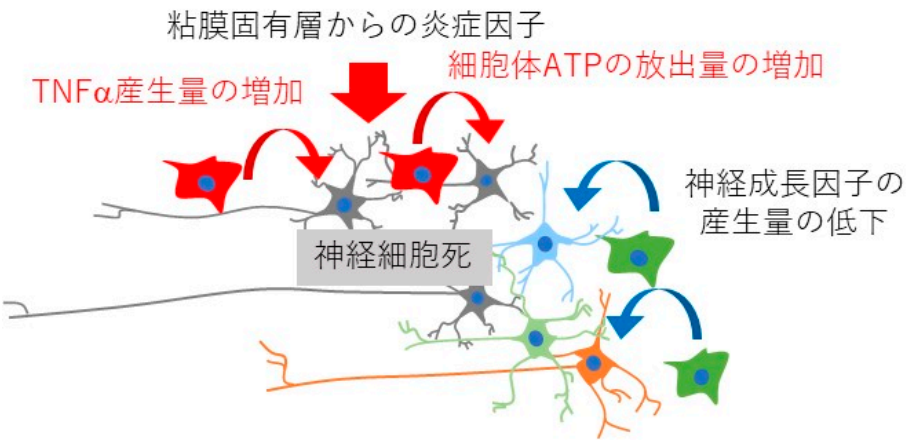
146　腸管微小環境における免疫細胞の機能解析	倉島　洋介

【目的】炎症性腸疾患は腸管粘膜を主体とした炎症という特性ゆえに、上皮や粘膜内の免疫細胞の機能解析が主に行われてきた。一方で腸管蠕動運動を司る神経叢が存在する筋層においても炎症が及ぶことが知られているが、筋層における炎症・抗炎症反応の多くは不明である。蠕動運動等の障害による腸管内容物の滞留は腸内細菌の構成にも影響を及ぼすことから、筋層を始めとした腸管の微小環境の解析は重要なテーマである。本研究では、炎症時に筋層に集積する免疫細胞の同定並びに機能的解析を行うことで、腸管微小環境における炎症機構の解明を目指す。

【方法】正常並びに腸炎マウスを用いて、大腸の粘膜固有層と筋層などの腸管微小環境に集積する免疫細胞について、免疫染色法とフローサイトメトリー法によってプロファイリングを行った。さらに、機能的解析については、各種炎症性サイトカイン等の炎症物質の発現量についての遺伝子解析並びに細胞単離後に網羅的遺伝子解析を行った。

【結果】粘膜固有層に比較して、筋層では $CD11b^{+}F480^{+}$のマクロファージをはじめとするミエロイド系の細胞が主な構成細胞であることが示された。正常時には、筋層マクロファージは神経成長因子を産生しており、神経保護に寄与するという既報に沿った結果が得られた。しかしながら、炎症時では神経成長因子の産生が低下し、TNF α の産生が起こることが示された。加えて、神経障害因子として作用する細胞外のアデノシン 3 リン酸（ATP）の放出源になっている可能性が示唆される ATP 放出チャネルの発現量が増加していた。以上のことから、筋層の主たる構成であるミエロイド系の細胞群は、神経保護から炎症増悪へと機能が変化しており、重症化に寄与している可能性が示された。つまり、腸炎発症時の筋層のミエロイド系細胞の機能的変化を制御することが、腸炎の増悪化を防ぐ方策の一つになると考えられ、現在その詳細について解析を進めている。

筋層ミエロイド系細胞による炎症増幅機構



146. 腸管微小環境における免疫細胞の機能解析

倉島　洋介

千葉大学 大学院医学研究院 イノベーション医学領域

Key words：筋層免疫，クローン病，神経叢，ミエロイド系細胞

緒　言

クローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患は腸管粘膜を主体とした炎症という特性ゆえに、上皮細胞や粘膜固有層中の免疫細胞のダイナミズムがフォーカスされ研究が進められてきた［1］。そのため、炎症部位である上皮・粘膜層に着目した研究ならびに創薬開発がこれまでの重点領域であった。その一方で腸管の組織構成を見てみると、粘膜深部である粘膜下層、外筋層、漿膜が存在し、クローン病ではこれらの層でも炎症反応が導かれるにも関わらず、腸炎におけるこれらの層についての解析は進められてこなかった。特に、腸管の外筋層は、“第二の脳”と呼ばれるほどに神経組織が豊富に存在し、それらは腸管の蠕動運動に加えて粘膜の運動や粘液およびホルモンの分泌能などの生理活動をも司ることから、筋層での炎症反応は腸管の機能に多大な影響を与えると予想される。クローン病患者においては、外筋層の神経細胞の細胞死が導かれており蠕動運動が損なわれていることが報告されている［2］。実際に腸炎においては一過性もしくは断続的な腸管運動の亢進や減弱が知られおり、腸内神経叢の部分的欠損や機能不全は、食物の消化性への影響や腸内細菌叢の構成、すなわち dysbiosis のトリガーとなると考えられている。このことから、腸炎時における神経叢を取り巻く外筋層における炎症制御機構についての研究は非常に重要なテーマである。そこで、本研究課題では腸管筋層の微小環境における免疫細胞の機能の解析を目的とした。

方法および結果

正常マウス並びにデキストラン硫酸ナトリウム水溶液の自由飲水による腸炎発症マウスの大腸組織中の 1. 免疫細胞のプロファイリングならびに構成細胞の 2. 機能的解析を中心に行った。

1.　免疫細胞プロファイリング

正常、デキストラン硫酸ナトリウム腸炎マウスの大腸粘膜固有層と筋層を酵素処理によって分離し、細胞を単離した。フローサイトメトリーにより、$CD45^+$の血球系細胞について、CD3 や CD11b といった各種免疫細胞表面マーカー抗体を用いて構成細胞のプロファイリングを行った。

その結果、粘膜固有層に比較して、筋層では $CD11b^+$のミエロイド系細胞が主たる構成細胞であることが示された。特に F480 陽性のマクロファージが 70%以上であることが示された（図 1）。その一方で、炎症時においては $Ly6c^+$の炎症性単球の割合が増加し、マクロファージと共に浸潤細胞数の増加が認められた（図 1）。

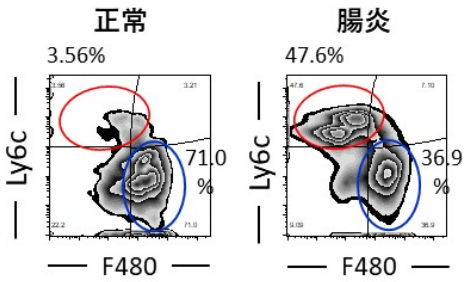


図 1. 大腸筋層に集積する細胞集団

正常ならびにデキストラン硫酸ナトリウム腸炎モデルマウスの大腸筋層を分離し、酵素処理によって細胞を単離した。CD45 陽性細胞についてフローサイトメトリーで解析を行ったところ、F480 陽性ならびに Ly6c 陽性の細胞集団の構成が大きく変化していることが示された。

2. 機能的解析

筋層マクロファージは神経保護因子である Bone Morphogenetic Protein-2（BMP2）の発現が高いことが報告されている［3］。その一方で、炎症時での機能については不明である。そこで、これら細胞集団を単離し TNFαやなどの各種炎症性サイトカインの発現量についての解析並びに網羅的遺伝子解析を行った。その結果、TNFαの発現が筋層マクロファージで顕著に増加しており（図 2）、一方で神経保護因子の発現レベルには低下が見られた。つまり、筋層で炎症反応を誘導している可能性が示された。

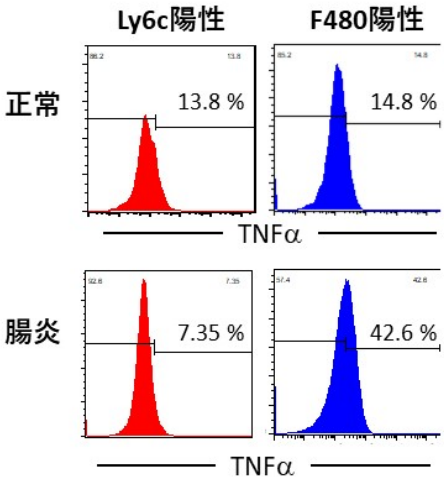


図 2. 筋層浸潤細胞の TNFα発現

マウス大腸筋層に浸潤する Ly6c 陽性および F480 陽性細胞中の TNFα発現量について細胞内染色を行いフローサイトメータで解析を行った。F480 陽性マクロファージの TNFα発現量が腸炎に伴い亢進していることが認められた。

網羅的遺伝子解析から、細胞外へとアデノシン 3 リン酸（ATP）を放出する際に用いられるチャネル分子群の発現量が筋層マクロファージで炎症時に増強していることが示された。細胞外 ATP は神経細胞変性を導くことが報告されている［4］。しかしながら、腸管深部における ATP の放出源については不明であった。本解析から、筋層マクロファージがその主たる産生源になっている可能性が示され、腸炎発症時には、筋層マクロファージが重症化に寄与していることが示された。実際に、筋層マクロファージを除去したマウスでは、神経変性が抑えられるという予備的データを得ている。

考　察

腸管筋層に分布し腸管の蠕動運動を司る神経叢に対して、マクロファージは保護的役割を担うと報告されてきた[3]。その一方で、炎症時における機能的な変化や神経細胞へ与える影響等については不明であり、本研究から、筋層中に分布する免疫細胞が、$CD11b^{+}F480^{+}$のマクロファージで主に構成されており、炎症に伴いTNFαを産生することが示された。このマクロファージの機能的変化に係る分子群については現在解析を進めており、粘膜固有層由来のTNFαが関わる可能性が示されている。また、現在は神経保護・炎症増悪のそれぞれに関与するマクロファージを同一細胞による機能的変化として捉えているものの、それぞれのマクロファージが異なる前駆細胞に由来する可能性もあり、Fate mapping等の解析が必要である。

これまでに、細胞外ATPに対する受容体を欠損するマウスや阻害抗体投与マウスでは軽症化が報告されている［5, 6]。さらに、神経障害因子として作用する細胞外ATPの放出に関わるチャネル分子の発現が筋層マクロファージで増加していることが本研究から見出されている。よって、ATP受容体のみならずATP放出チャネルの機能阻害も新たな炎症性腸疾患に対する創薬ターゲットとして期待される。今後、腸炎発症時の筋層マクロファージの機能的変化を制御し、炎症反応の増幅のみならず神経障害を同時に抑えることが、腸炎の増悪化を防ぐ方策の一つになり新たな治療法の基盤となると考えられる。現在その詳細について解析を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に関しましては、東京大学医科学研究所粘膜免疫学部門の清野宏特任教授に深く御礼申し上げます。また、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1) Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. Annu Rev Immunol. 2017 Apr 26;35:119-147. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052424. Epub 2017 Jan 11. Review.

2) Margolis KG, Gershon MD. Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. Trends Neurosci. 2016 Sep;39(9):614-624. doi: 10.1016/j.tins.2016.06.007.

3) Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, Mortha A, Leboeuf M, Li XM, Mucida D, Stanley ER, Dahan S, Margolis KG, Gershon MD, Merad M, Bogunovic M. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. Cell. 2014 Jul 17;158(2):300-313. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.050.

4) Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, Muruve DA, McKay DM, Beck PL, Mawe GM, Thompson RJ, Sharkey KA. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. Nat Med. 2012 Mar 18;18(4):600-4. doi: 10.1038/nm.2679.

5) Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. Nat Commun. 2012;3:1034. doi: 10.1038/ncomms2023.

6) Burnstock G, Jacobson KA, Christofi FL. Purinergic drug targets for gastrointestinal disorders. Curr Opin Pharmacol. 2017 Dec;37:131-141. doi: 10.1016/j.coph.2017.10.011.