

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：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
2. 研究開発課題名：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
3. 研究開発代表者：清野宏（東京大学医科学研究所 感染免疫学部門 炎症免疫学分野・東京大学医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター）
4. 研究開発の成果

本研究課題では、「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」を目指し、慢性炎症時での「腸内共生細菌、上皮細胞、腸管自然免疫系細胞」の三者間相互作用における時空間的制御機構を分子・細胞・個体レベルで明らかにすることを目的とし、①リンパ組織・細胞内共生細菌、②上皮細胞フコシル化、③炎症性マスト細胞の三点を中心に解析を進めている。

「清野班(東京大学)」

#### 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

これまでにクローン病患者においてパイエル板の *Alcaligenes* の減少と血清中 *Alcaligenes* 特異的 IgG 抗体価の増加が認められることを見出し、このデータを起点とし、パイエル板内での *Alcaligenes* の封じ込めに自然リンパ球が関与すること、その封じ込め機構の破綻に伴う *Alcaligenes* の全身拡散が炎症反応を誘起しうることを明らかにしている。本年度は、Weill Cornell Medical College の Dr. Gregory F. Sonnenberg らとの共同研究を通じて、*Alcaligenes* をはじめとしたリンパ組織内共生細菌が樹状細胞内に生息しており、IL-23 や IL-10 などのサイトカイン産生を樹状細胞に誘導していることを明らかにした (Fung TC et al., *Immunity*. 2016)。IL-23 による Th17 細胞の誘導と免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生によって、他の細菌の排除や炎症の反応の抑制を介して組織内共生細菌の生息ニッチを形成していることが明らかとなり、組織内共生細菌による新たな粘膜免疫制御機構が導き出された。

#### 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

これまでに、腸管上皮細胞の Fut2 発現およびフコシル化の誘導には共生細菌、特にセグメント細菌からの刺激と、IL-22 および LT $\alpha$  を産生する自然リンパ球が必要である事を明らかにしている。(Goto et al., *Science*, 2014)。本年度は、フコシル化における獲得免疫細胞の役割について解析を行った。その結果、TCR $\beta$  細胞を欠損するマウスでは TCR  $\delta$  鎖欠損マウスに比較して、腸管におけるフコシル化上皮細胞の顕著な増加が認められ、なかでも、Tr1 や制御性 T 細胞などの免疫抑制能を保持する CD4 陽性 T 細胞の関与について IL-10 欠損マウスを用いた解析を行った結果、IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞が、フコシル化の抑制に働いていることが明らかとなった。本研究から、上皮フコシル化においては、自然免疫系細胞 (ILC3) と獲得免疫系細胞 (IL-10 産生性 CD4 陽性 T 細胞) による誘導・抑制機構が存在することが明らかとなった (Goto Y, et al., *Sci Rep*. 2015)。

#### 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、細胞膜孔の形成をはじめとした P2X7 受容体の活性化機序・シグナルの詳細を明らかにするために、申請者が作製した抗 P2X7 受容体抗体 (Kurashima, Y. et al., *Nat. Commun.*, 2012) を用いた免疫沈降法、質量分析法を行い、P2X7 受容体会合分子の同定を試みた。また、得られた候補遺伝子に関しては CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いたスクリーニングを行い、細胞外 ATP-P2X7 受容体を介したマスト細胞活性化への作用について検証した。会合分子に対するスクリーニングの結果、脂質輸送を担う細胞膜貫通タンパク A とチャンネル型タンパク B の欠損マスト細胞が顕著に活性化の抑制を示し、活性化を促進する傾向を示す分子も見出された。B については胎生致死であることが報告されていたおり、A の欠損マウスを CRISPR-Cas9 法を用いて作製し、欠損マウスを得た。さらに、当該マウスからマスト細胞を誘導し、ATP への反応性を検証したところ、ATP への反応性の低下が予備的解析から示された。今度、更なる検証を進めていくことで P2X7 を介したマスト細胞の活性化経路の詳細を明らかにし、炎症性疾患に対する新たな治療ターゲットの創出が期待される。

「高橋班(広島大学)」

#### 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

我々はこれまで大腸粘膜における生理的炎症の一端が M $\phi$  細胞に共生する *S. maltophilia* によって担われていることを明らかにしてきた。本年度は *S. maltophilia* の M $\phi$  細胞内共生成立に関与する宿主エフェクター分子群 (具体的にはインフラマソーム共通エフェクター分子 caspase-1/caspase-11/P2X7、さらに抗炎症性サイトカイン IL-10) の作用階層性について解析を試みた。その結果、*S. maltophilia* の M $\phi$  細胞内共生の成立に、これまで炎症誘導性プログラム細胞死(パイロトーシス)を担うと考えられてきた caspase-11/P2X7 が抗炎症性サイトカイン IL-10 の上流に位置するエフェクターとして必須の役割を果たすことが明らかになった。