

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861068

研究課題名(和文) ヒト腸管粘膜固有層におけるCD14-CD11c-細胞の機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of CD14-CD11c- cells in human intestinal lamina propria

研究代表者

大澤 日出樹(Osawa, Hideki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10724263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト正常腸管においてCD14-CD11c-細胞はCD141high細胞とCD141low細胞の2集団に細分化された。臨床検体10症例よりCD141high細胞とCD141low細胞を抽出しマイクロアレイ解析を行ったところ、これらの細胞集団は骨髄由来細胞とは異なる可能性が示唆される結果であった。さらに表面マーカーの解析により、CD141high細胞はCD34陽性CD31陽性CD45陰性であり血管内皮細胞と考えられた。一方、CD141low細胞はCD45陽性の骨髄由来細胞と大部分のCD45陰性の非骨髄由来細胞の2集団で構成されていた。

研究成果の概要(英文)：CD14-CD11c- cells in normal human intestine have been subdivided into two populations. Some expressed CD141 high and the others expressed CD141 low. qRT-PCR and ELISA showed CD141high cells were supposed to extract IL6 and these cells were involved with inflammatory. On the other hand, CD141low cells were supposed to induce IL6 and IFN . Microarray analysis was performed against these subsets extracted from 10 patients. The result showed that the CD141high cells and CD141low cells were implied not to be derived from bone marrow. Further, the analysis of surface markers showed CD141high cells were considered to be vascular endothelial cells because they were CD34-positive CD31-positive CD45-negative. On the other hand, CD141low cells were composed of two populations of non-bone marrow-derived cells which were CD45-negative and bone marrow-derived cells which were CD45-positive.

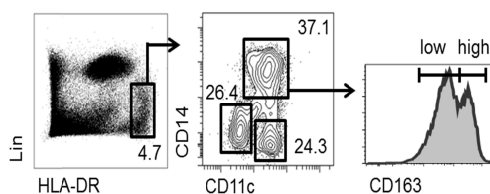
研究分野：消化器外科

キーワード：ヒト腸管粘膜固有層 樹状細胞 CD141

1. 研究開始当初の背景

腸管組織における常在細菌・食餌抗原・病原体などの環境因子に対する免疫寛容と免疫応答のバランス保持が生体の恒常性維持に重要であることが明らかとなっている。腸内常在細菌に対する免疫系の異常な活性化はクローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患 (IBD) の発症に深く関与することが報告されている。近年、自然免疫制御の破綻が獲得免疫系の異常を誘発することで IBD の病態形成に深く関与することがマウスおよびヒト腸管免疫系の解析から明らかとなりつつある。腸管組織には起源や機能の異なる多様な自然免疫細胞が局在しており、様々なパターン認識受容体により腸内常在細菌を認識し、多様なシグナル伝達経路を介して活性化が制御されることで腸管におけるエフェクターT細胞および制御性T細胞の分化に重要な役割を果たすと考えられている。近年ヒト腸管粘膜固有層に局在する HLA-DR^{high}Lin⁻細胞には CD14⁻CD11c^{low}、CD14⁻CD11c^{high}、CD14⁺CD163^{low}、CD14⁺CD163^{high} で特徴づけられる4つの自然免疫細胞サブセットが存在することが報告された(図1)。これらサブセットの機能解析により IBD の病態解明が進むと考えられる。

図1：ヒト腸管粘膜固有層の免疫担当細胞



2. 研究の目的

本研究では CD14⁻CD11c^{low} 細胞の機能解析をさらに進め、炎症性腸疾患の病態を解明することを目的とする。

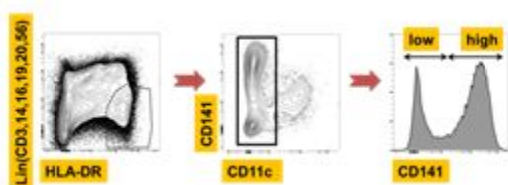
3. 研究の方法

20歳以上の腸管切除を行う(大腸癌、良性腫瘍など、IBD 合併症例は除く)症例において当院で待機手術を予定している症例を対象とし、ヒト腸管粘膜固有層における免疫担当細胞を酵素処理及びフローサイトメトリーを用いて単離する。非炎症性腸疾患の腸管における CD14⁻CD11c^{low} 細胞は CD141 の高発現群と低発現群に細分化されることが分かっているためこの2集団において、qRT-PCR や、TLR リガンドと共培養したのちの ELISA により炎症に関連するサイトカインの産生を解析する。ナイーブ T 細胞と共培養し、T 細胞分化誘導能を評価する。次に 20 歳以上の腸管切除を行う IBD 症例の切除標本を対象とし、凍結切片を用いて免疫染色により各サブセットの局在を解析する。腸管切除を施行した IBD 症例の切除検体から腸管粘膜の細胞を単離し、FACS sort により CD14⁻CD11c^{low}CD141^{high}、CD14⁻CD11c^{low}CD141^{low} 細胞を分離する。回収した細胞集団から cDNA ライブラリを作成し、RT-PCR/Real-Time PCR を用いてサイトカインや TLR の発現を解析する。TLR リガンドと各サブセットを共培養し、産生するサイトカインを ELISA を用いて評価する。同一症例での炎症部位と非炎症部位を比較する。さらに、回収した細胞集団を CD3⁺T 細胞と共培養し、CD4⁺T 細胞および CD8⁺細胞の増殖能を評価する。また、ナイーブ T 細胞との共培養により Th1、Th17 細胞誘導能を評価する。培養された T 細胞の cDNA を作成してサイトカイン発現を解析する。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 CD14⁻CD11c^{low}CD141^{high} および CD14⁻CD11c^{low}CD141^{low} 細胞の IBD の炎症に対する関与を解析する。

4. 研究成果

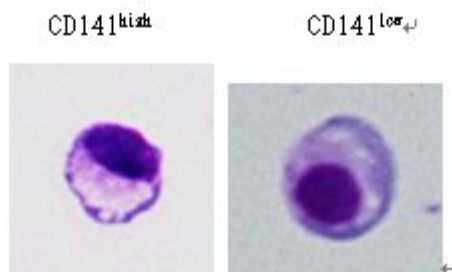
非炎症性腸疾患における CD14⁺CD11c^{low} 細胞の細分化：ヒト大腸正常部の腸管粘膜固有層を採取し、FACS にて Lineage marker (CD3, CD19, CD20, CD56) 陰性 HLA-DR 陽性 CD14 陰性 CD11c 陰性の細胞サブセットは CD141 によって CD141^{high} 細胞と CD141^{low} 細胞に 2 分されることが分かった (図 2)。

図 2. CD14-CD11c^{low} 細胞は CD141 によって CD141^{high} 細胞と CD141^{low} 細胞に分けられた



さらにこれらの細胞を sorting し May-Giemsa 染色をしたところ円形で N/C 比がリンパ球に比し小さい細胞であった (図 3)。

図 3 各細胞の May-Giemsa 染色



また、sorting した細胞の cDNA ライブラリを作成した。各サブセットのサイトカインおよび TLR の発現解析：各サブセットの cDNA を PCR によりサイトカイン及び TLR の発現を解析した。比較対象として樹状細胞と考えられる CD14-CD11c^{high} (11c) を用いた。CD11c⁺CD141^{high} 細胞は IL6, IL12p40, IFN の発現が比較的高く、CD141^{low} 細胞は IL6, IL12p40, IFN, IL23, TGF のいずれのサイトカインの発現も低値であった (図 4)。

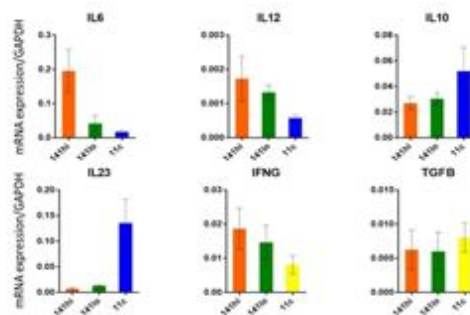
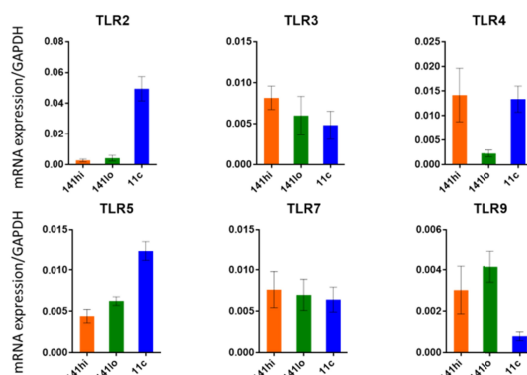


図 4: 各サブセットの mRNA レベルでのサイトカイン発現

TLR の発現解析に関しては TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 に関して解析した。CD141^{high} 細胞は TLR4 の発現が高く CD141^{low} 細胞は TLR9 の発現が高かった (図 5)。

図 5: 各サブセットの mRNA レベルでの TLR リ



ガンドの発現

次に臨床検体 10 症例より CD141^{high} 細胞と CD141^{low} 細胞を抽出しマイクロアレイ解析を行った。今までに報告されたマイクロアレイデータと比較して CD141^{high} 細胞および CD141^{low} 細胞のデータを検討したところ、これらの細胞集団は骨髄由来細胞とは異なる可能性が示唆される結果であった。さらに表面マーカーの解析により、CD141^{high} 細胞は CD34 陽性 CD31 陽性 CD45 陰性であり血管内皮細胞と考えられた。一方、CD141^{low} 細胞は CD45 陽性の骨髄由来細胞と大部分の CD45 陰性の非骨髄由来細胞の 2 集団で構成されていた

(図 6)。

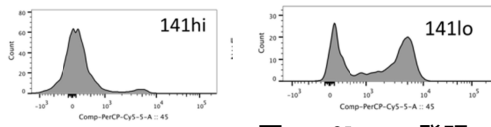
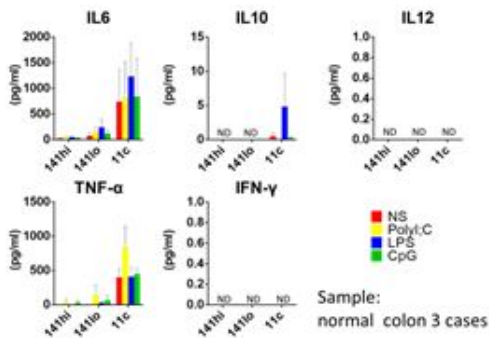


図 6 : CD45 の発現

また、TLR リガンド刺激下におけるサイトカイン産生を ELISA で評価したところ、微量ではあるものの CD141^{high} 細胞は LPS, PolyI:C 刺激により IL6 の産生を認めたが、CD11c 陽性細胞、CD14 陽性細胞に比し非常に低値であった。血管内皮細胞が IL6 を産生することは広く知られており、表面マーカーによる解析結果である CD141^{high} 細胞が血管内皮細胞であることを支持する結果であった。一方で CD141^{low} 細胞では IL6 と TNF の産生を認めた。比較対象として樹状細胞と考えられる CD14-CD11c^{high} (11c) を用いた。

(図 7)

図 7 : 各サブセットに対する TLR リガンド刺激によるサイトカイン産生能



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)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大澤日出樹 (OSAWA, Hideki)

大阪大学医学部付属病院・医員

研究者番号 : 10724263