

平成 22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790502  
 研究課題名（和文）  
 TLRを介したサイトメガロウイルス感染による炎症性腸疾患増悪機序の解明  
 研究課題名（英文）  
 Pathogenic role of cytomegalovirus infection in exacerbation of inflammatory bowel disease through TLR signaling pathway  
 研究代表者  
 片倉 響子（KATAKURA KYOKO）  
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：70423788

研究成果の概要（和文）：ヒト末梢血からの樹状細胞作成は困難で、患者血液を用いての検討は施行できなかった。マウス実験腸炎にサイトメガロウイルスを感染させるも、腸炎の増悪が認められなかった。ウイルスの核酸を認識するTLR3, 7, 9のリガンドを用いた検討において、TLR7のリガンドを投与することでマウス実験腸炎が抑制された。これはTLR7刺激により形質細胞様樹状細胞から産生されたサイトカインにより、誘導された制御性T細胞による炎症抑制であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether TLR7 agonist Imiquimod (IMQ) protects mice from colonic inflammation. And to confirm the induction of regulatory T cells (Tregs) by type-1 IFN from plasmacytoid dendritic cells (pDCs), we generated mouse bone marrow derived pDC and co-cultured with CD4<sup>+</sup>T cells isolated from mouse spleen with or without IMQ stimulation. Administration of IMQ significantly suppressed colonic inflammation of TNBS-induced colitis, and we could detect CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs induction in IMQ stimulated co-cultured cells. These results suggest that IMQ protects mice from TNBS colitis through induction of Tregs by type-1 IFN from pDCs. Moreover, IMQ would offer a novel tool for the treatment in inflammatory bowel disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：炎症性腸疾患、Toll-like receptor、制御性T細胞、I型IFN、イミキモド

## 1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜は、体内にありながら外界と接触する部位であり、侵入する病原菌に対しては感染防御の最前線として働いている。潰瘍性大腸炎(UC)やクローン病(CD)などの炎症性腸疾患(IBD)は原因不明の難治性疾患であるが、腸管免疫応答における自然免疫系の異常が疾患発症に関与することが想定されている(*Nature* 411:599, 2001, *Nature* 411:603, 2001, *Nat Immunol* 5:800, 2004)。これまでに我々は自然免疫の認識機構の一つである Toll-like receptor (TLR) familyのうち、TLR9のシグナル伝達経路に、マウス実験腸炎の抑制効果があることを報告し(*Gastroenterology* 122:1428, 2002, *Gastroenterology* 126:520, 2004)、その抗炎症作用はTLR9を介して産生される I 型 interferon(IFN)によることを明らかにした(*J Clin Invest* 115:695, 2005)。またTLRリガンドが大腸粘膜のhomeostasisの維持に働く(*Cell* 118:229, 2004)という報告からも、IBDの発症にはTLRが深く関与しているのではないかと考えられた。平成19年度までの科研費若手研究Bで、IBD患者の末梢血単核球(PBMC)のTLRに対する反応性の違いやUC患者のSNPs解析を行い、TLR9がUCの発症に関与しているのではないかと結果を得ることができたが(投稿準備中)、まだどのように関与しているのか、あるいはI型IFNとの関係までは明らかにされていない。

UCの増悪因子の一つとしてサイトメガロウイルス (CMV) 感染が報告されているが(*Inflamm Bowel Dis* 10:245, 2004)、これらの因

果関係やメカニズムに関しては未だ明らかにされていない。ウイルスにより誘導されるTLRシグナルは二つに大別され、一つはウイルスの排除機構として働き、もう一つはウイルス増殖や疾患発症に働く。前者の例として、TLR3シグナル経路とTLR9シグナル経路の両方による感染認識がマウスCMVに対する生体防御に必要であることが報告されている(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3516, 2004)。一方、ヒトCMVはTLR2シグナルを介してIL-6などの炎症性サイトカインの産生を誘導するが(*J. Virol* 77:4588, 2003)、このウイルスの生体防御に働くTLRシグナルについては明らかにされていない。CMV感染のTLRを介したウイルス抑制機構を明らかにすることで、UCの増悪に関するメカニズムが解明されることが期待される。また、IBDにおけるTLRシグナル活性の異常が明らかになれば、傷害されている因子の補充を行うことで、IBDの新たな治療の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

ウイルスを認識するTLRを中心とした自然免疫と炎症性腸疾患の発症との関係について明らかにする。

## 3. 研究の方法

ヒト末梢血からの樹状細胞作成は困難で、患者血液を用いての検討は施行できなかった。マウスDSS腸炎にサイトメガロウイルスを感染させるも、腸炎の増悪が認められなか

った。

(1)マウスTNBS腸炎モデルを作成し、TLR7リガンドのイミキモド(IMQ)投与による腸炎抑制効果を検討した。

①2%TNBSをマウスに注腸し腸炎を生じさせる。

②10 $\mu$ gのIMQを連日腹腔内投与する。

③注腸5日後にsacrificeし、体重減少、腸管の長さ、組織学的検討、腸管の炎症性サイトカインの遺伝子発現を検討し、TNBS腸炎の評価を行った。

(2)IMQ投与マウスの脾臓および腹腔リンパ節における遺伝子発現とサイトカイン産生を検討した。

(3)マウス骨髄細胞からFlt3リガンドで形質細胞様樹状細胞(pDC)を誘導し、脾臓から分離したCD4<sup>+</sup>T細胞と共培養し、種々のTLRリガンドで刺激し制御性T細胞への誘導を検討した。

#### 4. 研究成果

(1)TNBSを注腸し10 $\mu$ gのIMQを連日腹腔内投与したところ、非投与群に比べ体重減少が少なく、腸の病理組織学的検討でも腸炎抑制効果が認められた。また大腸における遺伝子発現ではTNF- $\alpha$ の発現が低下し、IFN- $\beta$ 、TGF- $\beta$ の発現が増加していた。つまり、IMQ投与により活性化されたpDCからI型IFNが産生され炎症が抑制されたが、TGF- $\beta$ など抑制性サイトカインの産生増加が影響していることが考えられた。

(2)脾臓では非投与群と比し有意差を認めず、腹腔リンパ節ではIMQ投与群においてTLR7、IFN- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、Foxp3の発現が有意に増加していた。腹腔リンパ節細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激したところ、IMQ投与群でIL-10の産生増加が認められた。以上より、IMQ投与により所属リンパ節においてpDCが活性化され、

I型IFNが産生されるとともに制御性T細胞が誘導されることが考えられた。

(3)pDCとCD4<sup>+</sup>T細胞の共培養上清において、LPSおよびCpG-DNA刺激群ではIFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ の産生が増加していたが、IMQ投与群ではIL-10およびTGF- $\beta$ の産生が増加していた。よって、TLR4刺激とTLR9刺激ではTh1が誘導されるが、TLR7刺激では制御性T細胞が誘導されると考えられた。また培養細胞をフローサイトメトリーで検討したところ、IMQ投与群において、非刺激群やLPS、CpG-DNA刺激群と比較し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>の制御性T細胞が増加しており、IMQ投与により誘導されたと考えられた。

以上をまとめると、IMQ投与によるTLR7の刺激で活性化されたpDCから産生されるI型IFNにより、制御性T細胞が誘導され、IL-10やTGF- $\beta$ などの抑制性サイトカインが産生されることにより、腸炎抑制に働くことが考えられた。IMQは実際の臨床の現場では尖圭コンジローム等の治療に既に用いられている薬剤であり、今後IBDの新たな治療につながることを期待される。

#### 5. 主な発表論文等；なし

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

片倉 響子 (KATAKURA KYOKO)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70423788

(2)研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし