

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590820

研究課題名(和文) クローン病の病態における細胞内寄生細菌に対するオートファジー機能異常の重要性

研究課題名(英文) Importance of dysregulated autophagy to intracellular parasiting bacteria in the pathogenesis of Crohn's disease

研究代表者

井上 詠(INOUE NAGAMU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00232546

研究成果の概要(和文): クローン病の病態で、どのようなメカニズムで腸内細菌がMφを活性化するかを明らかにすることを目的とした。MCP-1依存性腸管Mφの恒常性維持における重要性を検討し、正常マウス腸管粘膜内(LP)Mφはf2つの分画に分かれMCP-1欠損マウスではLP Mφ-2分画の減少が認められ、腸管Mφの機能異常がクローン病の病態において本質的な役割を果たしていると考えられた。さらに、CD14陽性腸管Mφから産生されるIL-23が、クローン病の腸管炎症に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文): We tried to elucidate the roles of macrophages in intestinal inflammation by using an IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mouse colitis model, and demonstrated that abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. Moreover, we found that lamina propria macrophages (LPMs) could be separated into two subsets with distinct side-scattered properties. LPM2 subset migrated in response to MCP-1 and produced a larger amount of IL-10 in response to commensal bacteria.

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
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、粘膜免疫、腸内細菌、マクロファージ、クローン病

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎およびクロー

ン病)は本邦において生活習慣の欧米化に伴い罹患患者数が増加の一途をたどっており、

患者の多くは若年者で QOL の低下をきたすことが多く社会問題となり、厚生労働省特定疾患に指定されている。近年の免疫学、分子生物学的および分子遺伝学的手法の進歩により、炎症性腸疾患における慢性炎症の病態は解明されつつあるが、根本的な原因は明らかとなっていない。ここ数年急速に進歩したゲノムワイドアソシエーション研究の結果により、炎症性腸疾患とくにクローン病に関連する遺伝子として、細胞内での細菌抗原の感知に関わる *NOD2*、オートファジーに関わる *ATG12L1*, *IRGM*、獲得免疫系の Th17 経路に関わる *IL23R* が報告された (Duerr ら Science 314: 1461, 2006、WTCCC Nature 447: 661, 2007、ほか) ことよって、クローン病の病因 / 病態において、(1) 自然免疫系細胞における細菌処理異常による活性化、(2) 活性化された自然免疫系細胞による Th1/Th17 獲得免疫系反応の増幅、の 2 つの経路に焦点を絞ることができる。ところが我々による SNP 解析 (Inoue N et al: Gastroenterology 123: 86, 2002) および Yamazaki らによる SNP 解析 (J Hum Genet 52: 575, 2007) により、日本人クローン病患者において上記遺伝子の関与はまったくみられない。そこで遺伝学的にはまったく異なる背景を有していても、同一の疾患病像を示すということは、(1) または (2) あるいは両方のどこかに異常が生じればクローン病の病像を呈するという仮説が成り立つと考えられる。

我々の研究室ではクローン病患者の単球・マクロファージ (M ϕ) 系細胞に焦点をあて、これらの細胞の菌体成分や細菌刺激による反応性の異常を報告し、健常の腸管 M ϕ は他臓器 M ϕ の「炎症惹起型」性質に対し、細菌刺激に対してむしろ炎症抑制性サイトカインである IL-10 を高産生することから「炎症抑制」型であることを提唱してきた。これは常に腸管内腔に無数の腸内細菌や食餌抗原が存在することを考えれば合目的的であると考えられる。しかしながら、クローン病患者の M ϕ やクローン病類似の慢性腸炎を自然発症する IL-10 ノックアウトマウス腸管 M ϕ は、細菌刺激に対して IL-12, IL-23 などの炎症性サイトカインを高産生する。これらの M ϕ における炎症性サイトカイン異常産生の機序は PAMPs ではみられないこと、サイトカラシンで食食を阻害すると見られなくなることより、細菌食食後の処理過程に異常がある可能性が想定される。

一方、ヒト腸内フローラには腸炎惹起性 / 非惹起性があるものと推測され、どのような細菌刺激が M ϕ を活性化するのに注目した。遺伝子研究の成果を考慮すると、細胞内寄生菌に対する M ϕ の応答が興味深いところであるが、これまでには培養困難なことからま

たく検討されてこなかった。しかし古くからクローン病の病因として感染説が提唱され、病原体として *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP)、麻疹ウイルスなどが報告されてきた。MAP の報告がもっとも多くメタ解析 (Feller ら Lancet Infect Dis 7: 607, 2007) でも正の関連を示しているが、いわゆるコッホの 3 原則は満たさず単なる感染説は否定的と考えられる。しかし、感染症の病原体としてではなく、「腸管 M ϕ 内での処理異常による活性化のトリガーが細胞内寄生菌 (MAP など) ではないか」という仮説を立てるに至った。最近、*Listeria* 菌、*Mycobacterium* や A 群溶連菌などの細胞内寄生体の処理機構としてオートファジーが重要であるとする報告が相次いでなされた (Rich ら Cell Microbiol 5: 455, 2003, Singh ら Science 313: 1438, 2006, Nakagawa ら Science 306: 1037, 2004) こと、クローン病の遺伝子研究で複数のオートファジー関連遺伝子が見つかったことも、この仮説の根拠である。

2. 研究の目的

クローン病の病態において、どのような腸内細菌がマクロファージを活性化し炎症を惹起するのか、どのようなメカニズムで腸内細菌がマクロファージを活性化するのか、という 2 つの命題に対する「腸管 M ϕ 内での処理異常による活性化のトリガーが細胞内寄生菌 (MAP など) ではないか」という仮説を検証するために、腸内フローラおよび腸管粘膜、粘膜内 M ϕ を分子生物学的に解析することにより細胞内寄生菌の関与を明らかにするとともに、クローン病患者 M ϕ でのオートファジー機能異常と細胞内寄生菌に対する M ϕ の反応異常について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

・腸炎惹起性腸内フローラの同定 (細胞内寄生細菌をターゲットとした検討) 炎症性腸疾患患者 (潰瘍性大腸炎、クローン病) 健常人の糞便サンプルを、菌特異的プライマーを用いた定量 PCR により解析した。さらに腸管切除組織より M ϕ を分離し定量 PCR により解析するとともに、多重染色 FISH 法にて粘膜組織切片中の細菌の局在について検討した。

・クローン病 M ϕ の機能解析 (細胞内寄生細菌に対する応答) 分離した M ϕ を MAP、*Listeria monocytogenes*、*Salmonella typhimurium* など細胞内寄生細菌の加熱死菌を用いて刺激し、IL-12/IL-23 産生の検討、CBA 解析、培養上清を用いた T 細胞機能解析を行った。

・MCP-1 欠損マウスを用いて、腸管粘膜内

Mφを分離し、flow cytometry をもちいて解析するとともに、各種刺激に対するサイトカイン産生能について検討した。

・クローン病の病態におけるオートファジー機能異常の解析 患者末梢血より分離した単球をMφに分化させた後、rapamycin 添加、IFN-γ刺激、PAMPs による刺激、細菌刺激などによりオートファジーが誘導されるか、Anti-LC3 抗体を用いて免疫染色およびウエスタンブロット法にて検討した。また、腸管切除検体におけるオートファジーの動態を、Anti-LC3 抗体を用いた免疫染色法にて検討した。

4 . 研究成果

定量的フロー解析の結果、*Bacteroides fragilis* 群が炎症性腸疾患患者で減少していること、FISH 解析にて粘液層に付着しているのはおもに *Clostridium coccooides* 群、*Bifidobacterium* であり、*Bacteroides fragilis* 群はおもに糞便中に存在していることが明らかとなった。

MCP-1 依存性腸管Mφの恒常性維持における重要性を検討したところ、正常マウス腸管粘膜内 (LP) Mφは flow cytometry の解析から2つの分画に分かれ(LPMφ-1, 2) MCP-1 欠損マウスでは LPMφ-2 分画の減少が認められた。このLPMφ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LPMφ-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明らかとなり、腸管Mφの新たな機能と考えられた。

つぎにIL-10 欠損 (KO) マウスのLPMφにおけるIL-23 過剰産生のメカニズムを解析した。IL-10 KO マウスのMφからのIL-23 過剰産生には病原体関連分子パターン (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STAT-1 を含めたシグナル伝達が重要であることを明らかとした。

さらにクローン病における腸管Mφの機能異常を検討したところ、クローン病腸管MφがNK細胞からのIFN-γ産生に関与していること、TL1A を産生しIL-23 と synergistic な作用によりIFN-γ産生を増強させることを明らかにした。

一方、IL-10KO マウス骨髄由来のMφはwild-type(WT)と比較して、腸内細菌抗原の刺激で多量の炎症性サイトカインIL-12 を誘導しうることが明らかになった。その程度はLPS+IFN-γ刺激と比較し腸内細菌刺激で明らかに強く、また持続していた。この効果はサイトカラシン D により貪食を抑制することで低下することから細菌が貪食された後の細胞内シグナルが重要であると考えられた。転写因子STAT1 およびSTAT3 の活性をwestern blotting で検討したところ、

IL-10KO はWT よりSTAT1 が有意に活性化し、WT はIL-10KO よりSTAT3 が有意に活性化することが明らかになった。また、サイトカラシン D により腸内細菌刺激によるSTAT1 の活性化は抑制された。

オートファジーに関する解析はLC3-GFP ベクターを導入した末梢血単球を用い、(1) 通常のオートファジー誘導方法、すなわちアミノ酸飢餓およびrapamycin (0.1 nM-1000 nM) 添加、(2)マクロファージ特異的オートファジー誘導方法 (3)recombinant human IFN-γ 添加培養の方法にてオートファジーを検出する系の確立を確立し、検討している。また、マウス腸炎モデルであるDSS 腸炎、CD45RB^{high} transfer model、IL-10KO での解析も開始している。

これらの結果より、腸管Mφの機能異常がクローン病の病態において本質的な役割を果たしていることが明らかとなった。また、CD14 陽性腸管Mφから産生されるIL-23 が、クローン病の腸管炎症において重要な役割を担っていることが示唆された。これらの知見をもとにMφの機能異常をターゲットとした炎症性腸疾患に対する新たな治療法の開発に道筋がつけられるものと考えられる。

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3件)

1. Hisamatsu T, Okamoto S, Hashimoto M, Muramatsu T, Andou A, Uo M, Kitazume MT, Matsuoka K, Yajima T, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Yamakado M, Sakai R, Ono N, Ando T, Suzuki M, Hibi T: Novel, objective, multivariate biomarkers composed of plasma amino acid profiles for the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease. PLoS One 7 (1): e31131, 2012. 査読有

2. Miyoshi J, Yajima T, Okamoto S, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Shimamura K, Nakazawa A, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Hibi T: Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. J Gastroenterol 46 (9): 1056-63, 2011. 査読有

3. Mikami Y, Kanai T, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Okazawa A, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Okamoto S, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Hibi T: Competition between colitogenic Th1 and Th17 cells contributes to the amelioration of colitis. Eur J Immunol 40 (9): 2409-2422,

2010.査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. Hisamatsu T, Uo M, Miyoshi J, Yoneno K, Inoue N, Ogata H, Kanai T, Hibi T: Intestinal CXCR4+IgG+ immature plasma cells contribute to the pathogenesis of ulcerative colitis through IgG Immune complex-FcγR signaling. 15th International Congress of Mucosal Immunology, Jul 5-9, 2011, Paris, France.

2. 久松理一、鎌田信彦、高山哲朗、齋藤理子、米野和明、松岡克善、岡本晋、井上詠、緒方晴彦、金井隆典、日比紀文：腸管マクロファージからみたクローン病のサイトカインネットワーク異常．第47回日本消化器免疫学会総会、シンポジウム、2010年7月8、9日、滋賀．

3. Saito R, Hisamatsu T, Takayama T, Kamada N, Ando S, Inoue N, Okamoto S, Kanai T, Hibi T: 胆汁酸はTGR5受容体を介してIL-12低産生型樹状細胞に分化誘導する/Bile acids generate IL-12 hypoproducing DCs via Tgr5 signaling pathway. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、ワークショップ、2009年12月2～4日、大阪.

4. 久松理一、鎌田信彦、本田治樹、北爪美奈、井上詠、岡本晋、金井隆典、日比紀文：クローン病におけるCD14+腸管マクロファージの抗原提示能について．第46回日本消化器免疫学会、シンポジウム、2009年7月23、24日、愛媛

5. 成瀬浩史、久松理一、鎌田信彦、岡本晋、井上詠、金井隆典、日比紀文：IL-10KOマウスにおけるマクロファージからのIL-12過剰産生機序の解明．第46回日本消化器免疫学会、一般演題、2009年7月23、24日、愛媛

〔図書〕(計0件)

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 詠 (INOUE NAGAMU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00232546

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし