

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462014

研究課題名(和文) ヒト腸管粘膜固有層におけるCD11c陽性抗原提示細胞の系統的機能的解析

研究課題名(英文) Analysis of CD11c+ cells in human intestinal lamina propria

研究代表者

西村 潤一 (Nishimura, Junichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20379209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌症例の非癌部腸管(正常部)を採取し、粘膜固有層内の単核球を分離した。Lin<sup>-</sup>(CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>)陰性HLA-DR陽性細胞をCD103とCD14で展開し、CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞(CD103<sup>+</sup>細胞)に着目し機能を解析した。正常部腸管に存在するCD103<sup>+</sup>細胞はCD103<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>細胞に比較して制御性T細胞の誘導能が有意に高かった。一方、潰瘍性大腸炎の炎症部腸管に存在するCD103<sup>+</sup>細胞は、正常腸管のCD103<sup>+</sup>細胞に比較して炎症性サイトカインの発現が高く、制御性T細胞は誘導しないが炎症を惹起するTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞の誘導能が有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：Normal intestinal mucosa was obtained from intact sites of colorectal cancer patients. Non-inflamed and inflamed colonic tissues were obtained from surgically resected specimens of UC patients. Among Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>high</sup> intestinal lamina propria cells, CD103<sup>+</sup> cells were sorted and analyzed. CD103<sup>+</sup> cells in the normal colon showed lower expression of pro-inflammatory cytokines than CD103<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> cells. Co-culture with naive T cells revealed that CD103<sup>+</sup> DCs generated Treg cells. CD103<sup>+</sup> DCs from UC patients did not generate Treg cells, but they induced Th1/Th2/Th17 cells and showed higher expression of IL6, IL23A, IL12p35, and TNF. These findings show how human CD103<sup>+</sup> DCs could contribute to the pathogenesis of UC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヒト腸管粘膜固有細胞 CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞 炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎

## 1. 研究開始当初の背景

(1) クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患 (IBD) は原因不明の炎症性疾患であり厚生労働省に特定疾患に指定されている。また、この 20 年で両疾患共に約 10 倍に患者数が増加しており悪性新生物と違い若年から発症し、クローン病にいたっては根治が得られることはなく病期期間が非常に長いことが特徴である。この両疾患は遺伝的素因や環境因子によって惹起された免疫の異常な活性化によって起こるものとされており腸管免疫からの IBD 発症の原因検索、治療法の開発は急務となっている。

(2) IBD の病態を把握するためにマウスにおいて様々な解析がなされてきた。抗炎症性作用のある IL-10 を欠損したマウスはびまん性腸炎を自然発症することが知られている。また、TLR のアダプター分子である MyD88 を欠損させたマウスはマクロファージからの IL-10 分泌能が低下し、腸炎を発症することが知られている。また、IL-10 依存的シグナル伝達関連分子である転写因子 Stat3 を自然免疫細胞特異的に欠損させたマウス (LysM/Stat3<sup>fllox/-</sup>) においては、IL-10 シグナルが入らないため自然免疫細胞の異常な活性化に伴う過剰な Th1/Th17 応答により腸炎を発症する。また、これらのマウスを腸内細菌のいない無菌状態にすると腸炎を発症しないことが知られている。これらの報告から腸内細菌認識により活性化された TLR シグナルを介して誘導される大腸マクロファージからの IL-10 産生が腸炎発症を抑制する抗炎症応答に深く関与することが示唆される。近年では腸管粘膜固有層に存在する樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫担当細胞の単離、機能解析が行われてきた。マウス腸管組織に存在する自然免疫担当細胞は CD103<sup>+</sup>細胞と CX3CR1<sup>+</sup>細胞に大別される。CD103<sup>+</sup>細胞は pre-cDC (c DC precursor) を起源とし、Treg を分化させることで免疫抑制の働きをする CD103<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞と Th17 細胞の分化誘導にもかかわる CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞が同定されている。CX3CR1<sup>+</sup>細胞は ATP 依存的に Th17 細胞を誘導する CX3CR1<sup>int</sup>CD70<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞

(Atarashi, Nishimura, Nature 2008) や T 細胞の増殖を抑制する CX3CR1<sup>high</sup> 制御性ミエロイド細胞などが同定されている。このように、マウスの解析ではマウス個体の免疫異常による炎症性腸疾患の再現からマウス腸管における種々の細胞の機能解析が行われるようになり、近年では腸内細菌に対する免疫応答からの解析なども進んでいる。

(3) マウスを用いた腸管免疫系の解析によりマクロファージ・CD103<sup>+</sup>樹状細胞・CX3CR1<sup>int</sup>CD70<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>樹状細胞・CX3CR1<sup>high</sup>Mreg 細胞をはじめとする多様

な自然免疫細胞サブセットが異なる分子機構により獲得免疫系を制御することで腸管炎症の発症を抑制することが明らかとなる一方、ヒト腸管組織においてマウスと同様の腸管免疫制御機構が機能しているかについては不明な点が多かった。しかし、近年、ヒト腸管免疫系の解析が進み、マウスで同定された自然免疫細胞サブセットに相当する細胞がヒト腸管組織に存在すること、さらにその機能と IBD 発症の関係が明らかになりつつある。また、腸管 CD14<sup>+</sup>マクロファージはクローン病患者で増加し、Th1 応答を惹起することが報告されている (Kamada, J Clin Invest, 2008)。またヒト腸管の CD103<sup>+</sup>CD141-SIRP<sup>high</sup> 樹状細胞はマウスにおける CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞と同等の機能を持つことが明らかとなっている

(Schlitzer, Immunity, 2013)。このように徐々にヒト腸管のサブセット解析が進んでいるが依然として発展途上である。

(4) これらの背景を踏まえ、ヒト腸管から自然免疫担当細胞を単離し、解析することを行っている。手法は以前解析を行ったマウス腸管からの細胞分離方法を応用することで確立した。腸管粘膜固有層に存在する CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup>細胞は IL-6、IL-23p19、TNF- $\alpha$ 、IL-1 を高産生し、ヒト Th17 細胞を分化誘導することを報告した (Ogino, Gastroenterology, 2013, corresponding Author Nishimura)。この細胞集団はクローン病腸管ではさらに IL-6、IL-23p19、TNF- $\alpha$  の産生が上昇しており、IBD の発症/病態に深くかかわる可能性があり現在解析を進めている。また、現在 CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞中に IFN- $\gamma$  を高産生する細胞を同定している。このようにヒト腸管から細胞を単離する手法を実施でき、単離された細胞の機能的解析やマウスより同定された細胞との比較ができる施設は非常にまれである。

## 2. 研究の目的

ヒト腸管に存在する CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞集団を細分化し、各々の細胞の T 細胞誘導能や炎症惹起作用などの機能解析を行い、炎症性腸疾患の炎症をコントロールする細胞を同定すること

## 3. 研究の方法

### (1) 自然免疫担当細胞の同定と機能解析

大腸癌症例非癌部における CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の細分化

(対象) 当科において大腸癌にて待機的切除術を施行する 20 歳以上の症例を対象症例とする。切除腸管の断端に近い非癌部分を採取する。右半結腸切除の症例では回腸も採取する。

(方法) 20mMEDTA により上皮細胞を除去後、筋層を剥離して切除、その後コラゲナーゼ、ディスペーゼを使用することで細胞を単離

する。Percoll を用いた濃度勾配法により単核球を回収し、FACS を用いて Lineage (CD19, CD20, CD56 等) によりリンパ球を除去する。腸管には HLA-DR 強陽性の抗原提示作用を持つ細胞集団が存在することがわかっており、CD14、CD11c を用いることで CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> 細胞を sort する。May-Giemsa 染色により細胞形態を確認する。

CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の表面マーカーによる細分化およびサイトカイン発現解析

(方法) CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞を表面マーカー (CD103) を用いて、各々の細胞集団を FACS sort し、mRNA を抽出する。cDNA ライブラリを作成して各種サイトカイン発現を比較解析する。また、sort した細胞を培養することで培養液中の分泌タンパク量を ELISA を用いて解析する。ヒト腸管免疫担当細胞は個人により発現状況が違ふ可能性があるため約 10 例で統計学的な解析を行う。

細分化された CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の T 細胞分化誘導能の解析

(方法) 各々の細胞集団を FACS sort し、ヒト血液から FACS により精製したナイーブ T 細胞と 1:5 の割合で 5 日間共培養する。培養後の T 細胞を Foxp3 による細胞内染色を用いて Treg 細胞誘導能を評価する。また、培養液中の IL-17、IFN- $\gamma$  量を ELISA にて解析する。培養された T 細胞は mRNA を精製し、cDNA を作成してサイトカイン発現を解析する。ヒト腸管免疫担当細胞は個人により発現状況が違ふ可能性があるため約 10 例で統計学的な解析を行う。

## (2) IBD 症例における自然免疫担当細胞の役割

IBD 症例における細分化された CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の採取

(対象) 当院で腸管切除術を受ける 20 歳以上の IBD 症例 (クローン病、潰瘍性大腸炎) の切除検体を用いる。炎症、線維化の激しい部位と切除断端付近の炎症が認められない部位を解析の対象とする。また、比較対照のために大腸癌症例非癌部も引き続き対象とする。

(方法) 正常腸管と同様の方法で炎症部腸管と非炎症部腸管から粘膜固有層細胞を採取する。

IBD 症例におけるサイトカイン発現解析と比較

(方法) 採取部位別に腸管粘膜固有層より細胞を単離し、FACS sort により細分化された CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞を分離する。単培養した後の培養液を ELISA によりサイトカイン解析を行う。単離した細胞の cDNA ライブラリを作成し、サイトカイン発現、転写因子などの発現を解析する。同一症例での炎症部、非炎

症部を比較することで機能解析を行う。

IBD 症例における細分化された CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の T 細胞分化誘導能の解析 (方法) ナーブ T 細胞と共培養することにより T 細胞分化を誘導する。T 細胞の分泌サイトカインを ELISA で解析する。cDNA を作成しサイトカイン発現を解析する。また、IBD 症例非炎症部と大腸癌非癌部との比較、IBD 症例の炎症部と非炎症部の比較により細分化された CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の IBD の炎症に対する関与を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 大腸癌症例の非癌部腸管 (正常部) を採取し、粘膜固有層内の単核球を分離し FACS により細分化した。Lin(CD3, CD19, CD20, CD56) 陰性 HLA-DR 陽性細胞を CD103 と CD14 で展開し、CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞に着目し CD14<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>細胞と比較しながら、機能を解析した。CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞は May-Giemsa 染色により樹状突起をもつ樹状細胞、CD14<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>細胞は貪食能をもつマクロファージであることを確認した。CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞は、CD14<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>細胞と比較して BATF3, IRF8, IRF4 の転写因子が高発現であることを確認した。炎症性サイトカイン (IL-6, IL-23, TNF- $\alpha$ ) の発現は、CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞では有意に低かったが、抗炎症性サイトカイン (IL-10, TGF- $\beta$ ) の発現は同程度認められた。また、CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞は、Treg 細胞を誘導した。

(2) 潰瘍性大腸炎の非炎症部腸管と炎症部腸管から粘膜固有層内の単核球を分離し FACS により細分化した。正常部腸管から採取した CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞と潰瘍性大腸炎の非炎症部腸管と炎症部腸管から採取した CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞を比較した。炎症性サイトカイン (IL-6, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ ) の発現は、正常部に比較して、潰瘍性大腸炎の非炎症部、炎症部では上昇していた。抗炎症性サイトカイン (IL-10, TGF- $\beta$ ) の発現は同程度認められた。潰瘍性大腸炎の非炎症部腸管と炎症部腸管から採取した CD103<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞は、正常腸管に比較して、Treg 細胞は誘導しないが、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞を有意に誘導した。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

発表者名: 西村潤一、水島恒和、香山尚子、竹田潔

演題名: CD103+ cells in Intestinal Lamina Propria of Patients with Ulcerative Colitis

学会名: 日本免疫学会

発表年月日：2016/12/5  
場所：沖縄コンベンションセンター（沖縄  
県・宜野湾市）  
〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西村 潤一 (Nishimura Junichi)  
大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20379209

##### (2) 研究分担者

香山 尚子 (Kayama Hisako)  
大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40548814

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )