

## 腸管内に存在する自然リンパ球の機能解析

東京大学大学院 医学系研究科 病因・病態学専攻 免疫学講座

澤 新一郎

### 1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

クローン病、潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患は先進国を中心に患者数が増加し続けており、欧米諸国だけで36万人以上が罹患している。クローン病、潰瘍性大腸炎とも10代後半に発症ピークがあり、長期間遷延する腸管炎症は低栄養に伴う成長障害を惹起して患者の生活の質を著しく低下させるのみならず、骨粗鬆症や腸炎関連性大腸癌を高率に合併する。欧米のみならず、日本、韓国等のアジア地域においても20世紀中頃から炎症性腸疾患患者数は増加し続けており、食生活の西洋化、抗生物質の多用、衛生状態の改善等、腸内環境の変化による腸内細菌叢の変化と炎症性腸疾患の関連性が注目されている。また、一卵性双生児におけるクローン病発症率は二卵性よりも高頻度であることから遺伝的素因の関与も強く示唆され、「遺伝的素因を持つ患者における腸内細菌に対する免疫系の異常応答」が炎症性腸疾患発症機構として認識されはじめています。炎症性腸疾患に対する治療は従来のステロイド剤やアザチオプリンを始めとする免疫調整剤に加え、抗TNF $\alpha$ 抗体の登場により治療選択が増え、寛解導入率も改善した。しかし、抗TNF $\alpha$ 抗体難治症例が依然多数存在しており、病態の全容解明に基づいた新規治療法の開発がのぞまれている。

これまでのゲノムワイドな解析から、インターロイキン23受容体(IL-23R)の遺伝子多型とクローン病の強い相関が明らかになった。デコイIL-23R受容体を発現するIL-23R遺伝子多型群では炎症性腸疾患発症危険度が有為に低いことも明らかになっている。また、IL-23シグナルはTh17細胞の維持に重要な役割を果たし、多発性硬化症等の自己免疫性疾患発症を促進することから、炎症性腸疾患におけるTh17細胞の役割も注目されている。実際、炎症性腸疾患患者ではIL-23発現増加およびTh17細胞数の増加が報告されている。また、マウス腸炎モデルにおいて、IL-23-IL-17シグナルはT細胞依存的な腸炎発症に促進的な役割を果たすことが知られており、IL-23中和抗体やTh17細胞分化に重要な核内転写因子ROR $\gamma$ tの阻害剤が炎症性腸疾患に対する有効な治療法として期待されている。しかし、IL-23p40中和抗体であるUstekinumab療法は抗TNF $\alpha$ 抗体療法が無効な中～重症度のクローン病症例に対する治療反応性を示すものの、寛解導入には成功していない(W. J. Sandborn et al, New England Journal of Medicine, 2012)。IL-23はROR $\gamma$ tを発現する $\gamma\delta$ T細胞や自然リンパ球に作用し、IL-10ファミリーサイトカインであるIL-22の発現にも重要な役割を果たす事が知られている。IL-22はマウスのクローン病モデルであるDextran Sodium Sulfate (DSS)誘導性腸炎において抑制的な作用を持つことから、炎症性腸疾患発症のある局面においてはIL-23シグナルが抑制的な作用を持つとも想定されるが、ヒト炎症性腸疾患における自然リンパ球やIL-22の役割については詳細に検討されていない。

我々哺乳類の腸管には $10^{3-4}$ 種にも及ぶ細菌種、真菌が生着し、複数の代謝経路を宿主と共有している。この共生関係は何億年にもおよぶ進化の過程で樹立されたと考えられる。近年、腸内細菌に対するメタゲノム解析が進められ、ヒトの代謝性疾患、心血管系疾患ならびに免疫異常の病態形成に関与する腸内細菌叢が明らかになりつつある。炎症性腸疾患の病態形成に関与する腸内細菌叢の解析も進められてきたが、これまで特定の病原性細菌種は同定されていない。しかし、抗生剤治療やプロバイオティクス療法が炎症性腸疾患に有効な例もあることから、腸内常在細菌が炎症性腸疾患の病態形成に重要な役割を果たすことも知られている。一方、遺伝的要因としてこれまで報告されてきた、*ATG16L*, *NEMO (IKBK)*, *NOD2*, *CARD5*, *MUC2*はいずれも上皮整合性維持、抗菌ペプチド産生、粘液産生に重要な役割を果たす遺伝子である。また、IL-23Rの下流で誘導されるTh17細胞由来IL-17Aおよび自然リンパ球由来IL-22は腸管上皮細胞に作用し、 $\alpha$ -Defensin, S100, REG等の抗菌ペプチド産生や、好中球の遊走を促進するケモカインCXCL1, CXCL2の産生を促進することで、腸内細菌に対する重要な免疫機能を誘導することが知られている。これらの遺伝学的解析から、「不適切に形成された腸内細菌-宿主免疫関係により炎症性腸疾患が発症する」と想像することは難しくはない。しかし、個体発生過程において宿主免疫の異常が原因となり腸内細菌-宿主免疫の平衡状態が破綻する機序はこれまで解明されていない。

ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球はIL-23シグナル依存的にIL-22およびIL-17Aを強力に産生し、腸管免疫恒常性維持に重要な役割を果たすことが知られている (Sawa et al., Nat Immunology, 2011, Sonnenberg et al.,

Immunity, 2011)。本研究では、ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球を特異的に欠失させたマウスを樹立し、ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球が、新生仔期における腸内細菌叢形成に関与する可能性、および腸内細菌が獲得免疫系の成熟に与える影響を検討する。

本研究の研究の結果、個体発生過程における「健全な腸内細菌-宿主免疫関係」が成立する機序が明らかになる。さらに、これまで注目されてこなかった自然リンパ球におけるIL-23シグナルが腸内細菌叢形成や炎症性腸疾患発症に果たす役割が明らかとなり、IL-23中和抗体やROR $\gamma$ t阻害剤を用いたクローン病治療の適正化が可能になると考えられる。

## 2. 方法 ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球を特異的に欠失させたマウス系統の樹立。

### <方法1：抗体によるCD4陽性自然リンパ球除去>

ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球の一部は表面にCD4分子を発現している。特に、出生直後の新生仔C57/BL6マウス腸管では、ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球の約70%がCD4を発現することが知られている。末梢CD4陽性T細胞はGK1.5抗体投与により生体から除去される事が知られている。本研究では日齢0日の新生仔C57/BL6マウスにGK1.5抗体(eBioscience)を連続1週間皮下注射し、CD4陽性自然リンパ球の除去日齢14日マウスにおける腸管ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球数を検討する。

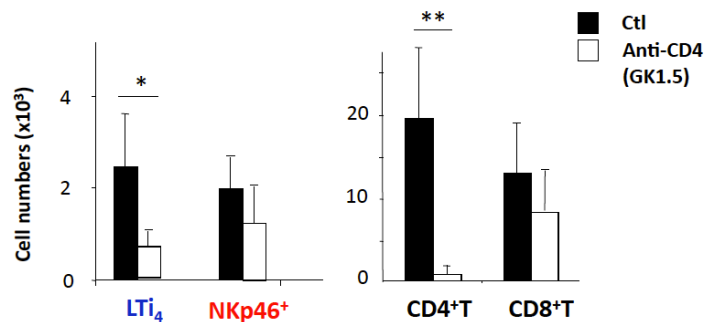
### <方法2：ROR $\gamma$ t-DTREGFPトランスジェニックマウスの作成>

ROR $\gamma$ t陽性細胞を新生仔期特異的に完全に除去するシステムを開発する。ROR $\gamma$ t陽性細胞においてサル由来ジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニック(TG)マウスを作成し、ジフテリア毒素依存的なROR $\gamma$ t陽性細胞除去法を樹立する。実際にはSK1.1 shuttle vectorを用いて遺伝子組み替えを生じ、*Rorc*遺伝子開始コドンの直後にカニクイザル由来*Dtr*と*Egfp*融合遺伝子を挿入したBacterial Artificial Chromosome (BAC)大腸菌クローン(Invitrogen)より高純度に精製したBAC DNAを後、受精卵に注入し、キメラマウスを作成する。精製DNAの純度評価には、Pulsefield electrophoresis (CHEF DR-II, Bio-Rad)を使用する。また、TGマウス作成は在籍する(独)国立成育医療研究センター研究所においては経験が乏しいため、共同研究者であるフランス・パスツール研究所のGerard Eberl博士の協力を得て同研究所においてTGマウスの作成を行う。作成された新生仔Tgマウスにジフテリア毒素を投与し、ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球を除去後、腸管内容物に含有される細菌種特異的プライマーを用いたPCRまたはシーケンス法により、定性的、定量的に解析する。さらに各種サイトカインに対する中和抗体を用いて同様の実験を行い、サイトカインネットワークが腸内細菌の構成に与える影響を検討する。

## 3. 結果 研究成果

### <結果1：抗体によるCD4陽性自然リンパ球除去>

出生直後の新生仔C57/BL6マウスに10  $\mu$ gのGK1.5抗体またはコントロール抗体(RatIgG2bk)を1日1回、14日間連続で皮下注射後、小腸粘膜固有層のリンパ球分画を調整、フローサイトメーターでROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>の細胞(LTi<sub>4</sub>と表記)を検出し、一個体当たりの細胞数を調べた(N=5)。その結果、GK1.5抗体投与群においてCD4陽性自然リンパ球が有為に減少することが明らかとなった。しかし、1)出生直後には認められなかったROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球分画であるNKp46<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t陽性細胞(NKp46と表記)数はコントロール群と有為差が認められなかった。2)日齢14日までに出現したヘルパーCD4陽性T細胞数もGK1.5抗体投与群において有為に低下することが明らかになった。(右図)



### <結果2：ROR $\gamma$ t-DTREGFPトランスジェニックマウスの作成>

計画通り、PCR法によりクローニングしたカニクイザル由来*Dtr*とオワンクラゲ由来*Egfp*の融合遺伝子をshuttle vectorに組み込み、*Rorc*遺伝子全長を含有するBAC DNA大腸菌クローンへのトランスフォーメーションおよびBAC DNA上での遺伝子相同組換えに成功した。トランスジーンは*Rorc*のexon1開始コドン直後に挿入されていることをシーケンスにより確認した。このように組み替えを完了した*Rorc*-DTREGFP BAC クローンから組み替えBAC DNAを調整し、購入したCHEF DR-II チラーシステムでDNAの質的、量的な検証を行い、十分量のDNAを入手した。このDNAはパスツール研究所のGerard Eberl博士およびFrancina Langaの協力のもと、マウス受精卵へ注入され、キメラマウスの作成を行った。現在、生殖細胞系列にトランスジーンを含むF1マウスのスクリーニングを行っている。

#### 4. 考察 まとめ

今回の研究で試みた1) GK1.5抗体による細胞除去法では全てのROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球を生体から除去することは不可能であった。この報告はドイツのDiefenbachらはNKp46<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t陽性細胞がCD4陽性自然リンパ球に由来するとの報告(Vonarbourg et al., Immunity, 2010)と矛盾し、「CD4<sup>+</sup>自然リンパ球とNKp46<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t陽性細胞が異なる前駆細胞から分化する」と筆者らが提唱したモデル(Sawa et al., Science, 2010)と合致する。また、日齢14のマウス腸管におけるCD4陽性T細胞はTh17型への分化が進んでいないものの、GK1.5抗体による除去率は高く、腸管恒常性への影響が無視できない。そのため、ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球への特異性の高い抗体による細胞除去が本研究を遂行する上で有効な手段と考えられる。

ROR $\gamma$ t-DTREGFP TGマウスの作成計画は現在も進められているが、本マウスもROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球特異的除去という点では問題が残る。なぜならば、ROR $\gamma$ tはCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>胸腺未熟細胞にも発現するため、ジフテリア毒素の投与はTCR $\alpha\beta$ 陽性細胞数の減少や、胸腺細胞の大量細胞死を誘発し、自然免疫系の予想外の活性化を惹起する可能性もあるからである。これらの問題点を回避するために、1) 作成したROR $\gamma$ t-DTREGFP TGマウスをT細胞欠損マウス(RAG2欠損マウスやCD3e欠損マウス)と交配し、T細胞非存在下でのROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球機能の解析を行う。または2) TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞においてDTR-EGFP遺伝子を発現しない新規トランスジェニックマウスを作成する必要がある。

筆者らと同様、ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球の機能に注目し、アメリカ・ペンシルベニア大学のDavid Artisらは抗CD90抗体を利用してROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球の除去を試みた結果、Alcangelus種の細菌が腸内およびパイエル板内で増殖し、腸管および全身性の炎症を惹起する事が明らかになった(Sonnenberg et al., Science, 2012)。CD90分子の発現はT細胞および胸腺細胞にも発現し、実験方法自体に問題があるが、CD90陽性ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球の減少により「腸内細菌- 宿主免疫系の平衡関係」が崩れ、炎症が惹起されたことは興味深い。

今回助成の機会を頂いた本研究課題を今後遂行し、ROR $\gamma$ t陽性自然リンパ球の機能に注目した「腸内細菌- 宿主免疫系の平衡関係の成立機構」の解明を進め、炎症性腸疾患の病態解明および新規治療法の開発に繋がる新たな知見の創出を行ってゆきたい。

#### 5. 発表論文、参考文献

なし