

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 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：24590937

研究課題名(和文) 特異的NK細胞受容体・リガンドを標的としたクローン病新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for Crohn's disease by targeting an NK cell subset

研究代表者

長堀 正和 (NAGAHORI, Masakazu)

東京医科歯科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：60420254

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)：申請者らがこれまでに得られた知見を基盤として独自に研究を展開してきたナチュラルキラー(NK)細胞による特異的受容体/リガンドを介したその細胞傷害活性に着目し、本研究では炎症性腸疾患の病態における特異的な免疫学的異常に対する新規治療法の開発基盤樹立を目標とした研究を展開している。その結果、当該研究期間に得られた成果から、あるNK細胞サブセットの機能解析を行うことに成功した。そして炎症性腸疾患の病態において誘導される獲得免疫反応に対し、このNK細胞サブセットがその新規治療法に繋がる可能性が暗示された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that IL-7^{-/-}-RAG^{-/-} mice receiving naive T cells failed to induce colitis. Such abrogation of colitis may be associated not only with the lack of IL-7, but also with the induction of T cell apoptosis at an early stage of colitis development. Natural killer (NK) cells may be associated with the suppression of pathogenic T cells, and may induce apoptosis of CD4⁺ T cells. To further investigate these roles of NK cells, RAG^{-/-} and IL-7^{-/-}-RAG^{-/-} mice that had received naive T cells were depleted of NK cells. NK cell depletion at an early stage during effector/memory T cell (TEM) development resulted in exacerbated colitis in recipient mice even in the absence of IL-7. Increased TEM were observed in the T cell-reconstituted RAG^{-/-} recipients when NK cells were depleted. These results suggest that NK cells suppress colitis severity in the T cell-reconstituted recipient mice through targeting of colitogenic TEM present at the early stage of T cell development.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 クローン病 新規治療法 粘膜免疫 NK細胞

1. 研究開始当初の背景

難治性のクローン病に対する今日の治療法は重篤な副作用が問題となっており、これらを凌駕しつつ病態特異性に着目した新規治療法の開発が期待される。

食餌抗原や細菌菌体成分などに絶えず暴露される消化管粘膜において、免疫寛容の成立は免疫学的恒常性の維持に不可欠である。この機構の破綻は種々の抗原への過剰な免疫反応誘導を来し、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患(IBD)の病態に深く関わってくる。しかしクローン病においていずれの調節機構の破綻が誘引となり、獲得免疫の異常な賦活が誘発されているのかは、未だ十分に理解されていないのが現状である。

2. 研究の目的

近年の免疫学の進歩からNK細胞やそのサブセットに関するデータが集積されつつある。これまでNK細胞は腫瘍細胞やウイルス感染細胞などに対し細胞傷害活性を示す自然免疫系細胞という概念が定着されてきた。しかしこのNK細胞の新たな機能として、獲得免疫系の調節に関わる可能性がこれまでに報告されている。このことはNK細胞が獲得免疫系におけるTh1ないしTh17の機能もしくはその誘導自体を調節しえることを大きく示唆している。また一方、最近ではNKp46⁺細胞など一部のサブセットによるIL-22やIFN- γ の産生や、実際にクローン病患者においてこうしたサブセットのプロファイル変化が確認されている。

そして我々はこれまで集積してきた実験腸炎およびIL-7の研究を通じ、腸炎惹起性を獲得しているエフェクターT細胞に対しNK細胞が特異的にアポトーシスを誘導したり、Granzyme BやPerforinによって細胞溶解をおこなう事実を確認している。この発見を基盤とし、本研究ではNK細胞によって獲得免疫反応がいかに制御されて「免疫寛容」と「免疫賦活」の適切なバランスが維持されるのか、その特殊な機構の詳細を解明するとともに、最終的にはクローン病に対する疾患特異性の高い新規治療法への可能性を追求し、その開発基盤を樹立させる。

3. 研究の方法

(1)NK細胞サブセットとそのレセプター機能の基礎解析

NKレセプターによる各NK細胞サブセットのプロファイルとその単離・基本的機能解析
各NK細胞サブセットの培養法の確立とその機能解析

各NKレセプターの機能解析と網羅的遺伝子発現解析

(2)腸炎惹起性T細胞を標的とした特異的NK細胞サブセットによる細胞治療の開発基盤樹立

腸炎惹起性T細胞の分化誘導とそれを標的としたNK細胞サブセットの解析

実験IBDモデルにおける特異的NK細胞サブセットによる細胞治療の解析

(3)特異的NK細胞サブセットの選択的賦活および再移入による細胞治療法の技術基盤樹立

特異的NKレセプター高親和性ビーズの作製とその特異性の解析

4. 研究成果

本研究では申請者らがこれまでに得られた知見を基盤として独自に研究を展開してきたナチュラルキラー(NK)細胞による特異的受容体/リガンドを介したその細胞傷害活性に着目し、炎症性腸疾患の病態における特異的な免疫学的異常に対する新規治療法の開発基盤樹立を目標とした研究を展開している。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) マウスの骨髄、脾臓、および腸管、その他の臓器からNK1.1陽性細胞を単離し、AsialoGM1、IL-7R、NKG2D、Ly49C+1、Ly49G2、Ly49F、CD94、KLRG1、CD43、CD44、CD66a、CD122、CD244、CD11b、Dx5、CD3といったNKレセプター、および分化・活性化マーカーによる各NK細胞亜集団の分類化を行った。

(2) またこれらのサブセットをFACS sortingによって単離し、それぞれのIFN- γ 、Granzyme B、Perforinの発現量や産生能をRT-PCRもしくはELISAで確認し、Fas-L、TRAILなどの発現をFACSで解析することによって、これらの集団のプロファイル構築を行った。

(3) こうして同定された各NK細胞サブセットをFACS sortingによって単離し、IL-2などのリコンビナントサイトカインの添加を行うなどして、各々のサブセットに対して高いviabilityが維持できる培養系を樹立させることに成功した。

(4) マウスの脾臓からNK細胞を単離し、つづいてAsialoGM1陽性亜集団をFACS sortingによって単離したのちにIL-2などのリコンビナントサイトカインの添加など適切な条件下で培養した結果、このサブセットはエフェクター・メモリーT細胞の分化や増殖を抑制する機能がある可能性を見出した。

(5) マウスの脾臓から単離したナイーブT細胞をRag欠損マウスに移入し、腸炎惹起性のエフェクター・メモリーT細胞が誘導されていく過程を経時的に観察し、適切な時点このマウスから単離した各分化段階のT細胞とともに、上記のNK細胞サブセットを共培養した結果、特定の分化段階にあるT細胞に対して特異的な細胞傷害活性がある可能性を見出すことに成功した。

(6) マウスの脾臓からNK細胞を単離し、さらにこのうちAsialoGM1陽性亜集団をFACS sortingによって単離しIL-2などのリコンビナントサイトカインの添加など適切な条件下で培養したサブセットを、最終的にエフェクター・メモリーT細胞と混合培養した。そ

の結果、この集団がT細胞の分化や増殖を抑制する機能がある可能性を ex vivo の実験系で実証した。

(7) マウスの脾臓から単離したナイーブT細胞を Rag 欠損マウスに移入し、腸炎惹起性のエフェクター・メモリーT細胞が誘導されていく過程において、適切な時点で上記のNK細胞サブセットをT細胞集団が再構築されたマウスにさらに移入した結果、実際に in vivo でT細胞の分化・増殖を抑制し腸炎の発症を抑制させることに成功した。

これらの成果は、あるNK細胞サブセットが獲得免疫系を調節し得る事実を暗示するばかりでなく、その詳細なメカニズムを解明できたといえる。そして炎症性腸疾患の病態において誘導される獲得免疫反応に対し、このNK細胞サブセットがその新規治療法に繋がる可能性を示唆し、その開発基盤の樹立に大きく寄与すると期待される。

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 14 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 α 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

Ohfuji S, Fukushima W, Watanabe K, Sasaki S, Yamagami H, Nagahori M, Watanabe M, Hirota Y; Japanese Case-Control Study Group for Ulcerative Colitis. Pre-illness isoflavone consumption and disease risk of ulcerative colitis:

amulticenter case-control study in Japan.

PLoS ONE. 9; e110270, 2014 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0110270

Takenaka K, Ohtsuka K, Kitazume Y, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Naganuma M, Araki A, Watanabe M. Comparison of magnetic resonance and balloon enteroscopic examination of the small intestine in patients with Crohn 's disease. **Gastroenterology**. 147; 334-342, 2014 査読有

DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.008

Saito E, Nagahori M, Fujii T, Ohtsuka K, Watanabe M. Efficacy of salvage therapy and its effect on operative outcomes in patients with ulcerative colitis. **Digestion**. 89; 55-60, 2014 査読有

DOI: 10.1159/000356221

Fujii T, Naganuma M, Kitazume Y, Saito E, Nagahori M, Ohtsuka K, Watanabe M. Advancing magnetic resonance imaging in Crohn's disease. **Digestion**. 89; 24-30, 2014 査読有

DOI: 10.1159/000356210

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

Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Morio J, Saito E, Watanabe M. Poor recall of prior exposure to varicella zoster, rubella, measles, or mumps in patients with IBD. **Inflamm Bowel Dis**. 19; 418-422, 2012 査読有

DOI: 10.1002/ibd.23027

Naganuma M, Fujii T, Kunisaki R, Yoshimura N, Takazoe M, Takeuchi Y, Saito E, Nagahori M, Asakura K, Takebayashi T, Watanabe M. Incidence and characteristics of the 2009 influenza (H1N1) infections in inflammatory bowel disease patients. **J Crohns Colitis**. 7; 308-313, 2012 査読有

DOI: 10.1016/j.crohns.06.019

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⁺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⁺ 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 28 件)

1. Matsuoka K, Nagahori M, Watanabe M et al. The Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) is useful to evaluate endoscopic improvement and to predict medium-term prognosis in Ulcerative Colitis patients treated with tacrolimus. 10th Congress of ECCO. 2015.2.20. Barcelona (Spain)
2. 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)
3. 齋藤詠子、長堀正和、渡辺守 他. 潰瘍性大腸炎におけるインフリキシマブ (IFX) 濃度と短期の治療効果に関する検討. 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)
4. 藤井俊光、長堀正和、渡辺守 他. クローム病における内視鏡的粘膜治療と MRenterocolonography (MREC) 活動性の関係と長期予後についての検討. 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)
5. 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)
6. 齋藤詠子、永石宇司、長堀正和、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. シェーンバツ八砂防 (東京)
 7. 齋藤詠子、長堀正和、渡辺守. 難治性潰瘍性大腸炎(UC)における内科治療と手術例での予後の検討. JDDW2014. 2014.10.25 神戸国際会議場 (神戸)
 8. 藤井俊光、長堀正和、渡辺守. クローム病における MRenterocolonography (MREC) での病態評価と入院・手術予測. JDDW2014. 2014.10.23 神戸国際会議場 (神戸)
 9. Jose N, Nagaishi T, Watanabe M, et al. The expression of myosin light chain kinase induced by NF- κ B activation is involved in the development of colitis-associated cancer. United European Gastroenterology Week. 2014.10.22. Vienna (Austria)
 10. Fujii T, Nagahori M, Otsuka K, Watanabe M et al. MR enterocolonography can identify patients who need additional treatment by predicting recurrence, hospitalization and surge of Crohn's disease patients in remission. United European Gastroenterology Week. 2014.10.20. Vienna (Austria)
 11. Takenaka K, Nagahori M, Watanabe M et al. Magnetic resonance enterocolonography can detect small intestinal active lesions in crohn's disease;comparison with balloon enteroscopy. United European Gastroenterology Week. 2014.10.20. Vienna (Austria)
 12. Watabe T, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Epithelial MLCK induced via NF- κ 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)
 13. 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)
 14. 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)
 15. Nagaishi T, Watanabe M, et al. Myosin light chain kinase induced by NF- κ B is involved in the development of colitis-associated carcinogenesis.

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

16.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)

17.齊藤詠子、長堀正和、渡辺守. IBD の治療 ; Real practice における選択とその根拠. 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)

18.Suzuki M, Nagaishi T, Watanabe M et al. Myosin light chain kinase induced by NF-kB 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)

19.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)

20.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)

21.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. 11th International Congress of Mucosal Immunology. 2013.7.17. Vancouver (Canada)

22.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.)

23.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)

24.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)

25.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)

26.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)

27.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)

28.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 8 件)

竹中健人、長堀正和、渡辺守、他. 先端医学社. IBD Research 9;1号: MRE を用いた IBD の診断のポイント. 2015 66-73

長堀正和. 医学書院. 現場のエキスパートが教える実践! IBD 診療: 1. IBD 診療のコツ 1-4 IBD を診断するうえでのポイント. 2014 30-31

長堀正和. 医学書院. 現場のエキスパートが教える実践! IBD 診療: 2. 各治療の最適化とコツ 2-1 基本原則: どのように考えるか? 2014 90-95

大塚和朗、長堀正和、渡辺守、他. 日本メディカルセンター. Intestine 18;4号:

【日常遭遇する大腸炎の鑑別-内視鏡を中心に】サルモネラ腸炎(解説/特集). 373-377

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

長堀 正和 (NAGAHORI, Masakazu)

東京医科歯科大学・医学部・特任准教授

研究者番号: 60420254

(2) 研究分担者

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

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

無し

(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)