

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 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21590532

研究課題名（和文）腸内細菌由来抗原の免疫制御機能を利用したクローン病の
新規治療法の開発研究課題名（英文）Development of a new therapy for Crohn' s disease by using
immuno-regulatory function of NOD2

研究代表者

渡邊 智裕 (WATANABE TOMOHIRO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40444468

研究成果の概要（和文）：健全な腸管粘膜組織は腸内細菌に対して過剰な免疫応答を示すことなく腸管免疫の恒常性を維持している。腸内細菌に対する免疫寛容の破綻はクローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患の発症を引き起こす。Nucleotide binding oligomerization domain 2(NOD2)の遺伝子変異はクローン病の最も重要な危険因子である。NOD2 変異の存在下でのクローン病の発症機序の解明はクローン病の病態生理の理解のみならず新規治療法の開発につながるため、大きな注目を集めている。我々は NOD2 が活性化された抗原提示細胞においては、TLR ligands で刺激した場合に NF- κ B 経路と I 型 IFN 経路の活性化が抑制されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：Healthy gut mucosa exhibit tolerogenic responses to intestinal microflora. Excessive immune-reactions against intestinal microflora lead to the development of inflammatory bowel diseases. Mutations in NOD2 are associated with the development of Crohn's disease. Elucidation of mechanisms by which NOD2 mutations cause Crohn's disease provides new insights in the pathogenesis of colitis. Here we show that NOD2 activation inhibits both NF- κ B activation and type I IFN production mediated by TLRs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：クローン病、NOD2、TLR

1. 研究開始当初の背景

NOD2 の遺伝子変異はクローン病の重要な危険因子である。NOD2 変異の存在下でのク

ローン病発症機序の解明はクローン病の病態生理のみならず、新規治療法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

我々は抗原提示細胞における NOD2 の活性化は TLR を介する NF- κ B の活性化を負に制御していることを証明した。しかしながら、NOD2 の活性化が TLR を介する I 型 IFN 経路をどのように制御するのか未解明である。今回、我々は NOD2 の活性化が TLR を介する I 型 IFN 経路の活性化に及ぼす効果を解析した。

3. 研究の方法

(1) 腸炎モデルでの解析

マウスに 2%DSS を飲水させ、DSS 腸炎を誘導した。DSS の飲水開始日を Day0 とし、Day3、Day4、Day5 に TLR9 ligand CpG (10 mg) と NOD2 ligand MDP (100 mg) の腹腔内投与を行った。腸炎の程度をマウスの体重測定と大腸組織の HE 染色を用いて、評価した。腸管膜リンパ節細胞を CD3 抗体及び様々な TLR ligands により刺激し、培養液中のサイトカイン、ケモカインの産生量を測定した。また、腸管膜リンパ節 CD4T 細胞表面のケモカイン受容体の発現をフローサイトメトリーで解析した。

(2) 骨髄移植モデルを用いた解析

骨髄移植によりキメラマウスの作成を行った。レシピエントマウスに 10 グレイの放射線照射を試行し、ドナーマウスから準備した骨髄細胞を静脈注射により投与した。レシピエントマウス、ドナーマウスとして、NOD2 欠損マウス、野生型マウスを使用した。骨髄移植してから、2 ヶ月後にマウスに 2%DSS を飲水させ、DSS 腸炎を誘導した。DSS の飲水開始日を Day0 とし、Day3、Day4、Day5 に TLR9 ligand CpG (10 mg) と NOD2 ligand MDP (100 mg) の腹腔内投与を行った。腸炎の程度をマウスの体重測定と大腸組織の HE 染色を用いて、評価した。腸管膜リンパ節細胞を CD3 抗体及び様々な TLR ligands により刺激し、培養液中のサイトカイン、ケモカインの産生量を測定した。また、腸管膜リンパ節 CD4T 細胞表面のケモカイン受容体の発現をフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

- (1) NOD2 の活性化は TLR9 により誘導される DSS 腸炎の悪化を抑制する。(図 1)

TLR9 ligand である CpG の全身投与により、著明な体重減少が認められ、TLR9 の活性化は DSS 腸炎を悪化させることが判明した。NOD2 ligand である MDP の全身投与により TLR9 ligand による DSS 腸炎の悪化が抑制されるか否かを検討した。興味深いことに、MDP による NOD2 の活性化は CpG による DSS 腸炎の悪化を抑制することが体重測定と病理組織の解析により明らかになった。

CpG の全身投与を受けたマウスの腸管膜リンパ節細胞を様々な TLR ligands にて刺激したところ、IFN- α の産生が DSS 飲水のみマウス由来腸管膜リンパ節細胞と比べ、著明に上昇していた。その効果は MDP と CpG の併投与を受けたマウスでは認められなかった。さらに、CpG の全身投与を受けたマウスの腸管膜リンパ節細胞では CXCR3 陽性の CD4T 細胞の割合が著明に増加していたが、MDP と CpG の併投与を受けたマウスではその効果は認められなかった。

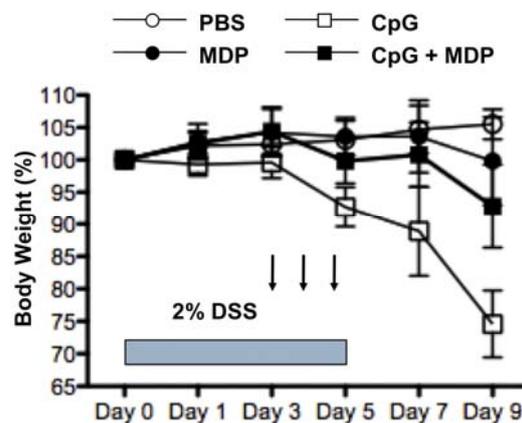


図 1; NOD2 の活性化による腸炎の抑制効果

- (2) 骨髄細胞に発現する NOD2 が DSS 腸炎の抑制に重要である (図 2)。

NOD2 の発現は抗原提示細胞と上皮細胞に認められる。そこで、NOD2 の活性化による DSS 腸炎の抑制効果に関わる細胞の同定を骨髄移植マウスを用いて行った。

MDPによるDSS腸炎の抑制効果はドナーがNOD2欠損マウス、レシピエントが野生型マウスの骨髄キメラマウスでは認められなかった。しかしながら、ドナーが野生型マウス、レシピエントがNOD2欠損マウスの骨髄キメラマウスではMDPによるDSS腸炎の抑制効果が認められた。このことから、骨髄細胞に発現するNOD2の活性化がDSS腸炎の悪化防止に必要であることが判明した。ドナーが野生型マウス、レシピエントがNOD2欠損マウスの骨髄キメラマウスを用いて、さらに解析を進めた。CpGの全身投与を受けたマウスの腸管膜リンパ節細胞を様々なTLR ligandsにて刺激したところ、IFN- α とIP-10の産生がDSS飲水のみマウス由来腸管膜リンパ節細胞と比べ、著明に上昇していた。その効果はMDPとCpGの併投与を受けたマウスでは認められなかった。

さらに、CpGの全身投与を受けたマウスの腸管膜リンパ節細胞ではCXCR3陽性のCD4T細胞の割合が著明に増加していたが、MDPとCpGの併投与を受けたマウスでは認められなかった。

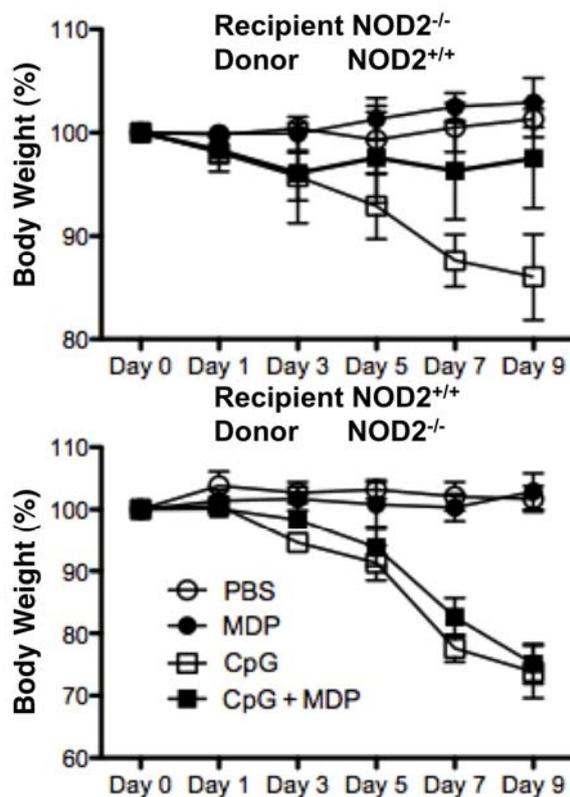


図2: 骨髄移植マウスを用いた検討

以上の結果から、NOD2の活性化がTLR9を介するI型IFN経路の活性化を抑制し、腸炎の発症を防止していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件: 全て査読有)

- ① Watanabe T, Yamashita K, Fujikawa S, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T. Activation of Toll-like receptors and NOD-like receptors is involved in enhanced IgG4 responses in autoimmune pancreatitis. *Arthritis & Rheumatism* 2012;64:914-24. doi: 10.1002/art.33386.
- ② Chung H, Watanabe T, Kudo M, Chiba T. Correlation between hyporesponsiveness to Toll-like receptor ligands and liver dysfunction in patients with chronic hepatitis virus C infection. *Journal of Viral Hepatitis* 2011;18: e561-e567. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01478.x
- ③ Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, Gorelick PL, Tsuji Y, Matsumoto Y, Chiba T, Fuss IJ, Kitani A, Strober W. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *Journal of Clinical Investigation* 2010;120:1645-62. doi: 10.1172/JCI39481.
- ④ Chung H, Watanabe T, Kudo M, Chiba T. Hepatitis C virus core protein induces homo- and cross-tolerance to Toll-like receptor ligands via activation of Toll-like receptor 2. *Journal of Infectious Diseases* 2010; 202:853-861. doi: 10.1086/655812

- ⑤ Akitake R, Watanabe T, Zaima C, Uza N, Ida H, Tada S, Nishida N, Chiba T. Possible involvement of T helper type 2 responses to Toll-like receptor ligands in IgG4-related sclerosing disease. Gut 2010;59:542-5. doi:10.1136/gut.2009.200972
- ⑥ Chung H, Watanabe T, Kudo M, Maenishi O, Wakatsuki Y, Chiba T. Identification and characterization of IgG4-associated autoimmune hepatitis. Liver International 2010; 30:222-31. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.02092.x

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 智裕 (WATANABE TOMOHIRO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40444468

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし