

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790528

研究課題名（和文）樹状細胞オートファジーによる腸管粘膜免疫系ホメオスタシスの制御

研究課題名（英文）Regulation of gut mucosal homeostasis by autophagy in dendritic cells

研究代表者

手塚 裕之（TEZUKA HIROYUKI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：30375258

研究成果の概要（和文）：申請者は、腸管関連リンパ組織(GALT)の樹状細胞(DC)では構成的にオートファジーが誘導されていること、また同機構の誘導には腸内常在菌の細胞内捕捉が重要であることを明らかにした。腸炎モデルの検討から、DC オートファジーを欠如するマウスでは、腸炎回復期における粘膜組織の再生遅延が観察された。またこの遅延は、DC オートファジー不全による DC 内常在菌数の増加に伴う IL-6 および TNF- α の生産レベルの増加、ならびに DC による IL-23 の生産レベルの減少および IL-23 依存性に誘導される、組織修復を促す IL-22 の大腸組織からの生産レベルの減少によることが判明した。これらの結果から、GALT DC の構成的オートファジーは定常状態では腸内常在菌の刺激依存性に誘導されること、炎症状態では回復時の粘膜治癒機構に深い関わりがあることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We here showed that autophagy is constitutively induced in dendritic cells (DCs) in the gut-associated lymphoid tissues (GALT) under steady-state conditions and the induction is dependent on the engulfment of commensal bacteria. In a colitis model, DC-specific autophagy-deficient mice showed a delayed restoration of mucosal integrity in a recovery phase. Autophagy-deficient GALT DCs revealed increased intracellular commensal bacteria, increased production of IL-6 and TNF- α , and reduced production of IL-23 in the recovery phase of colitis. Importantly, the production of tissue-remodeling cytokine IL-22, which is induced by IL-23, was much reduced in the autophagy-deficient mice. Collectively, these results indicate that constitutive autophagy in GALT DCs is induced by the intracellular recognition of commensal bacteria, and suggest that the autophagy plays an important role in mucosal healing of colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫

キーワード：樹状細胞, オートファジー, 腸内常在菌, IgA, 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

腸管は食物抗原に対しては免疫寛容を、微生物抗原に対しては防御応答を誘導する、ユニークな粘膜免疫系を備えている。この免疫応答は、腸管関連リンパ組織(GALT)に局在する樹状細胞(DC)により制御されており、同 DC 機能は腸内常在菌の刺激依存性に付与されるものと考えられている。しかしながら、

DC が常在菌を認識感知する分子基盤、その結果生じる DC の形質変化、さらにそれが GALT DC に固有の機能発現にどのように繋がるかなどの詳細は不明である。

オートファジーは細胞が飢餓状態に陥った際に誘導される、細胞内小器官の分解機構として知られている。近年、オートファジーは DC による病原体の排除機構や抗原

提示機構にも重要であることが報告された (*Immunity* 32 : 227-239 (2010)). 腸管は、絶えずさまざまな異物に曝されていることから、同所では DC による異物の取り込みや抗原提示が常時誘導されている状態にあると考えられている。これらの知見から、GALT DC のオートファジー不全は、腸管粘膜免疫応答の破綻に繋がる可能性が予測される。

2. 研究の目的

腸内常在菌による GALT DC 機能の付与機構を解明するためには、同 DC に特化した現象を見出すことが重要である。この点に関して、申請者は定常状態において GALT DC では構成的にオートファジーが誘導されていることを見出している(未発表データ)。このことから、構成的な DC オートファジーが定常状態の腸管粘膜免疫系に特化した現象を誘導する上で重要な役割を担っている可能性が考えられる。本研究課題では、GALT DC の構成的オートファジーの誘導機構を明らかにし、次いで定常状態および炎症状態の粘膜免疫応答における DC オートファジーの重要性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腸内常在菌の検出：リンパ節における腸内常在菌の検出・同定は、16S rRNA を標的とする q-PCR 法を用いておこなった。また、*Enterococcus* の同定およびコロニー数の測定は EF 選択培地を用いておこなった。

(2) DC と腸内常在菌の共培養実験：LC3-GFP マウス由来骨髄細胞を GM-CSF で刺激することで誘導した DC と蛍光標識した *Enterococcus faecalis* とを共培養し、細胞内に捕捉された同菌体を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) 炎症性腸疾患モデル：マウスに 2% デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を 7 日間飲水摂取させ、その後通常の水に置き換えさらに 7 日間飼育し、経時的に体重変化や肉眼的所見(大腸短縮、大腸出血)を評価した。また、腸炎を発症したマウスの大腸組織および大腸粘膜固有層 DC の培養をおこない、培養上清中のサイトカインの生産レベルを ELISA 法にて測定した。同時に、経時的に大腸および腸間膜リンパ節を回収し、フローサイトメーターおよび凍結組織切片の蛍光免疫染色法を用いて GALT DC の頻度を調べた。

4. 研究成果

(1) 定常状態における DC の構成的オートファジーの役割：申請者は、オートファジー関連分子 LC3-GFP マウスを用いた検討から、定常状態において GALT DC にオートファジーが誘導されていることを見出している(未発表データ)。GALT DC は腸内常在菌を生かした状態で細胞内に捕捉し、粘膜固有層から腸間膜リンパ節に移行することが知られている。そこで、構成的オートファジーと腸内常在菌の関連性を明らかにする目的で、オートファジー関連分子 ATG5^{fllox/fllox} マウスと DC 特異的マーカー CD11c-cre マウスを交配することで、DC のみオートファジーが誘導されない ATG5^{DCKO} マウスを作製した。まず、腸間膜リンパ節 DC の細胞内の腸内常在菌の検出および同定をおこなったところ、ATG5^{DCKO} および対照(ATG5^{fllox/fllox})マウス、いずれの DC においても *Enterococcus* が検出されたが、その菌体数は ATG5^{DCKO} DC の方が有意に多かった。これに対して、マウス腸管の優勢菌である *Bacteroides* および *Clostridium* はリンパ組織で検出されなかった。これらの結果から、構成的オートファジーは細胞内の腸内常在菌数を制御していることが示唆された。

上述のように、ATG5^{DCKO} マウスでは、リンパ組織への腸内常在菌の移行頻度が高かったことから、抗体生産レベルが亢進していることが予測された。そこで、血清中の抗体価を調べたところ、ATG5^{DCKO} マウスの IgA および IgG1 生産レベルは対照マウスのものと同程度であった。また、GALT DC サブセット(CD11c^{hi}CD11b^{hi}, CD11c^{hi}CD11b^{lo})の頻度についても検証したところ、ATG5^{DCKO} マウスでは総 DC 数が 2 倍程度に増加していたものの、サブセット間の割合に差は認められなかった。

(2) GALT DC における構成的オートファジーの誘導機構：(1)の結果から、構成的オートファジーは腸内常在菌を細胞内に捕捉することで誘導される可能性が考えられた。この可能性を検証するために、LC3-GFP マウスの骨髄由来 DC と蛍光標識した *Enterococcus* との共培養実験をおこなった。その結果、DC 内に捕捉された常在菌はすべて LC3 分子によって覆われていることが観察された(図 1)。このことから、GALT DC における構成的オートファジーは腸内常在菌の刺激依存性に誘導されることが明らかとなった。

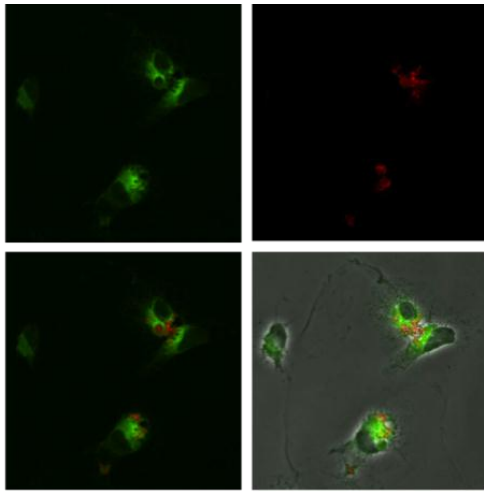


図1. DC細胞質内に捕捉された腸内常在菌 *Enterococcus faecalis*(赤)はオートファジー関連分子LC3(緑)によって覆われている。

(3) 炎症状態における DC オートファジーの重要性：炎症状態における DC オートファジーの役割を明らかにする目的で、DSS の飲水投与による炎症性腸疾患モデルを適用し検討をおこなった。その結果、ATG5^{DC-KO} マウスおよび対照マウスともに DSS 投与期間中は経時的な体重減少、大腸短縮、および上皮損傷による出血が観察された。興味深いことに、DSS 投与終了後、対照マウスでは体重や大腸組織の回復が観察されたのに対して、ATG5^{DC-KO} マウスではこれら回復が著しく遅延することが観察された(図 2)。

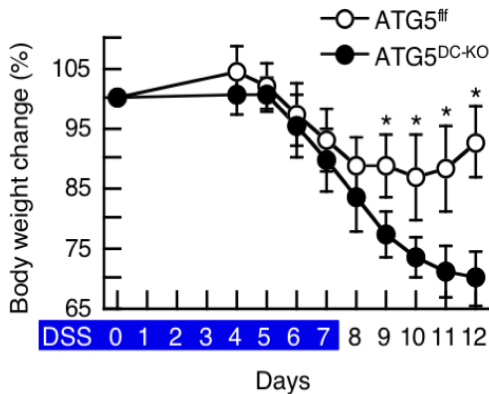


図2. ATG5^{DC-KO}マウスではDSS大腸炎の回復期において体重回復が認められない。

腸炎回復時における腸管 DC の機能を調べたところ、ATG5^{DC-KO} マウス由来 DC では細胞内 *Enterococcus* 数の増加および IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン生産レベルの著増が認められた。また、ATG5^{DC-KO} マウス由来 DC では IL-23 生産レベルの減少、ならびに IL-23 依存性に誘導される、組織修復を促すサイトカインである IL-22 の大腸組織

からの生産レベルの減少が認められた。これらの結果から、DC オートファジーは腸炎回復時の粘膜治癒機構に重要な役割を演じていることが示唆された。

以上の結果から、腸管 DC の構成的オートファジーは腸内常在菌の刺激依存性に誘導され、腸管ホメオスタシスの維持に重要な役割を演じていることが明らかとなった。

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 6 件)

1. Ichikawa, A., Kuba, K., Morita, M., Chida, S., Tezuka, H., et al., CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 187: 65-77 (2013). 査読有
DOI : 10.1164/rccm.201203-0508OC
2. 手塚裕之, 安部由紀子, 樗木俊聡「樹状細胞による抗体生産制御」臨床免疫・アレルギー科, 58 (5), 525-533, (2012). 査読無
3. 手塚裕之, 安部由紀子, 樗木俊聡「T 細胞非依存性 IgA 生産における樹状細胞の役割」臨床免疫・アレルギー科, 58 (3), 283-289, (2012). 査読無
4. 手塚裕之, 安部由紀子, 樗木俊聡「形質細胞様樹状細胞による T 細胞非依存性 IgA 生産制御」臨床免疫・アレルギー科, 55 (3), 678-692, (2011). 査読無
5. 樗木俊聡, 手塚裕之「pDC による新たな IgA 産生誘導メカニズム」医学のあゆみ, 240 (2) : 182-183 (2012). 査読無
6. 樗木俊聡, 手塚裕之「T 細胞非依存性 IgA 産生誘導における形質細胞様樹状細胞の質的優位性」細胞工学, 30 : 376-380 (2011). 査読無

[学会発表] (計 5 件)

1. Tezuka, H., et al., (2012) Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. The 12th International Symposium on Dendritic Cells (DC2012). October 7-11, 2012, Daegu, Korea.

2. Tezuka, H., et al., (2012) Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012 (MMCB2012). June 15-16, 2012, Tokyo, Japan.

(3) 連携研究者

3. 手塚裕之「T細胞非依存性IgA生産誘導における形質細胞様樹状細胞の質的優位性」第32回和漢医薬学総合研究所特別セミナー 和漢薬治療のターゲットとしての粘膜免疫機構, 2011年12月9-10日, 富山

4. Tezuka, H., et al., Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. 第40回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2011年11月27-29日, 千葉

5. 手塚裕之, 樗木俊聡「形質細胞様樹状細胞はT細胞に依存しない優れたIgA産生能力を備えている」第21回日本樹状細胞研究会, 2011年7月1日, 福岡

[図書] (計3件)

1. 手塚裕之, 樗木俊聡「腫瘍壊死因子」桂義元, 河本宏, 小安重夫, 山本一彦 編『免疫の事典』朝倉書店, 東京, 245 (2011). ISBN 878-4254-31093-1 C3547

2. 手塚裕之, 樗木俊聡「分泌抗体」(財)日本ビフィズス菌センター編、『腸内共生系のバイオサイエンス』丸善出版, 東京, 173-182 (2011). ISBN 978-4-621-08361-1

3. 手塚裕之, 安部由紀子, 樗木俊聡「k. 樹状細胞(2)機能」日本食品免疫学会編『食品免疫・アレルギーの事典』朝倉書店, 東京, 68-69 (2011). ISBN 978-4-254-43110-0 C3561

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 裕之 (TEZUKA HIROYUKI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：30375258

(2) 研究分担者