白発現が確認された。

#### 2-5、骨髄間葉系幹細胞移植マウスは IBD を発症する

次にこれらの IL-7 産生 MSC が腸炎の発症と腸炎惹起性メモリー T 細胞の維持において十分条件であるかを検討する目的で以下の実験を行った。IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>および IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスから得られた MSC をそれぞれ IL-7<sup>-/-</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>マウスに静脈注射し、3 週間後に同数の CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> T 細胞を移入し、腸炎が発症するかを検討した。結果 IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>MSC 移植群において、腸管壁肥厚と細胞浸潤をとまなう著明な腸炎の発症が見られ、臨床スコア、病理スコアでも有意差をもって腸炎の発症を確認した。

#### 2-6、骨髄間葉系幹細胞移植マウスは腸炎惹起性メモリー T 細胞維持能を有する

IL-7<sup>+/+</sup> x RAG-1<sup>-/-</sup>MSC 移植マウスの各臓器の細胞数の検討では骨髄および腸管に多数の CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>hi</sup>メモリータイプ T 細胞の浸潤を認め、免疫染色による検討では多数の CD4<sup>+</sup>T 細胞が骨髄 IL-7 産生細胞に近接して存在することが確認された。以上の結果から骨髄間葉系幹細胞は IL-7 を高発現し、

IL-7 高産生骨髄間葉系幹細胞は腸炎の発症と、腸炎惹起性メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞の維持機構における十分因子であることが証明された (図 2)。

以上の結果から腸炎惹起性メモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞の維持機構においては、骨髄に存在する IL-7 産生性間葉系幹細胞が重要な役割を有することが示された。本知見は炎症性腸疾患難治性の要因として、腸管外リザーバー臓器の重要性を明らかにするのみならず、本機構をターゲットとした治療法の可能性を示唆する非常に重要な進歩である。

#### 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 13 件)

- 1, Kanai T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. Persistent retention of colitogenic CD4<sup>+</sup> memory T cells causes inflammatory bowel diseases to become intractable. *Inflamm Bowel Dis*. Review, 15, 2009, 926-34
- 2, Fujii T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. FTY720 suppresses the development of colitis in lymphoid-null mice by modulating the trafficking of colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells in bone marrow. *Eur J Immunol*, 査読あり, 38, 2008, 3290-303
- 3, Tomita T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. Colitogenic CD4<sup>+</sup> effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis*. 査読あり, 14, 2008, 1630-40.
- 4, Nemoto Y, Kanai T, Watanabe M, et al. Negative feedback regulation of colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells by increased granulopoiesis. *Inflamm Bowel Dis*. 査読あり, 14, 2008, 1491-503.
- 5, Totsuka T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. Immunosenescent colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells convert to regulatory cells and suppress colitis. *Eur J Immunol*. 査読あり, 38, 2008, 1275-86
- 6, Tomita T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. Continuous generation of colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells in persistent colitis. *Eur J Immunol*. 査読あり, 38, 2008, 1264-74.
- 7, Tomita T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells in chronic colitis. *J Immunol*. 査読あり, 180, 2008, 5291-9.
- 8, Nemoto Y, Kanai T, Watanabe M, et al. Long-lived colitogenic CD4<sup>+</sup> memory T cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis. *J Immunol*. 査読あり, 183, 2009, 5059-68

9, Tomita T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4<sup>+</sup> memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol*. 査読あり, 39, 2009, 2737-47

10, Shinohara T, Nemoto Y, Watanabe M, et al. Upregulated IL-7 receptor (alpha) expression on colitogenic memory CD4<sup>+</sup> T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J Immunol*. 査読あり, 186, 2011, 2623-32

11, Kameyama K, Nemoto Y, Watanabe M, et al. IL-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4<sup>+</sup> IL-7R alpha high memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol*. 査読あり, 40, 2010, 2423-36

[学会発表] (計 14 件)

1, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, DDW 2008, Negative Feedback Regulation of Pathogenic CD4<sup>+</sup> T Cells by Increased Granulopoiesis. 2008.5.20, San Diego.

2, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, 第 94 回消化器病学会総会, 腸炎骨髄に存在する腸炎惹起性CD4<sup>+</sup>メモリー細胞による自然免疫系へのフィードバック機構, 2008.5.8, 福岡

3, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, 日本第 45 回消化器免疫学会, 骨髄における腸炎惹起性メモリーT細胞と顆粒球造血系のクロストーク, ミニシンポジウム, 2008.7.4, 京都

4, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, JDDW 2008, IL-7 を標的とした腸炎惹起性メモリーT細胞の制御, 2008.10.3, 東京

5, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, DDW 2009, Long-lived Colitogenic CD4<sup>+</sup> Memory T Cells Residing Outside the Intestine Participate in the Perpetuation of Chronic Colitis, 2009年5月31日, シカゴ

6, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, 14th ICMI, Long-lived Colitogenic CD4<sup>+</sup> Memory T Cells can be Maintained Outside the Intestine in the Absence of Commesal Bacteria, 2009年7月7日, ボストン

7, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, 第 46 回消化器免疫学会, 炎症性腸疾患治療標的としてのIL-7 高産生細胞の同定, 2009年7月24日, 松山

8, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, JDDW 2009, 腸内細菌から直接的自然免疫と抗原刺激を受ける炎症性腸疾患メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の維持機構, 2009年10月15日, 京都

9, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, The 3rd Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology, Long-lived Colitogenic CD4<sup>+</sup> Memory T Cells can be

Maintained Outside the Intestine in the Absence of Commesal Bacteria, 2009年11月20日, 東京

10, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, DDW 2010, IL-7-producing mesenchymal stem cells sustain colitogenic memory

CD4<sup>+</sup> T cells for the persistence of chronic colitis, 2010年5月2日, ニューオリンズ

11, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, 第 47 回日本消化器免疫学会総会, 炎症性腸疾患メモリーCD4<sup>+</sup> T細胞は腸内細菌非依存的/IL-7 依存的に維持される, 2010年7月9日, 滋賀

12, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, 第 14 回国際免疫学会総会, IL-7-producing mesenchymal stromal cells sustain colitogenic memory CD4<sup>+</sup> T cells for the persistence of inflammatory bowel disease, 2010年8月25日, 神戸

13, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, JDDW 2011, 腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup> T細胞再循環経路をターゲットとした炎症性腸疾患の治療戦略, 2010年10月14日, 横浜

14, 根本泰宏, 金井隆典, 渡辺 守 他, 第 7 回日本消化管学会総会, IL-7/IL-7Rシグナルをターゲットとした炎症性腸疾患メモリーCD4<sup>+</sup> T細胞除去療法 -治療標的としてのIL-7R $\alpha$  発現細胞およびIL-7 高産生細胞の同定, 2010年2月18日, 京都

[図書] (計 1 件)

根本泰宏, 渡辺 守 他 マイライフ社  
消化器と免疫 2009

[産業財産権]

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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  
消化器病態学 GCOE 特任助教  
研究者番号: 20456213

### (2) 研究分担者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)  
東京医科歯科大学  
大学院医歯学総合研究科  
消化器病態学 教授  
研究者番号: 10175127