

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659375

研究課題名(和文)腸炎惹起性記憶T細胞reprogramming細胞療法への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to the cell therapy by reprogramming colitogenic memory T cells

研究代表者

金井 隆典(Kanai, Takanori)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40245478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)が再燃するのは、腸炎惹起性メモリー細胞が残存していることが原因であることを報告してきた。本研究は、このメモリー細胞を制御することで、再燃を抑制する治療法の開発につなげることを目的とした。本研究の結果は以下の通りである。1. Th17はLymphoid tissue inducer-like cellによって誘導された。2. Classical Th1は、alternative Th1の存在下で腸炎惹起性を獲得した。3. 整腸剤であるClostridium butyricumが、抑制性マクロファージを誘導した。IBDの慢性化には、様々な細胞集団が関与していた。

研究成果の概要(英文)：We reported that the persistence of colitogenic memory cells are responsible for recurrence of inflammatory bowel disease (IBD). This study aimed to investigate the regulation of the colitogenic memory cells, leading to the development of new therapy for suppression of IBD recurrence. The results of the study is as below: 1. Th17 cells were induced under the influence of Lymphoid tissue inducer-like cell, 2. Classical Th1 cells obtained colitogenicity in the presence of alternative Th1 cells, 3. Clostridium butyricum, which is used as probiotics, induced anti-inflammatory macrophages. These results suggest the involvement of various cell types in the development of chronic inflammation of IBD.

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 Th17細胞 Th1細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD) は大腸の慢性炎症性疾患であり、寛解と再燃を繰り返すことを特徴とする。IBDは腸に限局した疾患として捉えられて、内科的な治療の継続が困難な症例に対しては腸病変の外科的局所切除が必要とされてきた。術後、IBDの病態は外科的寛解によって一旦健康状態にリセットされたとしても、ほぼ100%の患者で手術前と同一の疾患、同様な病変を再燃する。我々はこのようなIBDの永続性・難治性の主座として、免疫の記憶(メモリー)という概念を提唱し、一連の研究報告を行ってきた。

すなわち、疾患の責任細胞は抗原を特異的に認識し記憶する免疫記憶T細胞がIBD発症時に形成され、ひとたび寛解導入に成功しても潜在する腸炎責任免疫記憶T細胞の再活性化が再燃を引き起こすとの仮説である。重要なことは、脳の記憶システムと異なり、免疫の記憶システムは移動可能な(mobile)免疫記憶リンパ球によって成立することである。

腸炎責任免疫記憶T細胞は全身に播種しているため、IBDを腸局所に限局した疾患としてではなく、全身疾患と捉えることが重要である。実際、我々はマウス炎症性腸疾患モデルを用いて、慢性大腸炎発症時に腸炎責任免疫記憶T細胞が腸管ではなく全身のinterleukin (IL)-7と腸内細菌由来のToll-like receptor (TLR)シグナルに依存し、腸炎惹起性メモリー細胞は腸管から離れた骨髄にも潜在することを見出している。これを裏付けるように、最近開発されたリンパ球の血中循環を遮断する新規の免疫抑制剤FTY720がIBDモデルにおいて有効であった。さらに、我々はメモリー化し、長命と考えられた腸炎惹起性記憶細胞は免疫学的加齢の過程で抑制性細胞へとコンバートすることも見出している。

これらの準備状況に立脚し、本プロジェクトでは遺伝子導入によって刺激性から抑制性記憶T細胞へのコンバートを動物実験によって十分に検証する。

2. 研究の目的

IBDである潰瘍性大腸炎およびクローン病は再燃と寛解を繰り返し、生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる難病である。生物学的製剤が登場し、病勢のコントロールおよび予後は大幅に改善したが、根治を得ることは未だに出来ない。

今回の研究では、IBDの病態は、「疾患のプロトタイプを記憶した細胞、すなわち腸炎惹起性記憶(メモリー)T細胞が生涯にわたって全身に播種した病態である」という独自の仮説に立脚し、抗原記憶を「刺激性」から「抑制性」へとコンバートする免疫系のリセットという細胞療法を確立し、IBDの根治治療を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) マウス腸炎モデルを用いた腸炎惹起性記憶細胞のコンバート

CD4⁺CD45Rb^{high} 移入腸炎モデルで腸炎を惹起し、腸管粘膜内に存在する腸炎惹起性メモリーT細胞を分離する。これらの細胞に抑制性細胞のマスター遺伝子であるFOXP3を、レンチウイルスベクターを用いて強制発現し、腸炎抑制性T細胞へのreprogrammingを試みる。

さらに、転換された腸炎抑制性T細胞を、CD4⁺CD45Rb^{high}移入腸炎モデルを用いて、腸炎を*in vivo*で抑制する能力を有するのかを検討する。

(2) 腸炎惹起性細胞の分化誘導機構の解明

Wild typeマウス、Th17細胞への分化に必須の転写因子であるROR γ tを欠損したマウスから単離したCD4⁺CD45Rb^{high}細胞(naïve Th細胞)をRag2^{-/-}マウスに移入し、腸管でのTh1細胞やTh17細胞への分化を*in vivo*で検討した。

(3) Probiotics製剤による腸炎抑制効果の検証

Probiotics製剤である*Clostridium butyricum*を投与したマウスにdextran sulfate sodium (DSS)を投与し、腸炎抑制効果を検討した。また、DSS腸炎を起こしたマウスより腸管マクロファージを分離し、*Clostridium butyricum*を添加し、サイトカイン産生を調べた。

4. 研究成果

本研究では、腸炎惹起性細胞を制御することで、IBDの再燃を抑制する治療法の開発につながることを目的に検討を行い、下記の結果を得た。

(1) レンチウイルスベクターを用いて、CD4⁺CD45Rb^{high} 移入腸炎モデルの腸管粘膜内に存在する腸炎惹起性メモリーT細胞にFOXP3遺伝子導入を試みたが、十分な導入効率を得ることができなかった。原因としては、腸炎惹起性メモリーT細胞の分裂能が*in vitro*では低いことが考えられた。

(2) Lymphotoxin (LT) $\alpha^{-/-}$ マウスでは、腸管の恒常性維持に重要であるNaturally occurring Th17細胞が減少していた。これは、LT依存性のLymphoid tissue inducer (LTi)-like cellが欠損しているためであることを明らかとし、Naturally occurring Th17細胞はLTi-like cellによって誘導され、腸管の恒常性維持に関与していることを示した。

(3) われわれらは、Th1細胞にはnaïve T細胞から直接分化するclassical Th1細胞と、Th1/17細胞を経て分化するalternative Th1

細胞が存在することを報告してきた。本研究では、classical Th1 細胞は単独では炎症を惹起することができず、alternative Th1 細胞の存在下でのみ腸炎を惹起する能力を獲得できることを明らかにした。これは、従来から世界的に論争になっている Th1 と Th17 のどちらが腸炎惹起性を有するのか、という命題に対する回答を与えるものと考えている。

(4) Probiotics 製剤として臨床的に用いられている *Clostridium butyricum* が、DSS 腸炎モデルを抑制した。さらに、DSS 腸炎を起こしたマウスから単離した腸管マクロファージを *Clostridium butyricum* で刺激したところ、著明な IL-10 産生を認めた。IL-10^{-/-} では、*Clostridium butyricum* による腸炎抑制効果は認めなかったことより、*Clostridium butyricum* は、腸管マクロファージからの IL-10 産生を介して、抗炎症作用を有することが明らかとなった。

本研究では、当初の予定したレンチウイルスベクターを用いた FOXP3 強制発現による炎症惹起性 T 細胞の抑制性細胞への reprogramming には残念ながら成功しなかった。しかし、派生した検討により、IBD における腸管の慢性炎症維持には、従来考えられてきた単純な Th1/Th17 バランスのみならず、alternative Th1 や natural occurring Th17 も関与していることを明らかにした。これらの知見は、腸管炎症における個々の細胞群の役割を明確にし、これらの細胞群の複雑な相互作用も含めて解明した点において、重要な成果であると考えている。さらには、これらの細胞群を標的とする新規治療法の開発に向けた知見が本研究で得られたと考えている。

また、本研究では probiotics 製剤によって、炎症性マクロファージを抑制性マクロファージへ転換することが可能であることを示すことができた。これは、腸炎惹起性細胞の reprogramming には遺伝子工学的な方法のみではなく、安全性の高い probiotic 製剤を使用することが可能であることを示す画期的な成果であり、世界的にも注目を集めている。また、T 細胞のみならず、マクロファージといった抗原提示細胞の形質転換も IBD 治療の重要な治療ターゲットとなることも明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver

to inflammation. *PLoS One*. 査読有, 2, 2014, e84619

DOI: 10.1371/journal.pone.0084619

Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe*. 査読有, 13, 2013, 711-22

DOI: 10.1016/j.chom.2013.05.013

Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Matsumoto S, Watanabe M. Th1/Th17-mediated interstitial pneumonia in chronic colitis mice independent of intestinal microbiota. *J Immunol*. 査読有, 190, 2013, 6616-25

DOI: 10.4049/jimmunol.1202930

Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M. Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. *Gut*. 査読有, 62, 2013, 1142-52

DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302029

Uo M, Hisamatsu T, Miyoshi J, Kaito D, Yoneno K, Kitazume MT, Mori M, Sugita A, Koganei K, Matsuoka K, Kanai T, Hibi T. Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through Fc R-mediated CD14 macrophage activation. *Gut*. 査読有, 62, 2013, 1734-44

DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303063

Ono Y, Kanai T, Sujino T, Nemoto Y, Kanai Y, Mikami Y, Hayashi A, Matsumoto A, Takaishi H, Ogata H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T. T-helper 17 and Interleukin-17-Producing Lymphoid Tissue Inducer-Like T Cells Make Different Contributions to Colitis in Mice. *Gastroenterology*. 査読有, 143, 2012, 1288-97

DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.108

Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Hisamatsu T, Hibi T. ROR t-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*. 査読有, 5, 2012, 240-47

DOI: 10.1038/mi.2012.6

Yamaji O, Nagaiishi 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 NK cell function in a murine model of colitis. *J Immunol.* 査読有, 188, 2012, 2524-36
DOI: 10.1152/ajpgi.00071.2008

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
三上 洋平 (Yohei Mikami)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80528662

〔学会発表〕(計4件)

Saigusa K, Kanai T, Sujino T, Handa T, Hayashi A, Mikami Y, Mizuno S, Matsumoto A, Matuoka Y, Sato T, Hisamatsu T, Hibi T. Colitogenic Th17 Cells may Help the Generation of Colitogenic ROR t-Independent Classical Th1 Cells, 16th International Congress of Mucosal Immunology, 2013年7月17日, Vancouver, Canada

Hayashi A, Kanai T, Sato T, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Yoshimura A, Kamada N, Yagita H, Hibi T. Clostridium Butyricum Regulates IL-10 Production in Normal and Inflammatory Conditions Through Different Target Cells, Digestive Disease Week 2013, 2013年5月19日, Orlando, USA

金井隆典、筋野智久、三上洋平、日比紀文。炎症性腸疾患と健常にそれぞれ存在する腸管 Th17 細胞の決定的な相違の追求, 第40回日本臨床免疫学会総会, 2012年9月27日, 東京

木村佳代子、金井隆典、林篤史、筋野智久、三上洋平、半田一己、松岡克善、佐藤俊朗、久松理一、日比紀文。腸管における Ror γ t 依存的 Innate Lymphoid cells(ILCs)の機能解析及び炎症制御能の解明, 第49回日本消化器病学会総会, 2012年7月5日, 鹿児島

〔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

金井 隆典 (Takanori Kanai)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40245478