

「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

H24 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

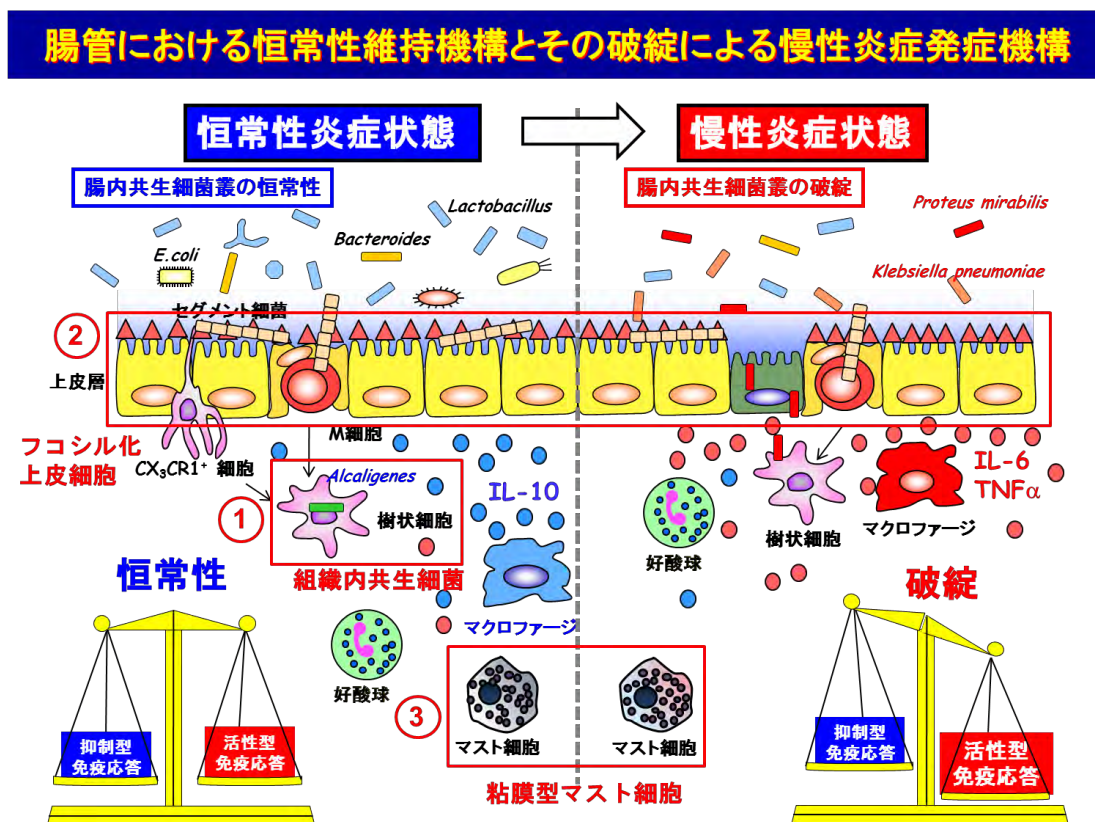
- ① 研究代表者: 清野 宏 (東京大学医科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・炎症性腸疾患の慢性化制御機構の解明と治療戦略の基盤構築

(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. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)



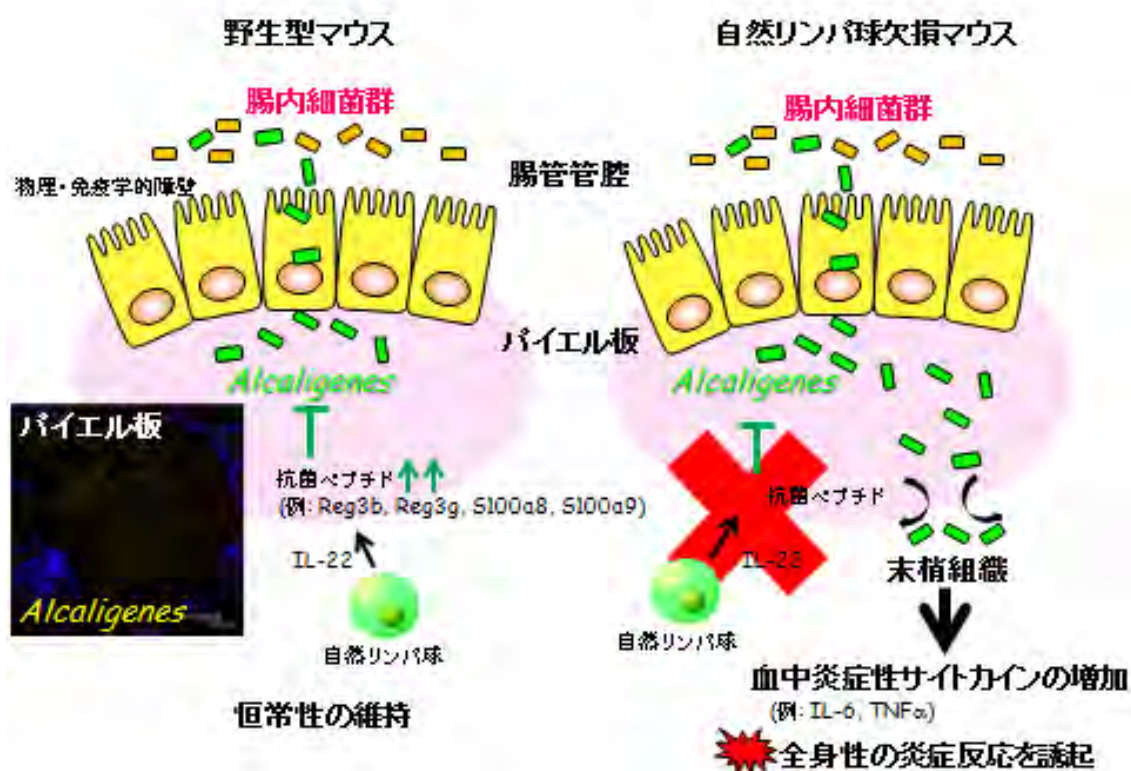
(1)「清野」グループ

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

平成 24 年度はペンシルバニア大学の David Artis 先生との共同研究により、腸管での生体防御や炎症、組織修復において重要な役割を担うことが報告されているインターロイキン-22 (IL-22) を産生する自然リンパ球が、腸管関連リンパ組織であるパイエル板の組織内に共生する *Alcaligenes* の解剖・免疫学的な隔離に関与することや、自然リンパ球の消失に伴う *Alcaligenes* の全身組織への拡散は各種炎症反応を惹起すること、またヒトにおいても *Alcaligenes* の全身組織への拡散と肝炎や炎症性腸疾患との関連を明らかにした。すなわち、自然リンパ球を消失させたマウスにおける共生細菌の局在性を解析した結果、通常マウスの末梢組織が無菌状態であるのに対し、自然リンパ球を消失させたマウスにおいては脾臓及び肝臓から培養可能な菌が検出された。その細菌種を同定した結果、腸管関連リンパ組織内に共生する *Alcaligenes* であることが判明し、これらが全身性の炎症反応を惹起していることが示された。このような共生細菌の末梢組織への拡散やそれに伴う全身炎症は、自然リンパ球もしくは組み換え IL-22 をマウスに投与することで抑制されたことから、自然リンパ球が IL-22 の産生を介して、共生細菌の全身への拡散とそれに伴う炎症反応を抑制してい

ることが示唆された。一般に腸内細菌の末梢への拡散は、腸管上皮細胞間のタイトジャンクションが減弱し腸管の透過性が亢進することで、管腔内に局在する細菌が組織内に流入することが原因として考えられてきた。しかし自然リンパ球を消失させたマウスの腸管上皮細胞に透過性の異常は認められなかった。以上の結果から、自然リンパ球の消失による腸内細菌の拡散は、腸管の透過性亢進が原因ではなく、共生細菌の局在性維持機構が破綻したことにより、宿主の腸管関連リンパ組織内に共生していた *Alcaligenes* が末梢組織に拡散したと考えられる。さらに、共生細菌の末梢組織への拡散や全身における炎症反応はヒトの疾患においても認められることから、ヒトの疾患における *Alcaligenes* に対する免疫学的反応性について解析を行った結果、C 型肝炎ウイルスの感染患者と小児期クローン病患者において、*Alcaligenes* に対する全身免疫応答が惹起されていることが明らかとなった。

これらの結果より、IL-22 産生自然リンパ球による組織内共生細菌の隔離機構と炎症性疾患との関連が示唆され、今後、その制御メカニズムをより詳細に解明することで新たな炎症制御法の開発につながる知見が得られると期待される。

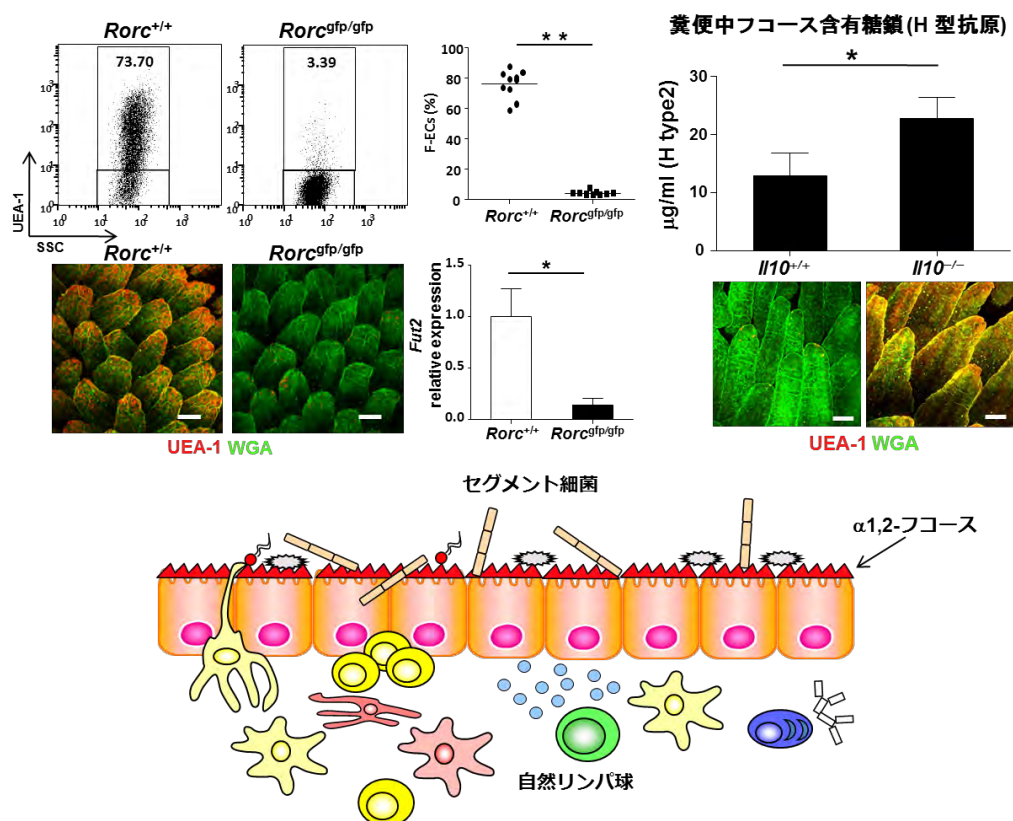


2. 腸管上皮細胞フコース発現機構を基盤とする新規慢性炎症マーカーの開発

粘膜上皮細胞に特異的に発現しているフコース転移酵素 (fucosyltransferase 2: FUT2) 遺伝子は、クローン病や I 型糖尿病などの慢性炎症型のヒト疾患関連遺伝子群の一つとして同定されている。これまでに腸管上皮細胞に発現している Fut2 は、腸内細菌の一種であるセグメント細菌によって誘導される事を明らかとした。また、メタゲノム解析により腸管上

皮細胞のフコースが欠損したマウスでは、腸内細菌叢を構成する主要な善玉菌である *Lactobacillus* が減少している事を見出した。このことから、腸内細菌の恒常性維持に腸管上皮細胞フコースが重要な役割を果たしている事が示唆される。さらに、マウス慢性炎症性腸疾患モデルである IL-10 欠損マウスではフコシル化上皮細胞が優位に上昇しており、腸管フコースが慢性炎症性腸疾患マーカーの一つである可能性を見出している。

腸管上皮細胞フコース発現機構と慢性炎症性腸疾患の新規診断法開発

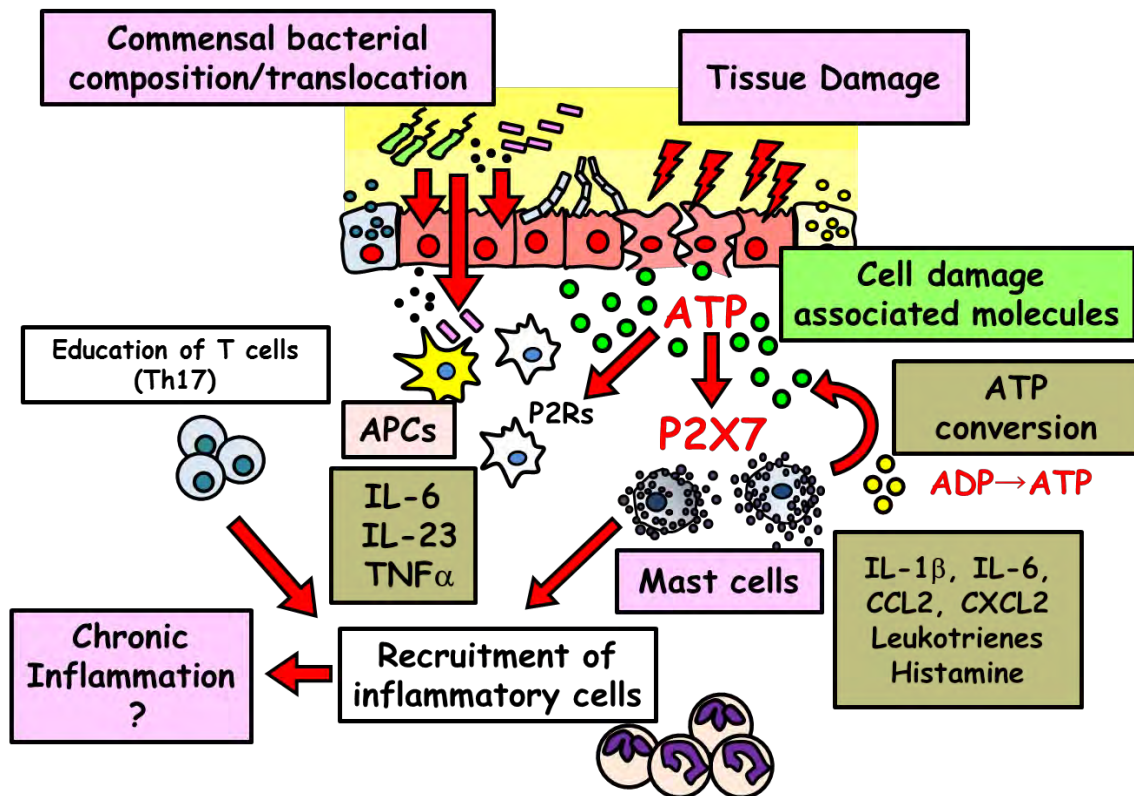


3. 腸管マスト細胞制御による新規慢性炎症性腸疾患治療法開発

1970年代に、炎症性腸疾患の患者の腸管組織では、免疫細胞の1つであるマスト細胞が活性化（脱顆粒）していることが報告されている。マスト細胞は、花粉症や食物アレルギーを引き起こす免疫反応の「悪玉」として働く一方で、感染症から生体を守る「善玉」として働くことが知られている。しかしながら、これまで炎症性腸疾患におけるマスト細胞の役割は不明であった。

本研究グループははじめに、マスト細胞を欠損させたマウスでは、炎症性腸疾患の症状が軽減していることを明らかにした。このことから、マスト細胞は炎症性腸疾患では「悪玉」として働くことが分かり、そこで、マスト細胞を活性化している因子の探索をしたところ、従来のアレルギー反応とは異なる、新たなマスト細胞の活性化様式が明らかとなった。そのメカニズムとは、細胞内ではエネルギーとして活用されているアデノシン三リン酸（ATP）が、傷害を受けた組織などから細胞外に放出された際に、マスト細胞の表面に

ある P2X7 受容体と結合することで、マスト細胞を活性化し、マスト細胞から IL-1 β 、IL-6、TNF α などのサイトカインや CCL2、CXCL2 などのケモカイン、ロイコトリエンといった炎症誘導因子を産生させることが明らかとなった。<Y Kurashima et al., Nat Commun 2012>
 本研究成果をもとに、今後は炎症性腸疾患の慢性化におけるマスト細胞の役割について、慢性腸炎マウスモデルの解析を中心に進めていく予定である。



(2) 「高橋」グループ

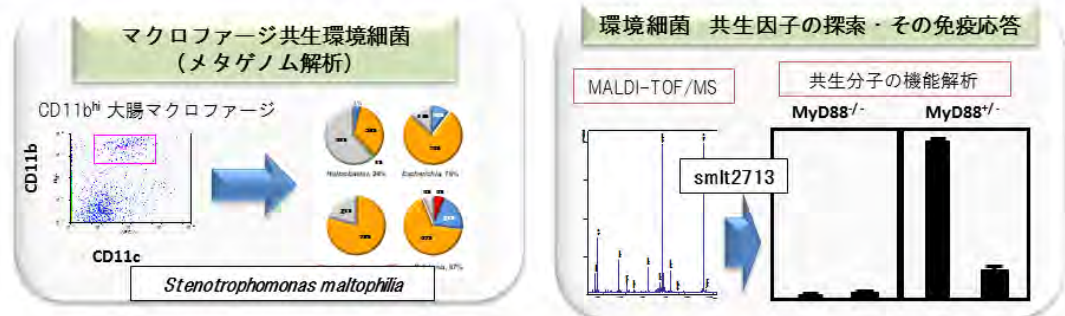
本研究グループは大腸常在マクロファージ内共生環境細菌 *Stenotrophomonas maltophilia* による粘膜常在マクロファージ (Mφ) を起点とした大腸粘膜恒常性炎症の構築維持誘導機構について明らかにすることを企図している。

本研究グループは本プロジェクトに分担研究者として参画する以前に、①メタゲノム解析の結果から腸管粘膜における免疫応答発動の端緒となる大腸粘膜常在 Mφ には、平素より特定の環境細菌 (特にプロテオバクテリア門の環境細菌種) が寡占的に共生していること、②これら環境細菌のうち *Stenotrophomonas maltophilia* 標準菌株を Mφ 細胞株 RAW264.7 に感染させると炎症制御性のサイトカイン IL-10 産生が亢進すること、③無菌マウスに同菌株を経口感染し、ノトビオートマウスを作製すると、大腸常在 Mφ における IL-10 の産生亢進のみならず Foxp3⁺制御性 T 細胞応答の亢進が観察されること、④*Stenotrophomonas maltophilia* を最少必須栄養培地において培養した上清濃縮画分においても、RAW264.7 ならびに骨髄由来 Mφ (BM-Mφ) において IL-10 産生亢進作用がみられること、⑤MALDI-TOF/MS 解析の結果、同培養上清に含まれる主要タンパク質は機能未知 smlt2713 遺伝子相同産物であることを明らかにしてきた。

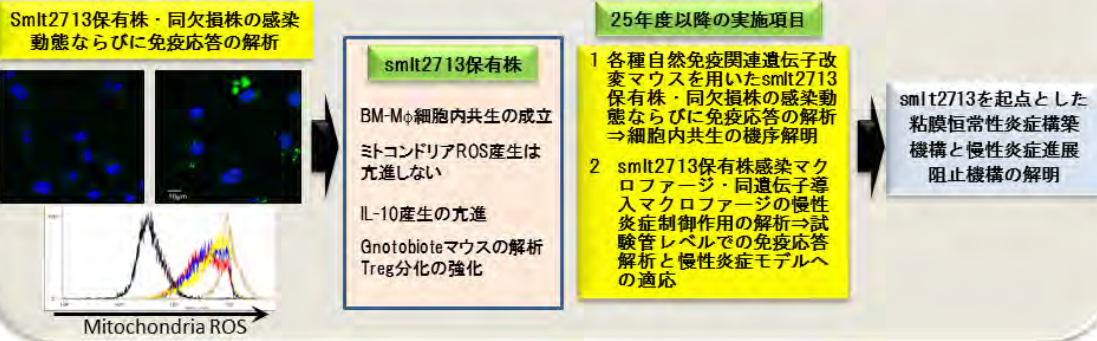
本プロジェクトに参画した初年の平成 24 年度では、大腸粘膜内共生細菌 *Stenotrophomonas maltophilia* が発現する上記 smlt2713 の恒常性炎症成立過程における生物学的意義解明に資するツール開発・樹立に取り組み、次の 5 項目の成果を得た。① *Stenotrophomonas maltophilia* smlt2713 欠損株(以下 smlt2713 欠損株)を樹立した。② *Stenotrophomonas maltophilia* smlt2713 保有株(以下 smlt2713 保有株)ならびに同欠損株を単独感染させたノトビオートマウスを確立した。③HaloTag リガンド(Promega)を利用した可視化 smlt2713 遺伝子の構築とマウス初代培養 BM-Mφ 株における発現系を確立した。④smlt2713 に対するモノクローナル抗体(mAb)を樹立し、同 mAb を精製した。⑤生きた細菌のみを特異的に検出する蛍光色素 CFDA(同仁化学)を使用して、smlt2713 保有株ならびに欠損株の初代 BM-Mφ における感染可視化を確立した。

平成 25 年度からは上記 5 項目のシーズをもとにして、①*Stenotrophomonas maltophilia* の大腸 Mφ 内部共生の分子機構を明らかにするとともに、②*Stenotrophomonas maltophilia* ならびに共生因子 smlt2713 を起点とした恒常性炎症の構築ならびに急性慢性炎症の制御機構の解明に取り組む(参照図)。

粘膜恒常性炎症成立における大腸マクロファージ共生細菌の役割



smlt2713は細胞内共生・恒常性炎症成立に寄与しているのか？



§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Kurashima, Y., Amiya, T., Nochi, T., Fujisawa, K., Haraguchi, T., Iba, H., Tsutsui, H., Sato, S., Nakajima, S., Iijima, H., Kunisawa, J., and Kiyono, H. 2012. "Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors", *Nat. Commun.* 3:1034, 2012. (doi: 10.1038/ncomms2023).
2. Sonnenberg, GF., Monticelli, LA., Alenghat, T., Fung, TC., Hutnick, NA., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, AM., Tardif, MR., Sathaliyawala, T., Kubota, M., Farber, DL., Collman, RG., Shaked, A., Fouser, LA., Weiner, DB., Tessier, PA., Friedman, JR., Kiyono, H., Bushman, FD., Chang, KM., and Artis, D. "Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria", *Science*, 336(6086):1321-1325, 2012. (doi: 10.1126/science.1222551).
3. Jeon, SG., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, NM., Kiyono, H., Ma, JS., 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 Pathog.* 8(5):e1002714, 2012. (doi: 10.1371/journal.ppat.1002714).
4. Kinoshita, M., Kayama, H., Kusu, T., Yamaguchi, T., Kunisawa, J., Kiyono, H., Sakaguchi, S., Takeda, K. "Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon", *J Immunol.* 189(6):2869-2878, 2012. (doi: 10.4049/jimmunol.1200420).
5. Sato, S., Kaneto, S., Shibata, N., Takahashi, Y., Okura, H., Yuki, Y., Kunisawa, J., Kiyono, H. "Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells", *Mucosal Immunol.*, 2012. Epub ahead of print. (doi: 10.1038/mi.2012.122).
6. Kusu, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Jeon, SG., Ueda, Y., Goto, Y., Okumura, R., Saiga, H., Kurakawa, T., Ikeda, K., Maeda, Y., Nishimura, J., Arima, Y., Atarashi, K., Honda, K., Murakami, M., Kunisawa, J., Kiyono, H., Okumura, M., Yamamoto, M., Takeda, K. "Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine", *J Immunol.* 190(2):774-783, 2013. (doi: 10.4049/jimmunol.1103067).

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)