

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590936

研究課題名(和文) 腸管上皮リンパ球間クロストークによる免疫調節機構の解析

研究課題名(英文) CD66a-mediated crosstalk between intestinal epithelia and lymphocytes

## 研究代表者

永石 宇司 (NAGAIISHI, Takashi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60447464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は申請者がこれまで見出してきた「腸管組織の恒常性維持に必須の免疫調節機構は、上皮細胞と粘膜内リンパ球間における連鎖・協調によって制御される」という独自の概念や知見を基盤として、腸管上皮細胞とリンパ球とのクロストーク、およびそれによる粘膜内のサイトカイン分泌など免疫学的変動につて着目した。その結果、当該研究期間に得られた成果からCD66aの特異的シグナルがT細胞機能を変調させる事実が暗示された。すなわちこの分子によるT細胞受容体(TCR)シグナル調節の分子メカニズム、さらに恒常的な腸管粘膜の細胞間クロストークを介した免疫調節メカニズムの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory Bowel Disease (IBD) is characterized by unrestrained lymphocyte activation that results in the production of a variety of pro-inflammatory cytokines and other mediators. Understanding the mechanisms of lymphocyte regulation is therefore of significant importance to dysregulated mucosal inflammation such as IBD. An area that is of significant interest is the cell autonomous mechanisms of T cell regulation through proteins that have natural inhibitory functions when expressed on T lymphocytes. In this regard, we have observed that CD66a has the general property of negatively regulating T cell responses initiated by antigen presentation. Defining the mechanisms of CD66a-mediated T cell regulation will lead to a significant understanding of the manner in which manipulation of this molecule may provide insights into novel therapeutic methods for the treatment of IBD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 粘膜免疫 クロストーク サイトカイン CD66a

## 1. 研究開始当初の背景

細菌菌体成分や食餌抗原など腸管内腔の抗原物質に絶えず暴露される消化管粘膜において、「免疫寛容」の成立は局所ならびに全身の免疫学的恒常性維持に不可欠である。一方、この機構の破綻は種々の抗原への過剰で病的な免疫反応誘導を来し、IBD や食物アレルギーなどの病態に深く関わってくる。

## 2. 研究の目的

本申請研究は申請者がこれまで見出ししてきた「腸管組織の恒常性維持に必須の免疫調節機構は、上皮細胞と粘膜内リンパ球間における連鎖・協調によって制御される」という独自の概念や知見を基盤として、腸管上皮細胞と粘膜内リンパ球とのクロストーク、およびそれによる粘膜内のサイトカイン分泌など免疫学的変動について解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) CD66a が T 細胞の受容体シグナルに及ぼす影響の解明

誘発的過剰発現系を用いた T 細胞シグナルの生化学的解析

レトロウイルスベクター過剰発現系を用いた T 細胞機能の解析

(2) CD66a が上皮細胞の免疫学的機能に与える影響の解明

腸上皮細胞株を用いたサイトカインネットワーク関連遺伝子発現解析

初代培養上皮細胞を用いた抗原提示能関連遺伝子発現解析

実験腸炎組織を用いた網羅的遺伝子発現解析

(3) CD66a を介した GALT 内サイトカインネットワーク関連分子制御機構の解明

CD66a 制御性 IL-7 関連遺伝子の調節機構解析

## 4. 研究成果

本研究は申請者が独自に研究を展開してきたリンパ球の機能調節に注目し、腸管粘膜における免疫学的恒常性の維持におけるその作用意義について着目している。その結果、本研究では当該研究期間に以下のような成果が得られた。

(1) テトラサイクリン応答制御システムを用いて T 細胞株における接着因子 CD66a の過剰発現系を構築し、生化学的解析を行った。その結果、in vivo における T 細胞受容体 (TCR) の刺激によって誘導される特異的シグナルは CD66a の過剰発現によって有意に抑制されることが明らかになった。

(2) またそれと相関して、リコンビナントサイトカイン存在下において TCR を刺激したときに誘導される T 細胞内の STAT-4 および T-bet の活性化も CD66a の過剰発現とリガンドによるその刺激によって有意に抑制され

ることが明らかになった。

(3) さらにこうした反応は CD66a の細胞内ドメインのある特定の truncate 変異株もしくはチロシン残基の過剰発現によってむしろ阻害されることが確認された。

(4) レトロウイルスベクター-GFP-RV および DsRed-RV を用いてマウス T 細胞株における接着因子 CD66a の各 splice variant の過剰発現系を構築し、機能的解析を行った。これらのウイルスを感染させ GFP<sup>+</sup>あるいは DsRed<sup>+</sup>細胞を sorting し、T 細胞受容体 (TCR) シグナル依存的な細胞増殖能を解析した結果、細胞内ドメインにチロシン残基を有する CD66a の過剰発現によってのみこれが抑制されることを確認した。

(5) 野生型マウスから単離した CD4<sup>+</sup>T 細胞に上記と同様の過剰発現を誘導した結果、TCR 依存的な細胞増殖能のほか、IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生能、また CD69 などの活性化マーカーの発現も、やはり細胞内ドメインのチロシン存在下でのみ抑制されることを明らかにした。

(6) 野生型マウスから単離した CD4<sup>+</sup>T 細胞にレトロウイルスベクター-GFP-RV および DsRed-RV を用いて接着因子 CD66a の過剰発現を誘導して GFP<sup>+</sup>あるいは DsRed<sup>+</sup>細胞を sorting し、T 細胞受容体 (TCR) シグナルを解析した結果、細胞内ドメインの 2 つのチロシン残基に依存して TCR シグナルが抑制されることを確認した。

(7) T 細胞特異的な CD66a トランスジェニックマウスから単離した CD4<sup>+</sup>T 細胞の解析を行った結果も、上記と同様に TCR 依存的な細胞増殖能のほか、IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生能、また CD69 などの活性化マーカーの発現が、やはり細胞内ドメインのチロシン残基の存在下で抑制され、さらに上皮細胞に発現する生理的リガンドや agonistic な抗体による細胞外ドメインの刺激によって、こうした反応が一層顕著になることが明らかとなった。

これらの研究結果は in vivo における生理的な T 細胞機能を CD66a シグナルが実際に変調させ、腸管粘膜の免疫調節に深く関与している事実を示唆する。そしてこの分子が炎症性腸疾患の病態において治療標的になりうることを示唆された。さらに現在、この分子メカニズムが関連すると考えられる異種細胞間とのクロストークに着目し、その解析を進めている。今後はこの分子を介した免疫調節メカニズムを追求することによって、炎症性腸疾患に対する新規治療法開発の基盤に繋げることができると期待される。

## 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 8 件)

Matsuzawa Y, Oshima S, Takahara M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Kobayashi M, Nibe Y, Nozaki K, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Ma A, Watanabe M. TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting mTOR and promoting autophagy. **Autophagy**. 11; in press, 2015 査読有

DOI: 未

Fukushima K, Tsuchiya K, Kano Y, Horita N, Hibiya S, Hayashi R, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Oshima S, Nagaishi T, Ryuichi O, Nakamura T, Watanabe M. Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor  $\alpha$  induces high malignant potential in colon cancer cell line. **Cancer Sci**. 106; in press, 2015 査読有 DOI: 10.1111/cas.12703

Matsuzawa Y, Oshima S, Nibe Y, Kobayashi M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. RIPK3 regulates p62-LC3 complex formation via the caspase-8-dependent cleavage of p62. **Biochem Biophys Res Commun**. 456; 298-304, 2015 査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.075

Suzuki M, Nagaishi T, Yamazaki M, Onizawa M, Watabe T, Sakamaki Y, Ichinose S, Totsuka M, Oshima S, Okamoto R, Shimonaka M, Yagita H, Nakamura T, Watanabe M. Myosin light chain kinase expression induced via tumor necrosis factor receptor 2 signaling in the epithelial cells regulates the development of colitis-associated carcinogenesis. **PLoS ONE**. 9; e88369 1-10, 2014 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0088369

Chen L, Chen Z, Baker K, Halvorsen EM, da Cunha AP, Flak MB, Gerber G, Huang YH, Hosomi S, Arthur JC, Dery KJ, Nagaishi T, Beauchemin N, Holmes KV, Ho JW, Shively JE, Jobin C, Onderdonk AB, Bry L, Weiner HL, Higgins DE, Blumberg RS. The short isoform of the CEACAM1 receptor in intestinal T cells regulates mucosal immunity and homeostasis via Tfh cell induction. **Immunity**. 37; 930-946, 2012 査読有

DOI: 10.1016/j.immuni.2012.07.016

Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5<sup>+</sup> stem cell. **Nat Med**. 18; 618-623, 2012 査読有

DOI: 10.1038/nm.2695

Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R,

Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M. Real-time analysis of

P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured *in vitro*.

**Biochem Biophys Res Commun**. 419; 238-243, 2012 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.155

Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M. The development of colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells is regulated by IL-7 in collaboration with natural killer cell function in a murine model of colitis. **J Immunol**. 188; 2524-2536, 2012 査読有

DOI: 10.4049/jimmunol.1100371

〔学会発表〕(計 20 件)

永石宇司、渡部太郎、渡辺守、他. 大腸上皮細胞特異的な TNF シグナルによる IBD 合併大腸癌発生機構の解析. 第 11 回日本消化管学会総会学術集会. 2015.2.13. 京王プラザホテル (東京)

Watabe T, Nagaishi T, Watanabe M et al. TNFR2 signaling in the epithelia may be involved in the development of colitis-associated tumor. 第 43 回日本免疫学会総会学術集会. 2014.12.12. Kyoto International Conference Center (Kyoto)

齊藤詠子、永石宇司、渡辺守、他. タクロリムスを使用した難治性潰瘍性大腸炎の内視鏡的検討. 第 99 回日本消化器内視鏡学会関東地方会. 2014.12.7. シェーンバッハ砂防 (東京)

Jose N, Nagaishi T, Watanabe M, et al. The expression of myosin light chain kinase induced by NF- $\kappa$ B activation is involved in the development of colitis-associated cancer. United European Gastroenterology Week. 2014.10.22. Vienna (Austria)

Watabe T, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Epithelial MLCK induced via NF- $\kappa$ B activation may be involved in the development of colitis-associated carcinogenesis. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014.9.27. Pacifico Yokohama (神奈川)

渡部太郎、永石宇司、渡辺守、他. 腸管上皮における TNF シグナルは IBD 合併大腸癌の発生を促進させる. 免疫サマースクール. 2014.7.29. オリビアン小豆島 (香川)

渡部太郎、永石宇司、渡辺守、他. 腸管上皮細胞における特異的 TNF シグナルは IBD 合併大腸癌の発生を促進させる. 第 51 回日本消化器免疫学会総会. 2014.7.11. 京都大学芝蘭会館 (京都)

Nagaishi T, Watanabe M, et al. Myosin light chain kinase induced by NF- $\kappa$ B is involved in the development of colitis-associated carcinogenesis.

Federation of Clinical Immunology Societies. 2014.6.26. Chicago (U.S.A.)

鈴木雅博、永石宇司、渡辺守、他. IBD 合併大腸癌モデルの発生過程における上皮細胞特異的 TNF シグナルの解析. 第 100 回日本消化器病学会総会. 2014.4.25. 東京国際フォーラム (東京)

Suzuki M, Nagaishi T, Watanabe M et al. Myosin light chain kinase induced by NF- $\kappa$ B is involved in the development of colitis-associated tumor. 第 42 回日本免疫学会総会学術集会. 2013.12.11. 幕張メッセ (千葉)

永石宇司、渡辺守. 炎症性腸疾患の病態理解と実験モデル. 第 41 回日本臨床免疫学会総会. 2013.11.29. 海峡メッセ下関(山口)

Nagaishi T, Watanabe M, et al. Natural killer cells regulate the early stage of pathogenic T cell development in an IBD model. United European Gastroenterology Week. 2013.10.14. Berlin (Germany)

Suzuki M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Myosin light chain kinase is involved in the development of an animal model of colitis-associated tumor. 11<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology. 2013.7.17. Vancouver (Canada)

Nagaishi T, Watanabe M, et al. Natural killer cells abrogate an animal model of colitis by targeting the early stage of pathogenic T cell development. Digestive Disease Week 2013 (American Gastroenterology Association). 2013.5.18. Orlando (U.S.A.)

Nagaishi T, Watanabe M, et al. Natural killer cells regulate the early stage of pathogenic T cell development in a murine model of colitis. *Immuno*. 2013.3.11. Barcelona (Spain)

Nagaishi T, Watanabe M, et al. Natural killer cells suppress an animal model of colitis by targeting the early stage of pathogenic T cell development. 第 41 回日本免疫学会総会学術集会. 2012.12.5. Kobe International Conference Center (Kobe)

Nagaishi T, Watanabe M, et al. Natural killer cells suppress an animal model of IBD by targeting the early stage of pathogenic T cell development. Asian IBD Symposium. 2012.11.3. Seoul (Korea)

永石宇司、渡辺守、他. Natural killer cells suppress an animal model of IBD by targeting the early stage of pathogenic T cell development. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012.9.27. 京王プラザホテル (東京)

永石宇司、渡辺守、他. 慢性大腸炎モデル

における腸炎惹起性 T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される. 第 49 回日本消化器免疫学会総会. 2012.7.6. 城山観光ホテル (鹿児島)

Nagaishi T, Watanabe M et al. Natural killer cells regulate colitis by targeting the early stage of pathogenic T cell development. Federation of Clinical Immunology Societies. 2012.6.22. Vancouver (Canada)

〔図書〕(計 4 件)

永石宇司、藤井俊光、渡辺守. 最新医学社. 最新医学：臓器特異的自己免疫性疾患- 腸管の粘膜免疫と炎症性腸疾患. 2013. 1296-1325

鈴木雅博、永石宇司、渡辺守. 先端医学社. GI Research：IBD と炎症性サイトカイン- ケモカイン. 2012. 53-64

永石宇司、渡辺守、他. マイライフ. 消化器と免疫：慢性大腸炎モデルにおける腸炎惹起性 T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される. 2012. 35-38

永石宇司、渡辺守、他. 日本臨床免疫学会. 日本臨床免疫学会誌：NK 細胞は IL-7 と協調し腸炎惹起性 T 細胞の分化増殖を制御する. 2012.

〔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.tmd.ac.jp/grad/gast/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永石 宇司 (NAGAISHI, Takashi)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60447464

### (2) 研究分担者

中村 哲也 (NAKAMURA, Tetsuya)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授  
研究者番号：70265809

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：10175127

### (3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

山崎 元美 (YAMAZAKI, Motomi)  
鬼沢 道夫 (ONIZAWA, Michio)  
鈴木 雅博 (SUZUKI, Masahiro)  
渡部 太郎 (WATABE, Taro)  
細谷 明德 (HOSOYA, Akinori)  
Nisha Jose (JOSE, Nisha)  
Shuan Wang (WANG, Shuan)  
東海 有沙 (TOKAI, Arisa)  
柘植 直人 (TSUGE, Naoto)  
川井 理紗 (KAWAI, Risa)