

Spi-C 発現腸管ミエロイド細胞の分化機構解明
大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学教室
香山 尚子

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

クローン病および潰瘍性大腸炎といった慢性炎症性腸疾患(IBD)は、我が国で急激に増加している難治性疾患であり、病因の究明および効果的治療法の開発が望まれている。これまでに、Th1/Th2バランスの破綻によるT細胞の機能異常や、Th17細胞の活性化がIBDの病態に深く関わっていることが解明されている。しかし、根本的な原因解明・有効な治療薬の開発には至っていない。近年、自然免疫系の活性異常がIBDをはじめとする炎症性疾患の発症に深く関与することが報告されている。マウス腸管粘膜固有層では、いくつかの自然免疫細胞サブセットが同定されるとともに、それらの細胞が多様なメカニズムにより腸内常在細菌や病原性細菌に対する免疫応答を制御することで腸管免疫系の恒常性維持に寄与することが明らかとなっている。申請者はこれまでに、腸管粘膜特異的に局在する自然免疫細胞であるCX₃CR1^{high}CD11b⁺CD11c⁺ 制御性ミエロイド(regulatory myeloid cell; M_{reg})細胞を同定するとともに、その活性異常がマウスの腸炎発症に深く関与することを明らかにしている⁽¹⁾。また、多様な腸管自然免疫細胞サブセットのなかでM_{reg} 細胞特異的に転写因子Spi-Cが高発現することを見出した。本申請研究では、転写因子Spi-CによるM_{reg} 細胞の制御機構を明らかにする。また、ヒト腸管粘膜固有層においてSpi-Cを高発現し炎症抑制能を持つ自然免疫細胞サブセットが存在するかを明らかにすることで、IBDに対する新規治療法開発の基礎基盤提供を目指す。

2. 方法

腸管 CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞は、細胞接着分子 ICAM-1/VCAM-1 を高発現することで T 細胞と優位に結合する一方、IL-10/Stat3 シグナル依存的に CD80/CD86 の発現が抑制されているため、結合したエフェクター T 細胞に増殖刺激が誘導されず、腸管炎症抑制に機能している⁽¹⁾。申請者は、鉄代謝に関与する脾臓 red pulp macrophage (Mφ)に高発現する鉄代謝関連遺伝子⁽²⁾が M_{reg} 細胞において強く発現していることを見出しており、鉄イオンが M_{reg} 細胞の分化・生存・炎症抑制能獲得に関わる可能性が示唆された。そこで、鉄欠乏食を投与したマウスにおける M_{reg} 細胞の数を解析したところ、鉄欠乏食を投与したマウスでは通常食摂取マウスに比べ M_{reg} 細胞の割合が減少すること、デキストラン硫酸塩依存的な腸管炎症に対する感受性が高くなることが明らかとなった。これらの結果から、食餌由来の鉄イオンが M_{reg} 細胞の維持に必須であるとともに腸管組織の恒常性維持においても重要な役割を果たすことが示唆された。また、申請者は M_{reg} 細胞において転写因子 Spi-C が強く発現していることを見出すとともに、Spi-C-GFP マウスの大腸粘膜固有層より回収した CD11b⁺CD11c⁺Spi-C⁺ 細胞が CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞と同様にエフェクターT細胞の増殖を抑制することを明らかにしている。申請研究では、M_{reg} 細胞の分化機構を明らかにするとともに、IBD 治療への応用を見据え *in vitro* における M_{reg} 様細胞誘導法を確立するため以下の解析を行った。

(1) ミエロイド細胞特異的 Spi-C 欠損マウスの解析

Spi-C が M_{reg} 細胞のマスターレギュレーターとして機能するかを明らかにするため、Spi-C 欠損マウスを作成し M_{reg} 細胞の解析を行った。

(2) ヒト腸管粘膜固有層における Spi-C 発現ミエロイド細胞の同定

大腸癌患者より回収した非浸潤部位より粘膜固有層細胞を回収し、多様な表面マーカー(CD14, CD11c, CD163, CD16, HLA-DR, lineage marker (CD3, CD19, CD20, and CD56))を用いて自然免疫細胞サブセットを同定し、DNA マイクロアレイ解析を行った。また、Th17 細胞の分化を誘導するヒト腸管 CD14⁺CD163^{low} 樹状細胞 (DC)⁽³⁾と末梢血中の CD4⁺ T細胞の共培養で誘導される T細胞増殖を抑制するヒト腸管自然免疫細胞集団の同定を行った。

3. 結果 研究成果

(1) ミエロイド細胞特異的 Spi-C 欠損マウスの解析

マウス大腸粘膜固有層に局在する自然免疫細胞 ; CX₃CR1^{high}CD11b⁺CD11c⁺ M_{reg} 細胞、CX₃CR1^{neg}CD11b⁺CD11c⁺細胞、CD11b⁺CD11c⁻ Mφ, CD11c⁺CD103⁺ DC を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った結果、CX₃CR1^{high} CD11b⁺CD11c⁺ M_{reg} 細胞において転写因子 Spi-C および鉄代謝関連分子が高発現することが示された(図 1)。また、Spi-C-GFP マウスの解析により、大腸粘膜固有層の CX₃CR1^{high} 細胞にタンパク質レベルで Spi-C が発現することが確認された。次に、Spi-C を高発現する腸管 CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞において、Hmox1, CD163, Slc40a1, Blvrb といった鉄代謝関連分子が高発現することに注目し、食餌鉄による CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞の制御について解析を行った。鉄欠乏食を与えたマウスの大腸において CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞の割合および数が顕著に減少していることが示された。コントロール食投与群に比べ鉄欠乏食投与マウスより回収した CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞において、Spi-C および鉄代謝関連分子の発現が低下することを明らかになった。さらに、コントロール食および鉄欠乏食を投与したマウスより回収し

た CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞を LPS 刺激し、遺伝子発現を解析した結果、鉄欠乏食投与群では、IL-10 の発現が低下する一方、IL-6 の発現が上昇することが示された。鉄欠乏食投与マウスの CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞において、炎症性サイトカインの産生増加および抗炎症性サイトカイン

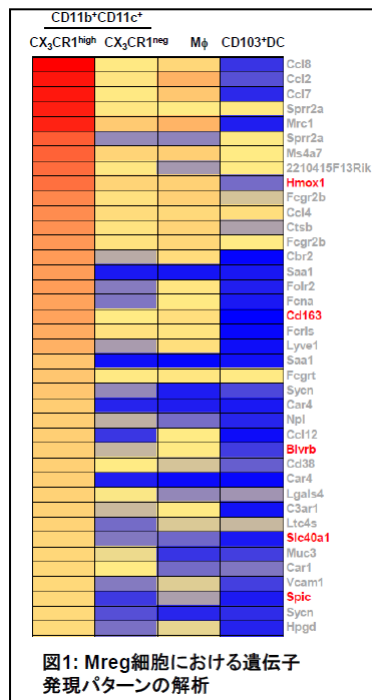


図1: Mreg細胞における遺伝子発現パターンの解析

IL-10 の発現低下が確認されたので、コントロール食および鉄欠乏食を与えたマウスに DSS 投与を行い腸管炎症に対する感受性を調べた。その結果、鉄欠乏食投与群において著しい体重減少および腸管炎症像が確認された。また、鉄欠乏食投与マウスに Spi-C⁺ 腸管ミエロイド細胞を投与した結果、DSS 投与による体重減少が抑制された。これらの結果より、食餌鉄依存的な CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞の恒常性維持が腸管炎症抑制に重要であることが示された。鉄欠乏による Spi-C の発現低下が CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞の機能不全に関与するかを明らかにするため、*LysM-cre; Spi-C^{fllox/fllox}* マウスを作成し、解析を行った。その結果、Spi-C 欠損 CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞では、鉄代謝関連遺伝子 *Slc40a1* および *Cd163* の発現が低下することが示された(図 2)。また、Spi-C 欠損腸管 CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞において LPS 刺激依存的な IL-10 の発現が低下する一方、IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインの発現が上昇することが示された(図 3)。

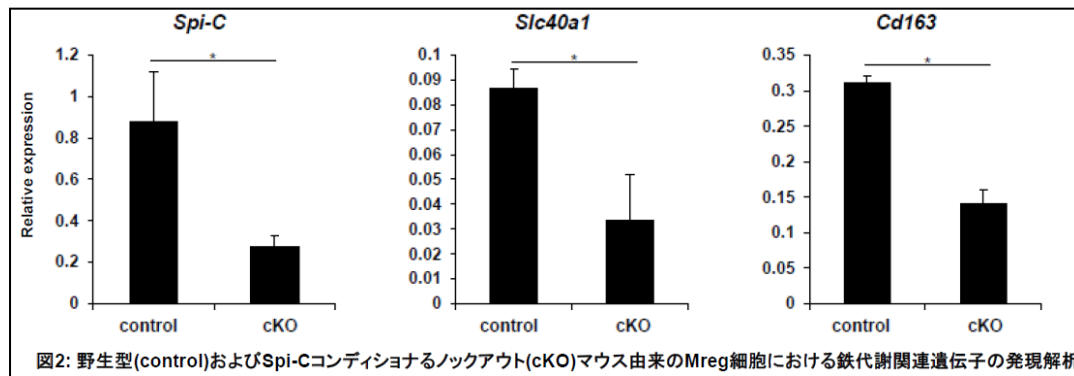


図2: 野生型(control)およびSpi-Cコンディショナルノックアウト(cKO)マウス由来のMreg細胞における鉄代謝関連遺伝子の発現解析

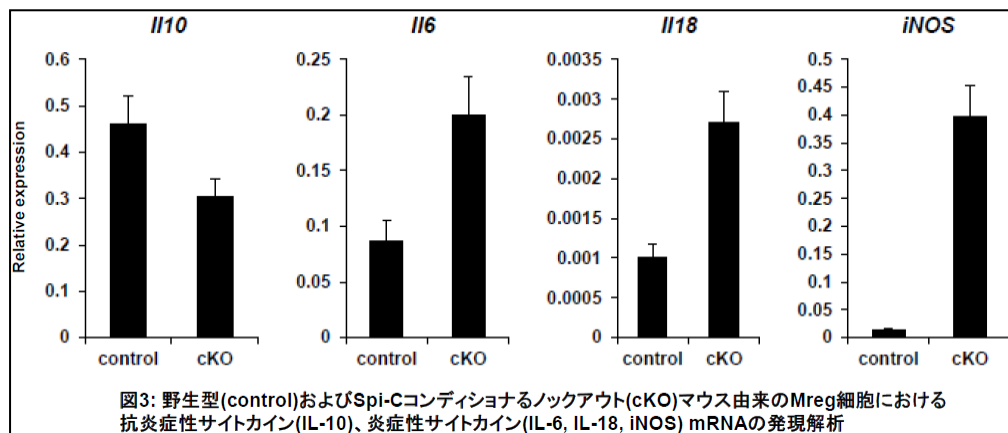


図3: 野生型(control)およびSpi-Cコンディショナルノックアウト(cKO)マウス由来のMreg細胞における抗炎症性サイトカイン(IL-10)、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-18, iNOS) mRNAの発現解析

(2) ヒト腸管粘膜固有層における Spi-C 発現ミエロイド細胞の同定

大腸癌の手術の際に得られる大腸正常部位の粘膜固有層より細胞を回収し、種々の細胞表面マーカーで染色を行った結果、Lin⁻HLA-DR^{high} 細胞のうち CD11c⁺CD14⁺ 細胞が CD163^{high} および CD163^{low} 細胞に分けられること、さらに、CD163^{high} 細胞が CD160^{high} および CD160^{low} 細胞に分けられることを見出した。また、CD163^{low} 樹状細胞は CD4⁺ T 細胞との共培養で T 細胞の増殖を誘導する一方、CD160^{high} 細胞は CD163^{low} 樹状細胞依存的な T 細胞増殖を抑制することが明らかとなった(図 1)。ヒト腸管 CD160^{high}CD14⁺CD11c⁺HLA-DR^{high} 細胞がマウス CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞のカウンターパートであることが示唆されたので、Spi-C の発現を DNA マイクロアレイおよび Q-PCR 法により解析した結果、正常腸管の CD160^{high} 細胞において Spi-C の発現が顕著に高いことが示された(図 2)。また、潰瘍性大腸炎の組織では、CD160^{high} 細胞の数が減少するとともに Spi-C の発現が顕著に低下することが示された(図 3)。

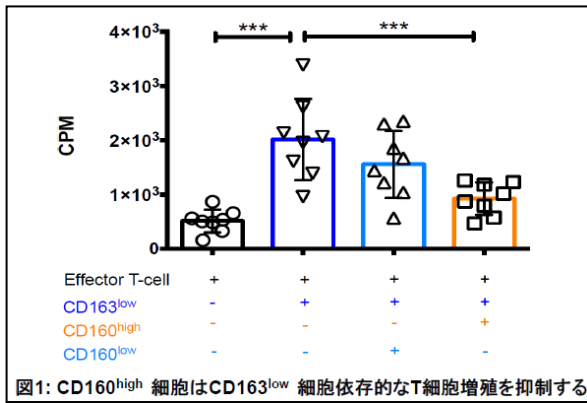


図1: CD160^{high} 細胞はCD163^{low} 細胞依存的なT細胞増殖を抑制する

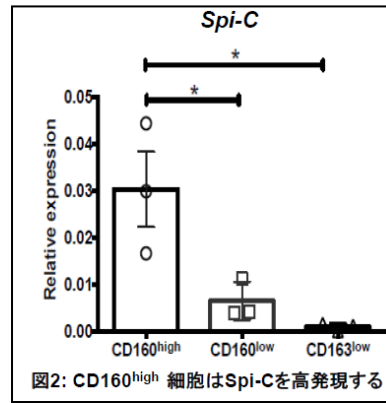


図2: CD160^{high} 細胞はSpi-Cを高発現する

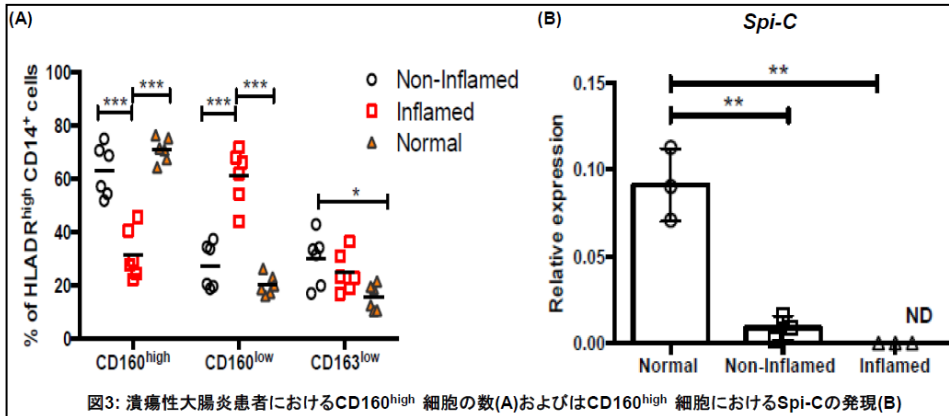


図3: 潰瘍性大腸炎患者におけるCD160^{high} 細胞の数(A)およびはCD160^{high} 細胞におけるSpi-Cの発現(B)

4. 考察 まとめ

これらの結果より、マウス腸管 CX₃CR1^{high} 細胞は、(1) Spi-C の発現が誘導されことで抗炎症性サイトカイン IL-10 および炎症性サイトカイン IL-6, IL-18, iNOS の産生が制御されること、(2) Spi-C を発現した CX₃CR1^{high} 細胞は食餌鉄依存的に生存が維持されるとともに IL-10 刺激を受けフェクターT細胞の増殖を抑制する CX₃CR1^{high} M_{reg} 細胞へと分化し、腸管恒常性維持に機能することが明らかとなった。また、ヒト腸管組織において、Spi-C を高発現する CD160^{high}CD14⁺CD11c⁺HLA-DR^{high}細胞がマウス M_{reg} 細胞のカウンターパートであることが同定されるとともに、IBD 患者においてその数が顕著に減少することより、CD160^{high}CD14⁺CD11c⁺HLA-DR^{high}細胞がヒト腸管組織において T 細胞増殖を抑制することで腸管恒常性維持に寄与することが示唆された。今後、ヒト腸管 CD160^{high}CD14⁺CD11c⁺HLA-DR^{high}細胞の生存が食餌鉄依存的に維持されるのかを明らかにすることにより、鉄イオンを介した IBD 治療法の開発に繋がるものと考えられる。

5. 発表論文、参考文献

- 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. 2012. Intestinal CX3C chemokine receptor 1(high) (CX3CR1(high)) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:5010.
- 2 Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B. T., Wilker, P. R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W. A., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. 2009. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457:318.
- 3 Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Takeda, K., Doki, Y., and Mori, M. 2013. Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 145:1380.