

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249048

研究課題名(和文) 腸管マクロファージの免疫恒常性維持への寄与とクローン病におけるその破綻機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of intestinal macrophage in contribution to gut immune homeostasis and its disruption in Crohn's disease

研究代表者

日比 紀文(HIBI TOSHIFUMI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50129623

研究成果の概要(和文): 正常マウス腸管 M ϕ には MCP-1 依存性 CCR2 陽性 IL-10 高産生型 M ϕ が存在し恒常性維持に関与していることを見出した。また IL-10 欠損マウスの腸管 M ϕ では細菌貪食後の細胞内シグナル伝達の異常により炎症性サイトカインの過剰産生をおこることを突き止めた。ヒト Crohn 病においては腸管 M ϕ と粘膜 NK 細胞の相互作用が過剰な Th1 シフトに関与していることを明らかとした。さらに、胆汁酸が膜型受容体 TGR5 を介して IL-12 低産生型の樹状細胞を誘導することを発見した。IL-12 低産生型の樹状細胞の誘導は Crohn 病治療標的になりうると思われる。

研究成果の概要(英文): We identified that resident intestinal macrophages include a subpopulation of MCP-1 dependent CCR2+IL-10 producing M ϕ which contributes to gut homeostasis. In IL-10 KO mice, we showed intracellular signaling after phagocytosis is important for production of proinflammatory cytokines by intestinal macrophages. In human Crohn's disease, we demonstrated that intestinal macrophages interact with mucosal NK cells and contribute to enhance of Th1 immune response. Furthermore, our studies demonstrated that bile acids can induce differentiation into IL-12 hypo-producing DCs. Thus, conditioning and regulation of innate immune cells such as macrophages and dendritic cells (DCs) have a potential to be a therapeutic target of Crohn's disease.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2010年度	13,600,000	4,080,000	17,680,000
2011年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
総計	35,500,000	10,650,000	46,150,000

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、マクロファージ、腸内細菌、NK細胞、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

現在の Crohn 病に対する治療は炎症を抑制する対症療法に限られており、病態解明とそれに基づく治療法の開発、発症予防が急務である。Crohn 病は遺伝学的素因、食事などの環境因子と免疫学的異常が複雑に絡み合った多因子疾患と考えられているが、近年、『腸

内細菌に対する腸管免疫応答システムの破綻がその病態の本質にある』と考えられている。腸内細菌は人体に有益であり、腸管免疫システムはこれらに過剰に反応することのないように制御されている。自然免疫担当細胞である腸管M ϕ は異物の貪食・処理に続き炎症性サイトカインを産生し免疫を惹起する

ものと考えられてきた。しかし当研究室を中心とした研究により、『腸管局所Mφは単に異物処理を行なうだけでなく、免疫学的恒常性維持に必須である』ことが明らかになった。正常マウス腸管Mφが腸内細菌に対して抑制性サイトカインIL-10を産生し慢性炎症への進展を防いでいる一方、Crohn病モデルであるIL-10欠損マウスでは腸管Mφの機能異常の結果IL-12やIL-23を産生することによりTh1/Th17型慢性炎症が惹起される(Kamada N, Hisamatsu T, Hibi T et al. 2005 J Immunol.)。Crohn病では腸内細菌に対する制御異常が病態に関与していると推測されていたがヒト検体を用いての研究は世界的に遅れていた。この現状を打破するのが当研究室である。我々はマウスでの研究に加え炎症性腸疾患の病態解明を目指しヒト検体を用いた研究を精力的に行ってきた(Hibi T et al. 1999 Cancer Res, 2001Gastroenterology,2004Gut, 2004Gastroenterology, 2002Gastroenterology)。そしてCrohn病腸管局所でCD14+Mφが増加し腸内細菌刺激に対してIL-23を高産生していることを突き止めた。MizoguchiらもマウスIL-23産生型腸管単球系細胞がCrohn病の特徴である肉芽腫形成に関与していることを報告しており(Mizoguchi et al. 2007 J Clin Invest)我々の同定したCD14+Mφがヒトにおけるカウンターパートである可能性が示唆された。さらなる解析から特にCrohn病のCD14+Mφは細菌刺激によりIL-23とTNF- α を高産生し、粘膜固有層単核球からのIFN- γ 産生を促していることも判明した(Kamada N, Hisamatsu T, Hibi T et al. 2008 J Clin Invest)。ここに初めて『ヒトCrohn病における腸内細菌に対するの機能異常によるIL-23産生が病態のkeyになっている』ことが証明された。

2. 研究の目的

(1)腸管の免疫学的恒常性維持における役割の解明。

MCP-1依存性腸管Mφの恒常性維持における重要性：我々はすでに正常マウスDSS誘発腸炎モデルにおいて局所に浸潤してくるMφがIL-10高産生型であることを突き止めている。さらに単球のホーミングが障害されたMCP-1欠損マウスではこのIL-10産生Mφの減少によりDSS腸炎が増悪することもつきとめた。以上の結果は炎症時に浸潤してくるMφは炎症を惹起するのではなく炎症収束させ創傷治癒に向かわせていることを示しており、従来の考えを覆す重要な所見である。今後炎症時に浸潤してくるマウスMφを単離しレジデントMφとの機能の違い、分化誘導の違い、ホーミング機構の違いを明らかにする。

IL-10欠損マウスMφにおけるIL-23過剰産生のメカニズム解明：現在までに腸管Mφの抑制性機能の獲得には分化段階でのIL-10が必須であることを見出している(Kamada N, Hisamatsu T, Hibi T et al. 2005 J Immunol)。さらにIL-10欠損マウスではLPS+IFN- γ 刺激と異なり腸内細菌刺激ではIL-12p40、IL-12p35の発現亢進が長時間にわたって遷延すること、STAT-1のtyrosineのリン酸化亢進がしていることを突き止めており、この現象は貪食を阻害することにより低下することから細菌が細胞内に取り込まれたあとのシグナルがより重要であると考えられる。今後は細胞内細菌処理のメカニズムとIL-12/23の発現亢進の関係を明らかにするためNOD2などの細胞内細菌認識分子のノックダウンや欠損マウスなどを用いて研究を進める。さらに細菌側の因子の追求としてE.faecalisの変異株を用いてIL-12/23誘導成分の同定を行なう。

(2)炎症性腸管Mφへの誘導因子とそのメカニズムの解明。

Crohn病ではMφは炎症性のphenotypeへと分化している。我々は既にIFN- γ がMφの分化に影響を与え、IL-23高産生型Mφを誘導することを見出しており今後はIFN- γ 下流のシグナルのMφ分化におけるメカニズムを追求する。

(3)Crohn病における腸管Mφの機能異常の解明と標的治療法の開発。

我々の同定した腸管CD14+Mφは一部樹状細胞の表面マーカーも表出していることから、この細胞が抗原提示細胞としてnaive T細胞をTh1/Th17メモリー細胞に誘導するかどうか検討する。さらにT細胞の腸管へのホーミングマーカーである487インテグリンの発現を誘導するかどうかも検討する。また既にCD14+Mφの産生するIL-23がTNF- α とsynergisticに働きT細胞のみならずNK細胞からのIFN- γ 産生を促すことを見出しており、CD14+MφとNK細胞とのinteractionを追求する。既に我々はCrohn病において腸管局所にNK細胞が増加していることを報告している(Chinen H, Kamada N, Hisamatsu T, Hibi T et al. 2007 Gastroenterology)つまりNK細胞がCrohn病におけるIFN- γ 産生細胞として重要な役割を担っている可能性があり、『Crohn病におけるMφとNK細胞のinteraction』という新たな概念を提唱している。

学術的な特色・独創的な点および予想される結果と意義：腸管Mφがむしろ恒常性維持に重要であるという概念は我々の研究成果(Kamada N, Hisamatsu T, Hibi T 2005 J Immunol)が契機となり注目されるようになった(Denning TL et al. 2007 Nat Immunol)。正常腸管Mφの機能を解析するこ

とで Crohn 病への病態へ迫ろうとするアプローチはT細胞中心の研究が多い中きわめて独創的であり病態の本質を迫るものである。さらに当研究室のヒト検体を用いた多くの研究成果は世界の中で他の追従を許さずヒト Crohn 病の病態解明に直接つながる研究であると期待されている。また□□をターゲットとした治療法の開発も目指しており、既にその成果の一部としてアミノ酸である histidine がMφからの TNF-α 産生を抑制し腸炎を抑制しうることも報告した (Andou A, Hisamatsu T, Hibi T et al. 2009 Gastroenterology)

3. 研究の方法

I. マウスを用いた腸管マクロファージの機能研究

レジデント腸管マクロファージの詳細な解析のために野生型 C56BL6 マウスの腸管より比重遠心法を用いて単核球細胞 (lamina propria mononuclear cell: LPMC) を得た。flow cytometry によって CD11b+CD11c-細胞をレジデントマクロファージとして解析した。

また IL-10 欠損マウスの腸管マクロファージ、骨髄 CD11b+単球から *in vitro* で分化誘導したマクロファージを用いて細菌刺激による炎症性サイトカイン産生を CBA、ELISA、real time PCR で解析し、その際のシグナル伝達を western blot を用いて解析した。また細菌貪食の関与についてサイトカラシン D による貪食阻害実験や蛍光ラベルした E.coli を用いて解析した。

II. Crohn 病患者腸管由来免疫細胞を用いた研究

Crohn 病手術検体の腸管粘膜より LPMC を分離し、さらに CD14 磁気ビーズを用いて CD14+炎症性マクロファージを得、解析に用いた。また CD3-CD56+NK 細胞を flow cytometry により解析した。さらに両者の相互作用について共培養系を用いて解析した。

III. *in vitro* 培養系を用いた IL-12 低産生性樹状細胞誘導の研究

Crohn 病においてはマクロファージや樹状細胞の制御異常により過剰な炎症性サイトカインが産生され Th1 優位の免疫応答が誘導される。その際の重要なサイトカインは TNFα、IL-12、IL-23 であり、それらの低産生性 phenotype の誘導を *in vitro* で試みた。健康人末梢血単球を GM-CSF、IL-4 の添加により樹状細胞に分化させた。その際に種々の化合物を添加し細菌刺激によるサイトカイン産生を検討した。

4. 研究成果

I. マウスを用いた腸管マクロファージの機能研究

(1) MCP-1 依存性腸管マクロファージの恒常性維持における重要性：正常マウス腸管マクロファージは flow cytometry の解析から 2 つの分画に分かれ (LP マクロファージ-1、2) MCP-1 欠損マウスでは LP マクロファージ-2 分画の減少が認められた。この LP マクロファージ分画は IL-10 高産生型であり、MCP-1 欠損マウスでは DSS 腸炎誘発時にこの LP マクロファージ-2 分画のホーミングが傷害されており腸炎が増悪することを突き止め、腸管マクロファージの新たな機能解析の結果として論文発表した (J Immunol. 2010 Mar 1;184(5):2671-6.)。

(2) IL-10 欠損マウス LP マクロファージにおける IL-23 過剰産生のメカニズム解明：IL-10KO マウスのマクロファージからの IL-23 過剰産生には PAMPs よりも腸内細菌刺激が重要であり、特に菌体を貪食したのちの STAT1 を含めたシグナル伝達が重要であることを突き止めた。本研究成果は英文誌に論文として発表した (Clin Exp Immunol. 2011 Apr;164(1):137-44.)。またマクロファージにおける IL-12p40 の転写制御には NFIL3 が重要であることを見出した (J Immunol. 2011 Apr 15;186(8):4649-55.)。

II. Crohn 病患者腸管由来免疫細胞を用いた研究

Crohn 病腸管粘膜の NK 細胞は CD56+NKp46+であり IFNγ 産生能が高かった。これは CD14+腸管マクロファージから産生される IL-23 により増強されることが明らかとなった (Gastroenterology Sep;139(3) 2010 p882-92)。さらに Crohn 病 CD14+腸管マクロファージは TL1A を産生し IL-23 と synergistic な作用により IFNγ 産生を増強させることを明らかにした (Inflamm Bowel Dis. 2010 Apr;16(4):568-75)。

III. *in vitro* 培養系を用いた IL-12 低産生性樹状細胞誘導の研究

すでに合成レチノイン酸受容体アゴニストである AM80 が IL-12 低産生性樹状細胞を誘導することを明らかにしていたが (Inflamm Bowel Dis. 2009 Oct;15(10):1548-56.) 今回さらなる追及で胆汁酸が TGR5 を介して IL-12 低産生型樹状細胞を誘導しうる (Immunology. 2012 Jun;136(2):153-62.) ことがはじめて明らかとなった。合成レチノイン酸受容体アゴニストや TGR5 アゴニストを用いたマクロファージや樹状細胞の機能制御が Crohn 病の治療標的になりうる可能性を示した。

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 16 件)

Ichikawa R, Hisamatsu T, Hibi T, et

al.(他 9 名、12 番目)Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. Immunology. 査読有 136(2) : 2012 P153-162

久松理一、日比紀文 炎症性腸疾患におけるアミノ酸補給の意義 日本消化吸収学会雑誌 査読有 33(3) : 2011 P352-361

久松理一、鎌田信彦、日比紀文 ヒト腸管自然免疫担当細胞による恒常性維持と炎症性腸疾患におけるその破綻 細胞工学 監修 清野 宏 秀潤社 査読無 Vol.30 No.4 : 2011 P366-370

久松理一、日比紀文 総説『クローン病の長期予後について考える』日本消化器病学会雑誌 査読有 108 巻 3 号 : 2011 P373-380

久松理一、日比紀文 特集：小腸疾患：診断と治療の進歩 II. 診療の進歩 6. Crohn 病 日本内科学会雑誌 査読有 第 100 巻 第 1 号 : 2011 P85-95

Naruse H, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T, et al.(他 7 名、11 番目)Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages Clin Exp Immunol 査読有 164(1) : 2011 P137-144

Kobayashi T, Hisamatsu T, Hibi T, et al.(他 8 名、11 番目)Rothman PB, Kashiwada M, Plevy SE. NFIL3 Is a Regulator of IL-12 p40 in Macrophages and Mucosal Immunity. J Immunol 査読有 186(8) : 2011 P4649-4655

Sujino T, Kanai T, Hisamatsu T, Hibi T, et al.(他 9 名、13 番目)Regulatory T Cells Suppress Development of Colitis, Blocking Differentiation of T-Helper 17 Into Alternative T-Helper 1 Cells. Gastroenterology 査読有 141(3) : 2011 P1014-1023

Miyoshi J, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T, et al. (他 9 名、13 番目) Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's. disease. J Gastroenterol. 査読有 46(9) : 2011 P1056-1063

久松理一、日比紀文 アミノ酸と免疫

Functional Food 査読無 第 11 号 Vol.4 No.1 : 2010 P16-22

久松理一、日比紀文 血漿アミノ酸プロファイルを用いた IBD の診断 IBD Research 先端医学社 査読無 12 月号 vol.4 no.4 : 2010 P38-42

久松理一、日比紀文 特集：生体防御と自然免疫 - 最近の知見 Workshop 実臨床のトピックス IBD 発症進展における自然免疫の役割 侵襲と免疫 メジカルビュー社 査読無 Vol.19 No.2 : 2010 P39-42

Mikami Y, Kanai T, Hisamatsu T, Hibi T, et al.(他 11 名、14 番目)Competitive Th1 and Th17 cells contributes to the amelioration of colitis. Eur J Immunol. 査読有 Sep;40(9) : 2010 P2409-2422.

Takayama T, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T, et al.(他 10 名、13 番目)Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology 査読有 Sep;139(3) : 2010 P882-892

Kamada N, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T, et al.(他 9 名、12 番目)TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 査読有 16(4):2010 P568-575

Takada Y, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T, et al. (他 11 名、14 番目)Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. J Immunol 査読有 184(5):2010 P2671-2676

〔学会発表〕(計 13 件)

Toshifumi Hibi Collaboration between the East Asia IBD Society and ECCO (招待講演) : ECCO Meeting Feb 14-18 2012 Spain

Toshifumi Hibi. Role of Endoscopy in daily clinical practice: example from Japan. (招待講演) : Leading Change in IBD Meeting January 19-23 2012 Prague

久松理一 難治性潰瘍性大腸炎に対する
タクロリムス経口投与の治療効果と限界：
JDDW2011 平成 23 年 10 月 20-23 日 福岡

Toshifumi Hibi. How to avoid
malpractice and deal with difficult IBD
cases.(招待講演):IBD Update Sep 30-Oct
1 2011 台湾

Tadakazu Hisamatsu : Intestinal
CXCR4+IgG+ Immature Plasma Cells
Contribute to the Pathogenesis of
Ulcerative Colitis through IgG-Immune
Complex-FcγR Signaling. The 15th
ICMI July 5-9 2011 Paris France

久松理一、日比紀文 炎症性腸疾患をアミ
ノ酸代謝から考える
第 8 回日本機能性食品医学会総会 シンポ
ジウム 免疫と機能性食品 2010 年 12 月
11 日-12 日 大津 ビアザ淡海

日比紀文 Current Therapy of IBD-
Current Concepts : IBD Symposium in
Taipei 2010 年 8 月 21 日 台湾

久松理一、井上 詠、松岡克善、斉藤理子、
筋野智久、米野和明、三好 潤、三上洋平、
岩男 泰、緒方晴彦、金井隆典、日比紀文、
安藤 朗、藤山佳秀、内山和彦、高木智久、
内藤裕二、吉川敏一 血漿アミノ酸プ
ロファイルを用いた炎症性腸疾患の診断・活
動性モニタリング
難治性腸管障害調査研究班 2010 年 7 月 30
日 東京

日比紀文 潰瘍性大腸炎治療の新展開
第 89 回日本消化器内視鏡学会九州支部例会
支部例会 ランチョンセミナー 2010 年 6
月 19 日九州

久松理一 クローン病に対する成分栄養
剤の作用機序 - 最新の知見を含めて -
第 7 回肝・消化器代謝栄養 研究会 2010
年 6 月 19 日 大阪

日比紀文 Immunomodulation therapy
for IBD : 2010 Immune-Mediated
Digestive Diseases Forum in China 2010
年 6 月 13 日北京

日比紀文 Japanese Patients With
Moderately to Severely Active Crohn 's
Disease Experience Improved Quality of
Life With Adalimumab Treatment
Digestive Disease Week 2010 2010 年 5 月
3 日 New Orleans

日比紀文 炎症性腸疾患に対する抗体療
法 第 107 回日本内科学会講演会 2010 年 4
月 11 日 東京

〔図書〕(計 2 件)

日比紀文 医学書院出版、炎症性腸疾患の
鑑別診断 炎症性腸疾患 日比紀文編、2010、
340

日比紀文 羊土社出版、『消化器 Book シリ
ーズ No.2 特集：炎症性腸疾患の診断・治
療』、久松理一、日比紀文 編 2010、213

〔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

<http://www.keio-med.jp/gastro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 紀文 (HIBI TOSHIFUMI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50129623

(2) 研究分担者

金井 隆典 (KANAI TAKANORI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：40245478

久松 理一 (HISAMATSU TADAKAZU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60255437

(3) 連携研究者

なし