

# NewsLetter Vol.12 No.1

## 消化管免疫の新たな知見

馬場 重樹 (滋賀医科大学 消化器内科)



第47回日本消化器免疫学会総会 (平成22年7月 於：大津 会長：藤山 佳秀) 〈免疫一般〉座長

今学会においては「免疫一般」のセッション、演題の座長を担当させていただきました。いずれも大変興味深い研究発表でした。このセッションでは4題の分野の異なる演題が討議されました。腸管免疫、腸内細菌叢の解析手法、新たなサイトカインヴァリエーション、ウイルスタンパク質の検出法など内容は多岐にわたりました。以下にこのセッションでの新たな知見を述べます。

演題1では防衛医科大学校内科学第2の東山正明氏が「T細胞特異的HIF-1欠損による消化管免疫の変化」という発表を行った。Cre-loxP systemを用いることにより、T細胞特異的に転写因子であるhypoxia-inducible factor (HIF)-1ノックアウトマウスを作成し、DSS腸炎に与える影響を解析。T細胞特異的HIF-1ノックアウトマウスにおいてlittermateと比較し腸炎の増悪を認め、T細胞のHIF-1が消化管炎症に防御的な役割を果たしていることを報告した。HIF-1は血管増殖因子、各種解糖系酵素など多くの遺伝子発現を転写レベルで制御することが知られており、また上皮に特異的に発現させたHIF-1は腸管炎症は増強するとの過去の報告もあり非常に興味深かった。

演題2は株式会社ヤクルト本社の内藤智

昭氏が「マウス大腸粘膜細菌叢の解析：粘膜細菌叢の維持における分泌型IgAの役割」という発表を行った。腸内細菌叢の網羅的な解析を行うためにレーザーキャプチャ・マイクロディセクション (LMD) とクローンライブラリ (CL) 法を組み合わせた腸内細菌解析法 (LMD-CL法) を構築し、腸管内へIgAを分泌できないpolyIgR欠損 (polyIgR<sup>-/-</sup>) マウスを用いてLMD-CL法にて腸内細菌叢を解析。粘膜細菌叢と内容物細菌叢は異なっていることが示され、polyIgR<sup>-/-</sup>マウスはpolyIgR<sup>+/+</sup>マウスと比較しPhylumレベルでProteobacteriaの構成比が減少し、Firmicutesの割合が増加していることなどを報告した。今後、LMD-CL法を用いヒト炎症性腸疾患における粘膜細菌叢の解析が期待される。

演題3は滋賀医科大学消化器内科の今枝広丞氏が「HT29細胞におけるIL-32新規variant強制発現による炎症性サイトカインの発現様式の変化について」という発表を行った。これまで、IL-32はIL-1βやIFN-γ、TNF-αにより誘導される炎症性サイトカインであることが報告されているが、今まで報告された中で最も短いIL-32のvariantをクローニング。HT-29細胞に

過剰発現させることにより反応性の違いを検討。IL-32の新規variantを導入したHT-29はTNF-αによるIL-8の発現が抑制されると報告した。最も短いvariantは腸管上皮細胞HT-29において炎症性サイトカインに対し抑制的に働いている可能性があることを結論づけた。

演題4は日本大学歯学部病理学教室の浅野正岳氏が「ロタウイルス非構造タンパク質NSP1の検出法の開発とその応用」という発表を行った。ロタウイルスは重篤な下痢症を引き起こすウイルスであるが、浅野氏はロタウイルスの感染により感染細胞内で産生される非構造タンパク質NSP1の検出システムの開発を行い、感染後3時間後にNSP1 mRNAの検出が可能であったことを報告した。従来のWestern blot法と比較し感染の早い段階での検出が可能であること、さらにtype III IFNがtype I IFNと比較し有意にロタウイルス感染を抑制することも同時に示した。

以上が担当させていただいた4演題であります。すべて比較的基礎的な検討が中心であり、今後の臨床応用にむけての発展が期待される演題でありました。

〔原稿受付：2010年9月16日〕

## 進歩する炎症性腸疾患に対するアプローチ

内藤 裕二 (京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学)



第47回日本消化器免疫学会総会 (平成22年7月 於：大津 会長：藤山 佳秀) 〈腸1〉座長

炎症性腸疾患の病態解明に向けた個性あるアプローチが展開されてきている。

名古屋大学 石黒らは、新規蛍光試薬を

開発し大腸粘膜杯細胞の分布様式から炎症時における構造異常を観察できることを報告した。蛍光内視鏡による病態診断へのア

プローチは、特定の細胞、さらには特定の物質を蛍光により認識できる可能性があり、今後有望な開発部門である。超拡大内



視鏡との比較も議論になった。

長崎大学 石居らは、クローン病のバイエル板のクリスタルバイオレット染色後の拡大内視鏡観察を行い、ドーム領域や周囲絨毛の特徴的所見を見いだしている。同グループは潰瘍性大腸炎におけるバイエル板異常についても報告している (J Clin Biochem Nutr. 2010; 46: 111-8)。バイエル板は腸管免疫応答において中心的役割を果たすことが知られており、同部位への内視鏡的アプローチは今後も新知見を生み出すものとして期待される。

大阪市立大学 森本らは、Th1細胞に発現する膜貫通タンパク質Tim (T cell immunoglobulin and mucin domain) の役割についての解析を行い、クローン病患者ヘルパーT細胞は、Th1刺激下でTim発現が有意に低値であり、Tim-3/Galectin-9経路の機能異常を示唆した。Tim-3/Galectin-9経路はTh1細胞を負に制御することが明らかにされ (Nature Immunology 2005; 6: 1245-52)、種々の自己免疫性疾患での解析が進められており、今後の臨床応用に期待したい。

滋賀医科大学 杉原らは、補体成分C3のmRNA発現解析を実施し、潰瘍性大腸炎活動期で平均5.4倍に増加することを示し、さらにはC3産生細胞として大腸筋線維芽細胞を、産生刺激としてIL-17の重要性を指摘した (Clin Exp Immunol. 2010; 160: 386-93)。大腸筋線維芽細胞の役割は同グループにより解析が進められ、炎症性細胞、粘膜上皮細胞と密接な相互作用が明らかになりつつある。

〔原稿受付：2010年8月18日〕

## 実験腸炎モデルを用いた治療薬の探索

久松 理一 (慶應義塾大学医学部 消化器内科)



第47回日本消化器免疫学会総会 (平成22年7月 於：大津 会長：藤山 佳秀) 〈腸2〉座長

高村ら (山梨大学) の発表はDSS腸炎モデルにおけるAryl hydrocarbon receptor (AhR) の作用についてである。AhRはダイオキシンなどの低分子有機化合物の代謝に関与する受容体でリガンドと結合し核内移行し転写因子として働く。演者らはAhRの活性化物質である2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinをDSS腸炎モデルマウスに前投与したところDSS腸炎の軽症化が認められ、その作用機序として粘膜内PGE2の誘導が考えられると報告した。腸炎治療標的としてのAhR経路の報告はまれであり興味深い知見と考えられるが、例えばAhR経路のターゲット細胞は何か、腸炎発症メカニズムにおけるAhRの関与はいかなるものかなど残された課題も多い。また活性化物質を治療として用いる場合の安全性などの検証も必要であろう。

山口ら (新潟大学) らはアンギオテンシンII阻害による腸炎抑制効果について検討している。アンギオテンシンIIは炎症誘発にも関与することも知られており、アンギオテンシンII受容体欠損マウスでは実験腸炎の軽症化が報告されており、またアンギオテンシンII受容体阻害剤などによるマウスモデルにおける腸炎抑制効果も報告されている。いっぽう演者らはアンギオテンシンII受容体阻害剤であるテルミサルタ

ンの注腸投与を用いて実験を行ったが明確な腸炎改善効果は確認できなかったと報告した。この結果がテルミサルタンに特有のものなのか、また今回の結果が炎症の悪化なのか治療遅延なのかが興味深い。アンギオテンシンIIの経路はさまざまな薬理活性に関与していると考えられ他のモデルを用いての検討も期待したい。

阿部 (大阪医科大学) らはTNBS腸炎モデルに対するシンバスタチンの効果について検討している。HMG-CoA還元酵素阻害剤はコレステロール合成阻害のほか抗炎症効果や抗線維化作用も有することが知られている。演者らのコンセプトは過度の線維化を抑制した炎症抑制にあると思われ、シンバスタチンの投与により炎症性サイトカインが低下し、TNBS腸炎は改善し、かつ線維化関連増殖因子の低下、線維芽細胞のアポトーシス誘導効果も認められたと報告している。ただ線維化やアポトーシス誘導に関するTGFβの作用については演者らの結果と異なる報告もありこの点についてはさらなる詳細な検討が必要であろう。また線維化を抑制することが創傷治癒の点では是か非かという問題も残されているように思われる。

孫 (新潟大学) らはDSS腸炎モデルに対するトラニラストの注腸投与の腸炎抑制結

果を報告した。抗アレルギー剤であるトラニラストは経口投与により腸炎抑制効果を発揮することが報告されているが副作用の少ない局所治療で有効であればより臨床応用が期待できると思われる。興味深いのは炎症抑制のみならず線維化も抑制していたことである。その機序の一つとして線維芽細胞数の減少が考えられると報告している。今後はそのメカニズムの解明が期待されるときにも線維化を抑制する適切なタイミングを明らかにすることも重要であると思われる。

以上本セッションでは4題の実験腸炎モデルを用いた治療薬の探索が報告された。またうち2題が炎症抑制のみでなく線維化を抑えるという観点からも検討されていることが興味深い。これまでに実験腸炎モデルを用いた治療標的の探索は数多く報告されてきたが治療応用にまでは至っていないという現状がある。DSSやTNBS腸炎のみではヒト炎症性腸疾患を十分に反映していないこと、各分子には複数の薬理作用がありin vivoでの作用はより複雑であるということが影響していると思われる。今後はこれらを打破すべく各研究が発展することを期待したい。

〔原稿受付：2011年1月15日〕





このセッションにおいては、「腸3」の4演題が討議された。

演題13は鹿児島大学大学院消化器疾患・生活習慣病学の岩下祐司氏が「グルタミンによる腸管上皮細胞Heat shock protein発現誘導はポリアミンにより制御されている」と題する演題であった。岩下氏は、近年健康食品としても話題の多いポリアミンに着目し、ラット腸管上皮細胞を用いて熱ショック刺激によるHsp70, Hsp25の発現誘導をウェスタンブロットで検討した。グルタミンを含む培地においてポリアミン生合成律速酵素の阻害剤の添加でHsp発現が阻害され、これにポリアミンを加えると再びHsp発現が誘導されたことからグルタミンはポリアミンに代謝されてHspを誘導しているという趣旨であった。IVH管理を長期間行い、経口摂取させないで絶食させると、絨毛の高さが短くなり、上皮の透過性が亢進するなど消化管が萎縮して免疫能が低下することは古くから知られている。驚くべきことにグルタミンをこの状態に補充すると、絨毛の高さが回復し、粘膜が厚くなることが知られている。このようにグルタミンには腸管保護作用が知られるが、その機序の1つとしてHeat shock proteinの発現誘導が知られている。グルタミンはほとんどが局所で代謝燃料として、小腸上皮細胞そのもののエネルギー源として利用されると考えられている。上皮細胞の中で代謝されて様々な機能を発揮していると考えられるが、代謝経路は複雑で複数のアミノ酸、ポリアミンバランスに変化をきたすであろう。Immuno-nutritionの進歩に大変重要な知見であり、さらなる研究を期待したい。

演題14は鹿児島大学大学院消化器疾患・生活習慣病学の指宿和成氏が「Human neutrophil peptide (HNP) は腸管上皮細胞IL-8, ICAM-1の発現を亢進させる」と題する演題であった。演者らはプロテオーム解

析により潰瘍性大腸炎患者の活動性にHNPが相関することを報告している。今回、ヒト大腸癌細胞を用いてHNP-1添加により腸管上皮細胞のIL-8, ICAM-1発現が亢進すること、その発現にはIL-8にはERKが、ICAM-1にはERKとp38が関与していることを示した。以上から、HNPは潰瘍性大腸炎の増悪因子として働き、その機序の1つとして好中球の遊走を促進しているのではないかと趣旨であった。潰瘍性大腸炎腸管粘膜ではIL-8発現が亢進し、好中球浸潤や、膿性分泌物の特徴がある。なんらかの機序で浸潤した好中球は更にHNPを介して浸潤を持続させることにより疾患を慢性化させる可能性があるということであろう。HNPが潰瘍性大腸炎にいかに関わっていくかの解明は非常に重要なテーマでと考えられる。他にも機序が存在する可能性があり、さらなる研究を期待したい。

演題15は鹿児島大学病院光学医療診療部の寄山敏男氏が「p62/SQSTM1染色によるクローン病腸管オートファジーの検討」と題する演題であった。演者らはクローン病患者腸管のオートファジー障害の有無を、LC3と、p62/SQSTM1を用いて免疫組織学的に検討し、陽性細胞につき抗CD68抗体との2重染色の検討をした。LC3陽性細胞は認めなかったが、p62陽性細胞はCD患者回腸で著明に増加しており特に肉芽腫で多く認めた。これらはCD68陽性マクロファージであった。p62+/CD68+ ratioは非病変部でも高値であった。以上から、日本のCD患者にもマクロファージ系細胞のオートファジー障害が存在しているとの趣旨であった。オートファジー異常は、クローン病の病態への関与が指摘されているものの一般的なマーカーであるLC3は感度が低く、検討ができなかった。今回使用されたp62/SQSTM1はユビキチンおよびLC3に結合する蛋白で、

オートファジー異常を間接的に検出ではあるものの高感度に判定でき、その有用性はきわめて高いと感じる。今回は症例数が少ない検討であったが、症例を増すことで臨床データとの相関に関する情報を得られることが想像に難くない。また、p62/SQSTM1陽性細胞の機能解析からのアプローチや、機能への干渉など発展性も期待できる。さらなる研究が楽しみである。

演題16は慶應義塾大学消化器内科の三好潤氏が「糖鎖抗原に着目した炎症性腸疾患の病態への新規アプローチ腸管上皮における血液型抗原の発現についての検討」と題する演題であった。演者らは大腸における血液型抗原の発現に必要なSe酵素をコードするFUT2遺伝子のSNPを非炎症性腸疾患患者、クローン病患者小腸型、小腸大腸型、大腸型、潰瘍性大腸炎患者の末梢血白血球より調べ、大腸の血液型抗原の発現を免疫組織学的に検討した。クローン病大腸型では全例でFUT2が活性型で全例大腸粘膜における血液型抗原の発現を認め、非炎症性腸疾患患者や残りの病型では約80%にとどまった。以上よりFUT2を介した大腸粘膜における血液型抗原がクローン病大腸型の発症になんらかの関与をしているのではないかと趣旨であった。腸管での細菌の繁殖にはムチンへの接着が必要であることが知られ、細菌は上皮細胞の糖蛋白や糖脂質上の糖鎖に結合能がある。大腸のムチンに発現する血液抗原の違いにより乳酸菌の接着が異なるとの報告がある。したがって、糖鎖抗原発現と腸内細菌接着の面からクローン病の病態に迫る本研究は、興味深くかつオリジナリティーに富んでいる。果たしてどの細菌の付着と関係があるか、H酵素をコードするFUT1との関係、小腸大腸型と大腸型の差異など興味は尽きない。さらなる研究が楽しみである。

[原稿受付: 2010年7月22日]



## 腸管免疫に関与する様々な因子

仲瀬 裕志 (京都大学大学院医学研究科 消化器内科)



第47回日本消化器免疫学会総会 (平成22年7月 於：大津 会長：藤山 佳秀) 〈腸4〉座長

本セッションでは腸管免疫に関与する様々な知見が報告された。

福島県立医科大学の片倉らは以前より、TLR9シグナル伝達を介したtype I IFNによる腸炎抑制効果を報告している。イミキモド (IMQ) が、TLR7を介してINF- $\alpha$ の産生に関与しているということはすでに報告されている。今回演者らはTNBS腸炎に対するIMQの炎症抑制効果を検討した。IMQ投与群は、無治療群に比べて有意に腸管炎症が抑制され、大腸における各種炎症性サイトカインの発現も低下していた。腹腔内リンパ節からCD4陽性細胞を単離、CD3/CD28抗体で刺激すると、IMQ投与群では、IL-10やTGF- $\beta$ の産生が増加していた。さらにフローサイトメトリーの解析では、IMQ投与群ではCD4+ CD25+ FOXP3陽性細胞の誘導が確認されていた。このことから、演者らは、IMQが炎症性腸疾患の治療薬になる可能性を示唆した。しかしながら、TLR7がinnate immunityにおいては重要な分子であり、炎症性腸疾患の病態にも関与している可能性は高い。TLR7 ligandの投与をいつ、どの段階でヒト炎症性腸疾患患者に行うのか？クローン病か潰瘍性大腸炎患者のどちらに効果的であるのか？今後これらを検証していく必要がある。

弘前大学 平賀らの発表は脂溶性ビタミンAの大腸上皮細胞における粘膜バリアー機能の重要性についての検討であった。演者らはVitamin A欠損 (VAD) マウスにDSSを投与し、野性型マウスと比較することにより、Vitamin Aの腸炎に及ぼす影響を検討した。その結果、VADマウスでは、野性型に比し明らかに腸管長の短

縮や高度な粘膜障害が認められた。さらに、演者らはVitamin Aの核内受容体であるRXRに対するsiRXRを大腸癌細胞株であるHT29に導入し、電機抵抗を測定した。その結果、RXR遺伝子がサイレンシングされたHT29では電気抵抗の低下が認められた。これらの結果をふまえて、Vitamin Aの欠損による腸炎増悪の機序は、腸管上皮細胞における粘膜透過性の亢進によるものと演者らは結論づけた。脂溶性ビタミンの1種であるVitamin Dにおいても、同様の結果が得られていることから、脂溶性ビタミン摂取が腸炎抑制効果に及ぼす重要性を示唆した非常に興味深い報告であると思われた。

旭川医科大学 上野らの発表は乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*) SBC8803死菌のDSS腸炎モデルマウスに対する治療効果を報告したものであった。演者らは、今までにSBC8803が腸管上皮細胞におけるp38MAPKを活性化し、Heat shock proteinが誘導され、その結果、酸化ストレスに対する腸管バリアー機能が增強されることを報告している。今回は、DSS腸炎モデルに対してSBC8803死菌の注腸投与を行いその治療結果を報告している。SBC8803死菌注腸投与群では、PBS注腸治療群に比べて、腸炎が有意に抑制され、各種炎症性サイトカインの産生も抑制されていた。Probioticsは近年、炎症性腸疾患の治療に有効であることが示唆されており、この発表の内容も今後の*Lactobacillus brevis*の臨床応用の可能性を期待させるものであった。一方で、Probioticsの作用機序としてはPeyer's Patchでの免疫応答が重要視されている。したがって、*Lactobacillus brevis*

経口投与でのDSS腸炎に対する治療効果と、注腸療法との治療効果の違いを検討することにより、ProbioticsのPeyer's patchを介さない免疫応答のメカニズムが検討できるかもしれない。

富山大学 門脇らは食物アレルギーにおけるPPAR $\gamma$ の重要性に着目した研究結果であった。食物アレルギー疾患では粘膜型マスト細胞が病態に重要な役割を果たしている。またPPAR $\gamma$ の主たる機能は脂肪細胞の分化増殖への関与であるが、近年免疫細胞においても抗炎症作用に関与することが報告されている。しかしながら、食物アレルギーにおけるPPAR $\gamma$ の重要性は充分には検討されていない。演者らはPPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスにOVAを感作させ、食物アレルギーにおけるPPAR $\gamma$ のマスト細胞における重要性を検討した。結果として、PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスと野性型マウスにおいてTh1 Th2サイトカイン産生に差は認められなかった。しかしながら、演者らは粘膜型骨髄由来マスト細胞を検討した結果、PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウス由来の粘膜型骨髄由来マスト細胞からは脱顆粒反応は有意に低下し、プロテアーゼの産生も低下していることを明らかにした。この結果から、食物アレルギーマウスモデルにおいてPPAR $\gamma$ 発現量の低下が粘膜型マスト細胞の脱顆粒に対して抑制的に働くことが示唆された。食物アレルギー治療において、今後PPAR $\gamma$ のアンタゴニストが、臨床応用されるかもしれない。この点については、さらなるin vivoでの実験が必要になるものと思われた。

[原稿受付：2010年9月7日]

## 第48回 日本消化器免疫学会総会

会期：2011年7月21日(木)・22日(金)

会場：金沢エクセルホテル東急 (石川県金沢市香林坊2-1-1 / TEL: 076-231-3912)

会長：中沼 安二 (金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 教授)

URL: <http://www.congre.co.jp/48jsmi/>

【事務局】金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 原田 憲一

〒920-8640 石川県金沢市宝町13-1

TEL: 076-265-2199 FAX: 076-234-4229