

竹田 潔

大阪大学大学院医学系研究科・教授

自然免疫系を標的とした腸管免疫疾患の制御技術の開発

§1. 研究実施体制

(1)「研究代表者(竹田)」グループ

① 研究代表者: 竹田潔 (大阪大学大学院医学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・腸管特異的な炎症を抑制する新規ミエロイド細胞の機能解析
- ・腸管特異的自然免疫細胞の活性制御機構解析
- ・腸管特異的自然免疫細胞の生体機能解析

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患であり、その病因・病態の解明、さらに治療法の確立が待ち望まれている。そこで、炎症性腸疾患の発症機序を、自然免疫系を標的にして解析し、さらにその活性制御機構を解析し、その病態の解明、さらに自然免疫系を標的とした新たな治療法の開発の基礎的基盤を提供することを目的とし、研究を進めている。

これまでに、腸管炎症の誘導に深く関与する Th17 細胞の分化誘導を、腸管に特有の CD70 陽性樹状細胞が腸内細菌由来のアデノシン3リン酸依存性に制御していることを明らかにしてきた。さらに、腸管に局在する CX3CR1^{high}CD11b⁺CD11c⁺細胞が、直接 T 細胞の増殖を抑制する機能を有していること、個体レベルで、免疫不全(SCID)マウスにナイーブ T 細胞を移入することにより発症する T 細胞依存性腸管炎症を、腸管局所での T 細胞増殖を抑制することにより制御していることを見出し、制御性ミエロイド(Mreg)細胞と名付けた。今年度、さらに Mreg 細胞が T 細胞増殖を抑制するメカニズムを解析した。Mreg 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると、IL-10 誘導性

の遺伝子が多数高発現していたため、IL-10 欠損マウスの Mreg 細胞の機能を解析した。IL-10 欠損マウス由来の Mreg 細胞は、T 細胞増殖抑制能が障害されていた。また IL-10 のシグナルに必須の Stat3 遺伝子自然免疫細胞特異的欠損マウス由来の Mreg 細胞も T 細胞増殖抑制能が障害されていた。さらに、免疫不全(Rag2 欠損)マウスにナイーブ T 細胞を移入することにより発症する T 細胞依存性腸管炎症を、Stat3 欠損 Mreg 細胞は抑制できなかった。以上の結果から、IL-10/Stat3 シグナルが Mreg 細胞の機能を制御していることが明らかになった。また、Mreg 細胞は、T 細胞と会合することにより増殖を抑制するが、そのメカニズムとして、第 1 段階で、高発現する ICAM-1, VCAM-1 の接着分子により樹状細胞より極めて優先的に T 細胞と会合すること、第 2 段階で、IL-10/Stat3 シグナルにより、MHC class II は高発現しているにも関わらず CD80/CD86 の発現が抑制された結果、副刺激分子を介したシグナルが伝達されず T 細胞が活性化されないことにより、T 細胞応答を抑えていることを明らかにした¹⁾。今後、ヒトでの Mreg 細胞を同定し、その機能を解析する予定である。また、Mreg 細胞の個体レベルでの機能を明らかにするため、Mreg 細胞を欠損するマウス、蛍光色素でマーキングするマウスを作成し、解析する。

近年、腸管に共生する腸内常在菌が、免疫系に多大な影響を及ぼしていることが明らかになっている。また、我々ヒトの健康に及ぼす腸内細菌がプロバイオティクス細菌として知られている。そこで、プロバイオティクス細菌である *Bifidobacterium breve* の作用機構を解析した。マウスに *B. breve* を経口投与し、3 か月後に腸管の T 細胞を解析すると、大腸において IL-10 を産生する CD4 陽性 T 細胞の数が約 2 倍に増加していた。IL-10 は制御性 T 細胞から大量に産生されるが、*B. breve* 投与により、Foxp3 陽性細胞からの IL-10 産生は増加しないが、Foxp3 陰性細胞からの IL-10 産生が増加していた。制御性 T 細胞には、Foxp3 陽性細胞以外に、Foxp3 陰性で IL-10 を産生する Tr1 細胞が存在している。Tr1 細胞は、cMaf, IL-21, Ahr を発現している。そこで、腸管樹状細胞を *B. breve* で刺激し、そこにナイーブ T 細胞を加えて 4 日間共培養し、T 細胞におけるこれら遺伝子の発現を解析した。その結果、*B. breve* で刺激した群で cMaf, IL-21, Ahr の発現が亢進していた。これらの結果から、*B. breve* が IL-10 を高産生する Tr1 細胞を誘導することが明らかになった。また、腸管樹状細胞の中で、CD103 陽性樹状細胞が、*B. breve* 依存性に Tr1 細胞を極めて強く誘導することが明らかになった。Tr1 細胞は、IL-10, IL-27 により分化誘導されることが知られている。そこで、これらサイトカインの関与をノックアウトマウスを用いて解析したところ、両サイトカインの腸管 CD103 陽性樹状細胞からの産生が重要であることが明らかになった。免疫不全マウスにナイーブ T 細胞を移入することにより発症する T 細胞腸管炎

症に及ぼす *B. breve* 依存性 Tr1 細胞誘導の影響を最後に解析した。*B. breve* を連日経口投与すると、腸管炎症が抑制された。しかし、移入するナイーブ T 細胞を IL-10 欠損マウス由来のものにすると、その効果が全く認められなかった。以上の結果から、*B. breve* は、腸管 CD103 陽性樹状細胞に作用し、IL-10, IL-27 を介し Tr1 細胞を誘導し、腸管炎症を制御することが明らかになった⁵⁾。今後、*B. breve* 由来の Tr1 細胞誘導成分を同定し、より効果的な腸管炎症制御法の確立を目指したい。また、腸内細菌に限らず、食餌成分でも腸管炎症制御に関わる因子の同定も行っていきたい。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kayama, H., Ueda, Y., Sawa, Y., Jeon, S. G., Ma, J. S., Okumura, R., Kubo, A., Ishii, M., Okazaki, T., Murakami, M., Yamamoto, M., Yagita, H. and Takeda, K.: Intestinal CX₃C chemokine receptor 1^{high} (CX₃CR1^{high}) myeloid cells prevent T cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 5010-5015 (2012).(DOI: 10.1073/pnas.1114931109)
2. Takata, K., Kinoshita, M., Okuno, T., Moriya, M., Kohda, T. Honorat. J.A., Sugimoto, T., Kumanogoh, A., Kayama, H., Takeda, K., Sakoda, S. and Nakatsuji, Y.: The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T Cells. *PLoS One* 6, e27644, (2011).(DOI: 10.1371/journal.pone.0027644)
3. Yamamoto, M., Ma, J. S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Okuyama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Farve, D. and Takeda, K.: ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.* 208, 1533-1546 (2011).(DOI: 10.1084/jem.20101660)
4. Iwata-Kajihara, T., Sumimoto, H., Kawamura, N., Ueda, R., Takahashi, T., Mizuguchi, H., Miyagishi, M., Takeda, K. and Kawakami, Y.: Enhanced cancer immunotherapy using STAT3-depleted dendritic cells with high Th1-inducing ability and resistance to cancer cell-derived inhibitory factors. *J. Immunol.* 187, 27-36 (2011).(DOI: 10.4049/jimmunol.1002067)
5. Jeon, S. G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N. M., Kiyono, H., Ma, J. S., Kusu, T., Okumura, R., Hara, H., Yoshida, H., Yamamoto, M., Nomoto, K. and Takeda, K.: Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathogens* (in press)