

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成 22 年度採択研究代表者

H25 年度 実績報告

清野 宏

東京大学医科学研究所
教授

炎症性腸疾患の慢性化制御機構の解明と治療戦略の基盤構築

§ 1. 研究実施体制

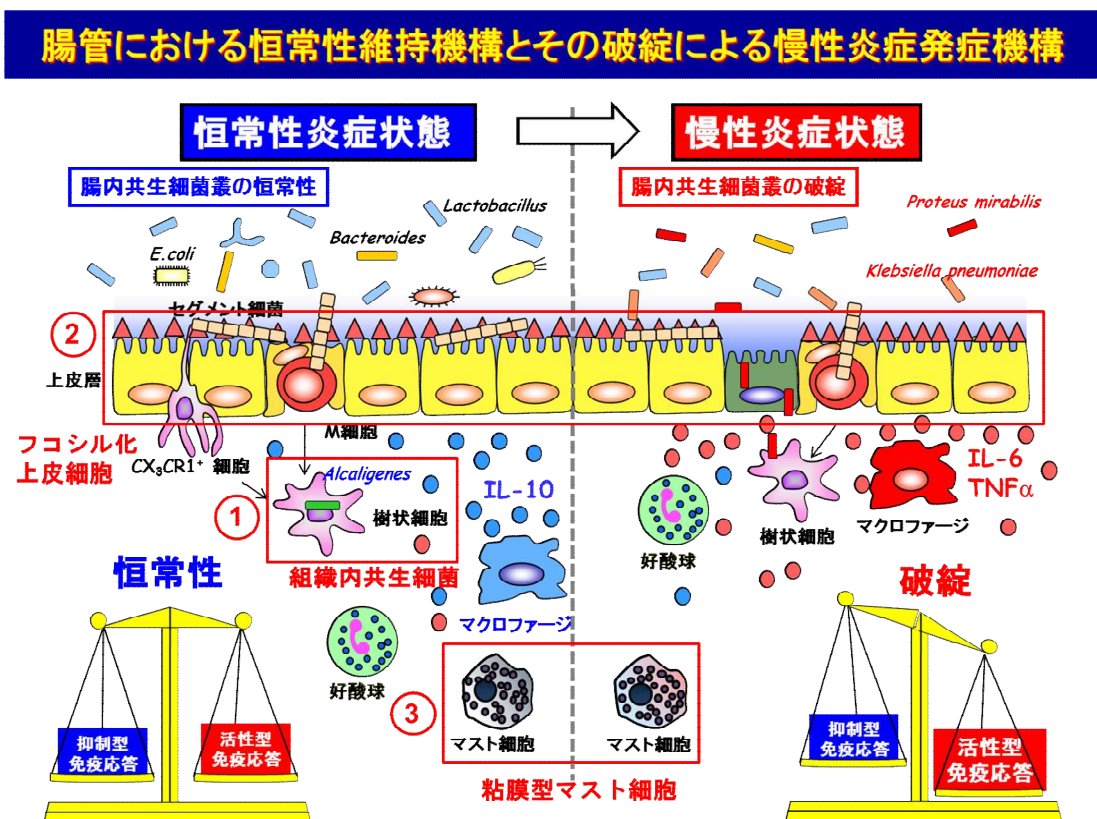
(1) 「清野」グループ

- ① 研究代表者: 清野 宏 (東京大学医科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・炎症性腸疾患の慢性化制御機構の解明と治療戦略の基盤構築

(2) 「高橋」グループ

- ① 研究代表者: 高橋 一郎 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院、教授)
- ② 研究項目
 - 粘膜恒常性炎症の構築・維持における大腸常在マクロファージ共生細菌とその発現産物の役割

§ 2. 研究実施の概要



(1) 「清野」グループ

1. *Alcaligenes* を中心とするパイエル板内共生細菌による慢性炎症制御機構の解明

昨年度までに、パイエル板内での *Alcaligenes* の封じ込めに自然リンパ球から産生される IL-22 や抗菌ペプチドが関与すること、また、その封じ込めの破綻により全身性の炎症反応が誘起されることを明らかにした。本年度は炎症性腸疾患の一種であるクローン病患者において、血清中の *Alcaligenes* 特異的 IgG 抗体価が増加傾向にあることを明らかにした。また、*Alcaligenes* 由来の菌体成分は炎症を惹起する能力が低いことや、培養条件により *Alcaligenes* の形態が変化することを示唆する結果を得た。このことから、*Alcaligenes* の環境による形態変化や菌体成分の構造変化が全身性の炎症反応の誘起に関与している可能性が考えられた。

2. 腸管上皮細胞フコース発現機構を基盤とする新規慢性炎症マーカーの開発

昨年度までに、腸管粘膜固有層に存在する CD90 陽性 ROR γ t 陽性の自然リンパ球が腸管上皮細胞のフコシル化を誘導する事を見出しており、本年度はその分子機構に着目して研究を進めた。自然リンパ球は IL22 を産生し、腸管上皮細胞の恒常性ならびに抗菌ペプチド産生などの機能維持に寄与している。そこで IL22 欠損マウスを用いて小腸におけるフコシル化上皮細胞を解析したところ、その数が減少していた。一方、自然リンパ球は LT α を産

生する事で二次リンパ組織の構築、維持に寄与する事が知られている。LT α 欠損マウスを解析したところ、フコシル化上皮細胞がほぼ消失する事を見出した。以上の結果から、自然リンパ球は IL22 と LT α を産生する事でフコシル化上皮細胞誘導に寄与している事が明らかとなった。

3. 腸管マスト細胞制御による新規慢性炎症性腸疾患治療法開発

本年度は、マスト細胞における P2X7 受容体の発現調節機構の解析を中心に行った。2012年に炎症性腸疾患の増悪化を導くマスト細胞の P2X7 受容体が腸管に存在する肥満細胞では高レベルであることを報告している (Kurashima Y. et al., Nat. Commun., 2012) が、今回皮膚のマスト細胞の特性として P2X7 受容体の発現が低レベルであることが明らかとなった。P2X7 受容体を発現するマスト細胞を、皮内に移植すると数日で P2X7 受容体のレベルが低下することが示された。これは皮膚の線維芽細胞のもつ Cyp26b1 と呼ばれるビタミン A (レチノイン酸) を代謝する酵素により調節されているものであることが明らかとなった。この作用が働くなる状況もしくは過剰なレチノイン酸が皮膚中に存在してしまう状況では、マスト細胞の過度な活性化が導かれ皮膚炎が起こることが明らかとなった。本研究成果は、マスト細胞の組織特性のかく乱が、体の様々な部位で起こる慢性的な炎症やアレルギーの発症につながっている可能性を新たに示したものである (Kurashima Y. et al., Immunity, in press)。

(2) 高橋グループ

本年度は大腸粘膜恒常性炎症の起点と考えられる環境細菌 *Stenotrophomonas maltophilia* の大腸常在マクロファージ(M ϕ)への共生機構の解明を、昨年度確立した生細菌可視化検出系・M ϕ 分化培養系を利用して重点的に実施した。具体的には自然免疫応答遺伝子欠損マウス由来 M ϕ への smlt2713 保有/欠損 *S. maltophilia* 感染実験を試験管内で実施し、*S. maltophilia* の M ϕ における感染動態の定性・定量解析を行った。その結果、*S. maltophilia* の M ϕ 内共生成立に寄与する宿主側因子として MyD88 分子が必須であること、またインフラマソーム複合体を構成する caspase-1・NALP3 を欠損した M ϕ では、細胞内に巨大な *Stenotrophomonas* 集簇巣が形成されることから、caspase-1・NALP3 などのインフラマソーム構成分子は *S. maltophilia* の細胞内共生の維持に寄与する因子として重要であると考えられた。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報 (国際)

1. Kunisawa, J., Gohda, M., Hashimoto, E., Ishikawa, I., Higuchi, M., Suzuki, Y., Goto, Y., Panea, C., Ivanov, I.I., Sumiya, R., Lamichhane, A., Wake, T., Tajiri, S., Kurashima, Y., Shikata, S., Akira, S., Takeda, K., and Kiyono, H. 2013. Microbe-dependent CD11b⁺ IgA⁺ plasma cells mediate robust early-phase intestinal IgA responses in mice. *Nature Commun.* 4:1772. (doi: 10.1038/ncomms2718)
2. Sato, S., Kaneto, S., Shibata, N., Takahashi, Y., Okura, H., Yuki, Y., Kunisawa, J., and Kiyono, H. 2013. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* 6:838-846.(doi: 10.1038/mi.2012.122.)
3. Obata, T., Shibata, N., Goto, Y., Ishikawa, I., Sato, S., Kunisawa, J., and **Kiyono, H.** 2013. Critical role of dendritic cells in T cell retention in the interfollicular region of Peyer's patches. *J. Immunol.* 191:942-948.(doi: 10.4049/jimmunol.1200636.)
4. Kong, I-G., Sato, A., Yuki, Y., Nochi, T., Takahashi, H., Sawada, S., Mejima, M., Kurokawa, S., Okada, K., Sato, S., Briles, D.E., Kunisawa, J., Inoue, Y., Yamamoto, M., Akiyoshi, K., and Kiyono, H. 2013. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *pneumococcus*. *Infect. Immun.* 81:1625-1634. (doi: 10.1128/IAI.00240-13.)
5. Kusu, T., Kayama, H., Jeon, S-G., Ueda, Y., Kinoshita, M., Goto, Y., Okumura, R., Saiga, H., Nishimura, J., Atarashi, K., Honda, K., Kunisawa, J., Kiyono, H., Okumura, M., Yamamoto, M., and Takeda, K. 2013. ENTPDase7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *J. Immunol.* 190:774-783. (doi: 10.4049/jimmunol.1103067.)
6. Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Sekine, S., Aso, K., Kataoka, K., Davydova, J., Yamamoto, M., Gilbert, R.S., Tokuhara, Y., Fujihashi, K., Kunisawa, J., Yuki, Y., Kiyono, H., McGhee, J.R., and Fujihashi, K. 2013. Potential roles of CCR5⁺CCR6⁺ dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses. *PLoS One* 8:e60453.(doi: 10.1371/journal.pone.0060453.)
7. Onji, M., Kanno, A., Saitoh, S., Fukui, R., Motoi, Y., Shibata, T., Matsumoto, F., Lamichhane, A., Sato, S., Kiyono, H., Yamamoto, K., and Miyake, K. 2013. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nature Commun.* 4:1949. (doi: 10.1038/ncomms2949.)
8. Kurokawa, S., Nakamura, R., Mejima, M., Kozuka-Hata, H., Kuroda, M., Takeyama, N., Oyama, M., Satoh, S., Kiyono, H., Masumura, T., Teshima, R., and Yuki, Y. 2013. MucRice-cholera toxin B-subunit, a rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of α -amylase/trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens. *J. Proteome Res.* 12:3372-3382.(doi: 10.1021/pr4002146.)
9. Tokuhara, D., Alvarez, B., Mejima, M., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Kurokawa, S., Kuroda, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nochi, T., Sagara, H., Aladin, F., Marcotte, H., Frenken, L., Iturriza-Gómara, Kiyono, H., Hammarstöm, L., and Yuki, Y. 2013. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against

rotavirus infection. *J. Clin. Invest.* 123:3829-3838. (doi: 10.1172/JCI70266.)

10. Imai, T., Koyanagi, N., Ogawa, R., Suenaga, T., Sato, A., Kato, A., Kiyono, H., Arase, H., and Kawaguchi, Y., 2013. Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8⁺ T cells. *PLoS One* 8:e72050.(doi: 10.1371/journal.pone.0072050.)
11. Yuki, Y., Mejima, M., Kurokawa, S., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Katakai, Y., Kuroda, M., Takeyama, N., Kashima, K., Abe, M., Chen, Y., Nakanishi, U., Masumura, T., Takeuchi, T., Kozuka-Hata, H., Shibata, H., Oyama, M., Tanaka, K., and Kiyono, H. 2013. Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification. *Plant Biotechnol. J.* 11:799-8. (doi: 10.1111/pbi.12071.)
12. Kurokawa, S., Kuroda, M., Mejima, M., Nakamura, R., Takahashi, Y., Sagara, H., Takeyama, N., Satoh, S., Kiyono, H., Teshima, R., Masumura, T., and Yuki, Y. 2014. RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to a change in localization of overexpressed cholera toxin B-subunit and the allergen protein RAG2 in rice seeds. *Plant Cell Rep.* 33:75-87.(doi: 10.1007/s00299-013-1513-3.)
13. Kishino, S., Takeuchi, M., Park, SB., Hirata, A., Kitamura, N., Kunisawa, J., Kiyono, H., Iwamoto, R., Isobe, Y., Arita, M., Arai, H., Ueda, K., Shima, J., Takahashi, S., Yokozeki, K., Shimizu, S., and Ogawa, J. 2013. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110:17808-17813.(doi: 10.1073/pnas.1312937110.)
14. Korneychuk N, Ramiro-Puig E, Ettersperger J, Schulthess J, Montcuquet N, Kiyono H, Meresse B, Cerf-Bensussan N. 2013. Interleukin 15 and CD4⁺ T cells cooperate to promote small intestinal enteropathy in response to dietary antigen. *Gastroenterology.*146(4):1017-27.pii:S0016-5085(13)01807-6.(doi:10.1053/j.gastro.2013.12.023.)
15. Takemura, N., Kawasaki, T., Kunisawa, J., Sato, S., Aayam, L., Kobiyama, K., Aoshi, T., Ito, J., Mizuguchi, K., Karuppuchamy, T., Matsunaga, K., Miyake, S., Mori, N., Tsujimura, T., Satoh, T., Kumagai, Y., Kawai, T., Standley, D., Ishii, K., Kiyono, H., Akira, S., and Uematsu, S. 2014. Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nature Comm.* (in press).
16. Kurashima, Y., Amiya, T., Fujisawa, K., Shibata, N., Suzuki, Y., Kogure, Y., Hashimoto, E., Otsuka, A., Kabashima, K., Sato, S., Kubo, M., Akira, S., Miyake, K., Kunisawa, J., and Kiyono, H. 2014. Skin-barrier homeostasis through Cyp26b1-mediated inhibition of ATP-dependent mast cell activation by fibroblasts. *Immunity* (In press)