

研究報告書

「腸管センチネルを標的とした炎症性腸疾患治療法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 浅野 謙一

1. 研究のねらい

近年我が国において、炎症性腸疾患の罹患者数が急増している。根本原因は解明されていないが、何らかの遺伝的要因に加え粘膜免疫機構の異常が発症に関与することが示唆されている。粘膜免疫は病原菌の侵入を厳格に監視する一方、食物や腸内常在細菌など有益な異物に対しては過剰反応しないよう抑制されている。ところが炎症性腸疾患ではこの寛容が破綻し、異常活性化した免疫細胞が自らの粘膜組織を破壊し、持続的な炎症を惹起すると考えられている。この慢性炎症の誘導には腸管の自然免疫細胞(マクロファージや樹状細胞)が重要な役割を担うと想定されているが、消化管には多様なマクロファージの亜集団が混在しており、炎症惹起における各々の役割分担は不明な点が多い。申請者はこれまで、CD169 を表面マーカーとし発現する少数のマクロファージが、異なる組織間あるいは組織と外界の境界領域に存在し、各組織に侵入する病原体(抗原)の性質に応じて適切な免疫応答を誘導する細胞集団であることを明らかにした。これらの知見から、CD169 マクロファージは生体防御の最前線で異物の侵入を監視するセンチネル(「門番」「衛兵」の意)細胞である可能性が示唆された。さらに、マウスにおいて CD169 陽性マクロファージのみを選択的に消失させると、CD169 陰性のマクロファージや CD11c 陽性の樹状細胞が腸管粘膜に正常数存在しているにも関わらず、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)で誘導された腸炎の重症度が劇的に改善することを発見した。これらの知見は、粘膜に局在する CD169 マクロファージが「腸管のセンチネル」として腸炎発症の初動反応を担い、粘膜内の他の免疫細胞の制御に関与している可能性を示唆する。このような背景のもと本研究では、炎症性腸疾患発症の重要な鍵を握ると考えられる新たにカテゴライズされたセンチネル細胞の同定および機能解析を介して、免疫寛容の破綻から慢性炎症に至る過程を分子、細胞レベルで明らかにすることを旨とする。具体的には、1)腸管炎症の初動における CD169 マクロファージの役割ならびに、2)CD169 マクロファージによる粘膜免疫系の制御機構を明らかにし、3)慢性炎症状態の解除機序に基づく炎症性腸疾患治療法を開発することを目的とする。

2. 研究成果

(1)概要

本さがけ研究で、消化管粘膜には CD169 陽性と陰性の 2 種類のマクロファージ亜集団が存在することを発見した。そして 1) CD169 マクロファージが、上皮から離れた粘膜筋板側に局在すること、2)同マクロファージ消失時にはマウスの炎症性腸疾患(DSS 誘導腸炎)が劇的に改善すること、3)上皮傷害時に CD169 マクロファージが CCL8 を産生し、炎症性マクロファージの動員を促進すること、を初めて明らかにした。これらの知見を活用し、CCL8 に対する中和抗体投与が DSS 誘導腸炎の臨床症状を軽減することを証明した。

本研究は、CD169 マクロファージとそれの産生する CCL8 が、炎症性腸疾患に対する新たな治療標的となる可能性を提示する。

(2) 詳細

研究テーマ A 「各種腸炎モデルにおける CD169 マクロファージの役割の検討」

A-1) CD169 マクロファージは粘膜筋板側に局在する、独立した常在マクロファージ亜集団である。

CD169 マクロファージの機能と局在を詳細に解析するため、まず細胞表面の CD169 分子を感度よく検出できるモノクローナル抗体 (クローン M7) を作製した。新抗体を用いたフローサイトメトリーにより、粘膜の CD169 陽性細胞は骨髄系免疫細胞(CD11b、CD11c 陽性細胞)の約 15%を占めることが分かった。また CD169 マクロファージは F4/80⁺、CD206⁺、SiglecF⁻、Ly6G⁻、Ly6C⁻で、組織常在型の独立したマクロファージ亜集団であることが示された。

続いて粘膜固有層微小環境内での CD169 マクロファージの局在を免疫組織化学で検討した。汎マクロファージマーカーである CX3CR1 陽性のマクロファージが、粘膜固有層全域に分布するのに対し、CD169 マクロファージは腸上皮直下にはほとんど存在せず、上皮から離れた筋板側に偏在することが分かった(図 1)。

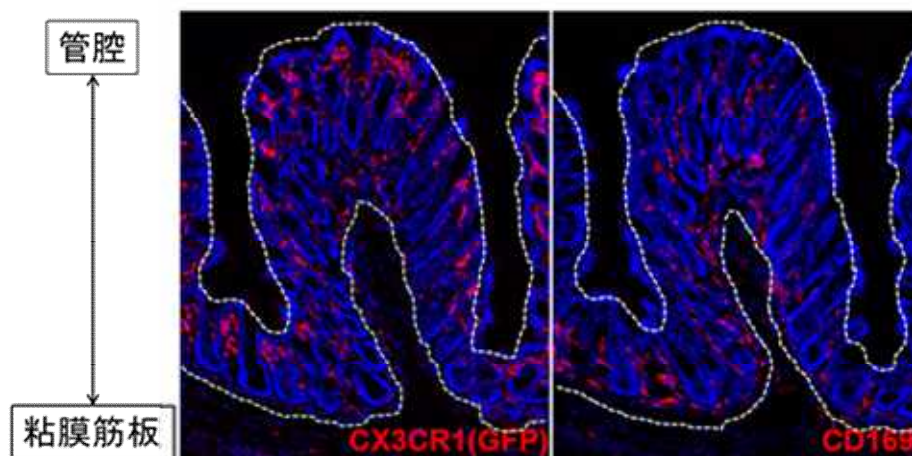


図 1 腸上皮から離れた粘膜筋板側に偏在する CD169 マクロファージ

CX3CR1 陽性のマクロファージが粘膜内にびまん性に分布するのに対し、CD169 マクロファージは上皮の直下にはほとんど存在せず、粘膜筋板側に多く見られる。

A-2) CD169 マクロファージは自然免疫依存腸炎の発症に重要な役割を担う。

炎症性腸疾患のマウスモデルには、自然免疫依存モデルのデキストラン硫酸(DSS)誘導腸炎と、獲得免疫依存モデルの T 細胞移入腸炎がよく利用されている。

まず DSS 誘導腸炎における CD169 マクロファージの役割を検討した。

ジフテリア毒素(DT)を投与した野生型と CD169-DTR マウスに 3.5%DSS(分子量 5000)を 7 日間飲水投与し、8 日目からは普通水に切り替えた。野生型マウスでは 1 週間で約 30%の体重減少や血便を伴う激しい腸炎が発症したのに対し、CD169-DTR マウスではこれらの臨床

症状が著明に改善した(図 2)。また野生型大腸では、陰窩構造消失、腸上皮脱落、多数の炎症細胞浸潤像を認めたが、CD169-DTR マウスではこれらの病理所見はいずれも軽度であった。

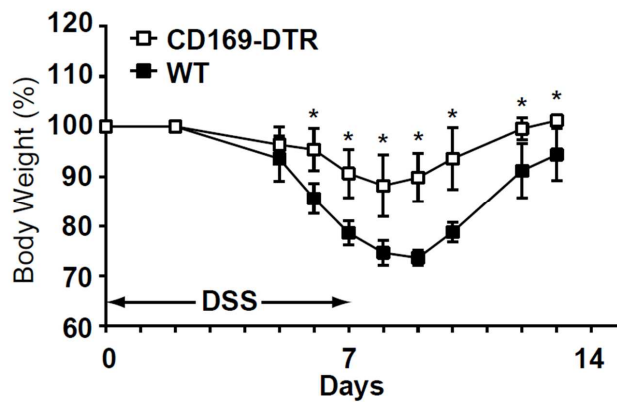


図 2 CD169 マクロファージ非存在下での炎症性腸疾患抑制

野生型マウスと CD169-DTR マウスに DT を投与し、3.5%DSS を 7 日間飲水投与した。CD169-DTR マウスでは腸炎に伴う体重減少が著明に改善した。*P<0.05。

続いて CD169-DTR マウスと RAG 欠損マウスを交配し、リンパ球欠損 CD169-DTR マウスを作製した。これに野生型マウスから分取したナイーブ T 細胞(CD4⁺, CD45Rb^{hi})を移入した。1 週間ごとに DT を投与した群と非投与群の間に有意な体重差を認めなかったことから、CD169 マクロファージは T 細胞移入腸炎の病態形成には必須ではないことが示された。

以上の結果から、以後の研究では自然免疫依存モデルを用いて CD169 マクロファージの役割を検討することにした。

研究テーマ B 「腸炎誘導における CD169 マクロファージの機能解析」

B-1) CD169 マクロファージ非存在下では、Ly6C^{hi} 炎症性マクロファージの浸潤が抑制される。

DSS 誘導腸炎マウスの大腸を免疫組織化学で検討したところ、野生型マウスでは F4/80 陽性細胞が無数に浸潤していたのに比べ、腸炎の軽度な CD169-DTR マウスでは、細胞浸潤が軽度であった。DSS 誘導腸炎では好酸球や好中球数も増加することが知られているため、浸潤細胞の構成をさらに詳しくフローサイトメトリーで解析した。好酸球や、好中球数は野生型と CD169-DTR マウスの間に大きな差はなかったが、Ly6C^{hi}F4/80⁺ マクロファージ数が CD169-DTR マウスで著明に減少していた(図 3)。この結果は、CD169 マクロファージが腸炎発症時に何らかのサイトカインを産生し、血流から単球を粘膜に動員する可能性を示唆する。

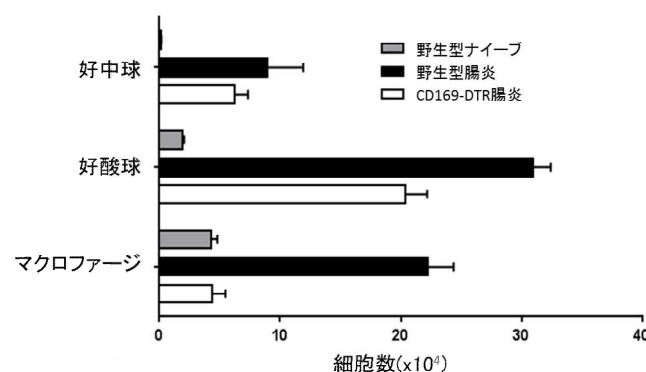


図 3 CD169 マクロファージ非存在下での炎症細胞浸潤

CD169 マクロファージ非存在下では Ly6C^{hi} 炎症性マクロファージの浸潤が抑制された。

B-2) CD169 マクロファージは腸炎発症時に CCL8 を高産生する。

そこで、CD169 マクロファージで強発現するサイトカイン遺伝子をマイクロアレイ法で網羅的に検索した。腸炎発症時に CD169 マクロファージ特異的に強発現するサイトカイン遺伝子(18種類)の内、定量 RT-PCR で最も上昇率の高かった CCL8 遺伝子に着目した。

CCL8 の発現をタンパク質レベルで検討するため、同サイトカインを特異的に定量できる ELISA 系を構築した。この実験系を用い、マクロファージ培養上清中の CCL8 濃度を測定したところ、野生型マウスでは腸炎誘導により CCL8 が高産生されるのに対し、CD169-DTR マウスでは、CD169 陰性のマクロファージや樹状細胞が同程度に存在するにも関わらず CCL8 の産生がほぼ完全に消失した。そこでさらに CD169 陽性および陰性のマクロファージをセルソーターで分取し、培養上清中の CCL8 濃度を測定したところ、CD169 陽性分画でのみ CCL8 の産生を認めた(図 4)。以上の結果は、腸管において CD169 マクロファージが CCL8 の主たる産生細胞であることを示す。

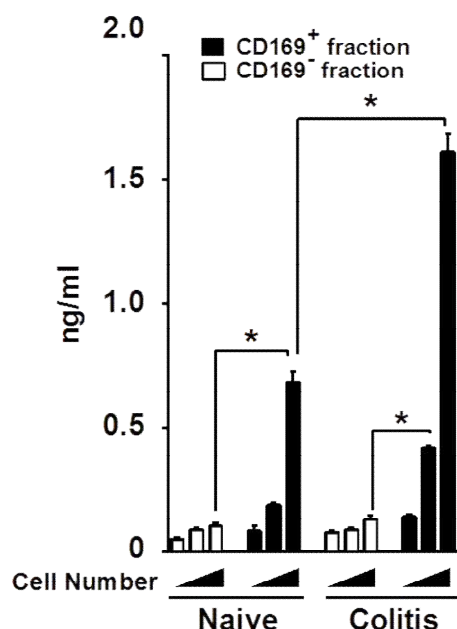


図 4 CD169 マクロファージ選択的な CCL8 産生

大腸粘膜固有層から CD169 陽性および陰性マクロファージをセルソーターで分取し、培養上清中の CCL8 濃度を ELISA で測定した。腸炎発症時に CD169 マクロファージが選択的に CCL8 を高産生する。* $P < 0.05$ 。

B-3) CD169 マクロファージは LPS, HMGB1 に応答し、CCL8 を産生する。

我々は以前、骨髄細胞を M-CSF, GM-CSF で培養すると、それぞれ CD169 陽性および陰性の均一なマクロファージを誘導できることを見出している。このマクロファージを *in vitro* で刺激すると、LPS(グラム陰性桿菌構成成分)あるいは HMGB1(死細胞由来抗原)刺激時に CD169 陽性マクロファージによってのみ CCL8 が産生されることが分かった。この結果は、CD169 マクロファージが腸内細菌や死細胞に由来する抗原に反応し CCL8 を産生する可能性を示唆する。TNF や IL-6 産生は CD169 陽性と陰性のマクロファージで有意な差はなかった。この結果は CCL8 が通常の炎症性サイトカインとは異なり、腸管免疫の制御に何らかの役割を担う特殊なサイトカインであることを意味する。

B-4) CCL8 は in vitro, in vivo で単球に対する遊走活性を示す。

CCL8 は、マウスで末梢血単球やヘルパーT 細胞の垂集団に対し遊走活性を示すことが報告されている。トランスウェルチャンバーを用い、マウス単球細胞株 WEHI-3 に対する CCL8 の遊走活性を検討したところ、濃度依存性に WEHI-3 を遊走させることが確認できた。

また、CCL8 を添加したマトリゲルをマウスの皮下に接種し、24 時間後にマトリゲル内に浸潤する細胞の形態をギムザ染色で確認したところ、ほとんどは単核球であることが分かった。

研究テーマ C 「特定の腸管マクロファージを標的とした炎症性腸疾患治療法の開発」

ここまでの結果から、CD169 マクロファージが上皮傷害時に CCL8 を産生し、単球由来炎症性マクロファージを血流から動員することが初めて解明された。この CD169 マクロファージによる炎症性マクロファージ動員機序の阻害を目的として、抗 CCL8 モノクローナル抗体を作製し、DSS 腸炎誘導マウスに投与した。驚いたことに、抗 CCL8 抗体投与マウスではアイソタイプ IgG 投与群に比べ、体重減少、組織破壊が改善し、組織でのエフェクターサイトカイン(IL-17) 産生量が有意に減少した(図 5)。以上の結果から、CD169 マクロファージとそれの産生する CCL8 は炎症性腸疾患の治療標的として有望である可能性を示唆する。

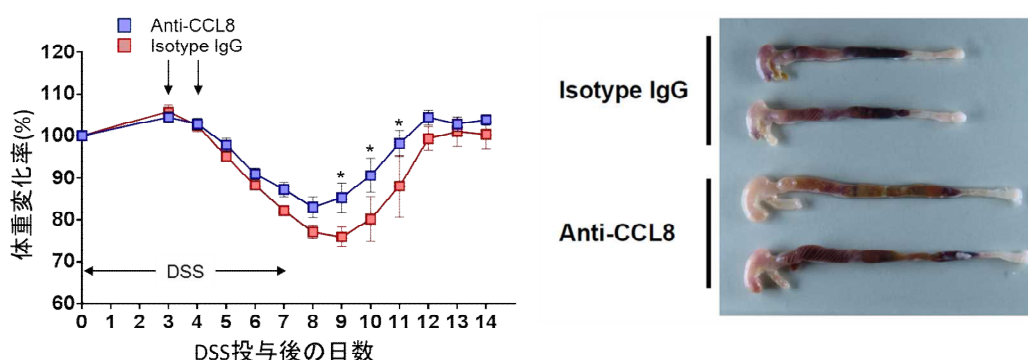


図 5 抗 CCL8 抗体投与による DSS 誘導腸炎抑制

(左)抗 CCL8 抗体 100mg を 2 日間静脈内投与したマウスではアイソタイプ IgG 投与群に比べ、体重減少(左)、血便・大腸の短縮(右)が軽度だった。

3. 今後の展開

近年登場した抗 TNF α 抗体製剤は、炎症性腸疾患の疾患概念や、治療戦略に劇的な変化をもたらした。しかしながら日和見感染症など重篤な副作用も多く、免疫学的機序に基づく新たな治療方法の開発が待望されている。

炎症性腸疾患の発症には粘膜に常在する自然免疫細胞が重要な役割を担うと想定されているにも関わらず、特定の細胞集団を標的とした炎症性腸疾患の治療法はこれまで開発されていなかった。本研究は CD169 マクロファージが上皮傷害とそれに伴う腸内細菌侵入を感知し、CCL8 を産生して炎症性マクロファージの動員を促進することを示し、抗 CCL8 抗体がマウスの DSS 誘導腸炎を抑制することを明らかにした。炎症性腸疾患患者の生検組織で CCL8 が高発現するとの報告があることから、ヒトにおいても CCL8 が炎症性腸疾患の治療標的となりうるか臨床検体をを用い検討したい。

4. 評価

(1) 自己評価

「研究目的の達成状況」

- ・ 腸炎発症の初動を担うセンチネル: CD169 マクロファージの同定と機能解析
 - ・ 腸上皮傷害から慢性炎症に至る分子メカニズムの解明
 - ・ 「センチネル」を標的とした炎症性腸疾患治療法: 抗 CCL8 抗体療法の開発
- については研究開始当初の目標をおおむね達成できた。

「今後の見込み」

抗 TNF 抗体の登場は炎症性腸疾患患者の予後改善に劇的な進歩をもたらしたが、免疫力低下に伴う日和見感染症など重篤な副作用も少なくない。消化管の特定の細胞集団を標的とした炎症性腸疾患治療法はまだなく、本研究成果は同疾患に対する新しい治療戦略構築に大きな進歩をもたらすことが期待できる。

「反省点」

さきがけで得られた研究成果を他分野の研究者と共有し、新たな研究領域の創設に発展させるなどの活動を、本研究期間中に十分行えなかった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

CD169陽性マクロファージが腸管の粘膜筋板近くの粘膜固有層に局在して、自然免疫依存性の炎症性腸疾患における症状の促進に寄与すること、その腸炎促進作用の一端として、上皮傷害に伴い細菌成分(LPS)や死細胞由来の内因性物質(HMGB1)にCD169陽性マクロファージが反応してCCL8を高産生し、Ly6Chi の炎症性マクロファージの遊走を促進するためであることを示した。このことにより、CD169陽性マクロファージやCCL8が、炎症性腸疾患の治療ターゲットである可能性を示唆した。今後、本知見をヒト炎症性腸疾患において確認し、新規治療法の開発に貢献することを期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Karasawa K, Asano K, Moriyama S, Ushiki M, Monya M, Iida M, Kuboki E, Yagita H, Uchida K, Nitta K, Tanaka M. 'Vascular-Resident CD169-Positive Monocytes and Macrophages Control Neutrophil Accumulation in the Kidney with Ischemia-Reperfusion Injury.' J. Am. Soc.Nephrol. 2014 (Online publication ahead of print)

(2) 特許出願

なし。

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

2012年 第35回 日本分子生物学会年会(口頭発表、筆頭演者、福岡)
第41回 日本免疫学会(口頭発表、神戸)
2013年 第36回 日本分子生物学会年会(口頭発表、筆頭演者、神戸)
第42回 日本免疫学会(口頭発表、幕張)
2014年 第37回 日本分子生物学会年会(ポスター発表、横浜)

受賞

2012年 日本免疫学会 第7回研究奨励賞