

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	MHC class II制御異常による炎症性疾患の探索 —新たな炎症性腸疾患発症メカニズムの探索—	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①炎症性腸疾患 ②MHC class II ③制御性T細胞		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医 病 原 微 生 物 学 部 学	主 任 教 授	研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	医 病 原 微 生 物 学 部 学	講 師	免疫細胞解析、動物実験
林 周 平	医 国 際 観 光 医 療 学 部 学	准 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
池 内 浩 基	医 消 化 器 外 科 学 部 学 (炎症性腸疾患外科)	主 任 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
池 田 正 孝	医 消 化 器 外 科 学 部 学 (下部消化管外科)	主 任 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
孫 安 生	医 病 原 微 生 物 学 部 学	助 教	免疫細胞解析、動物実験

# MHC class II 制御異常による炎症性疾患の探索

## — 新たな炎症性腸疾患発症メカニズムの探索 —

### 1. 研究の目的

炎症性腸疾患 (IBD) に代表される炎症性疾患の原因に T 細胞の異常活性化が注目されており、その観点からの治療法開発が進められている。発症原因として、CD4<sup>+</sup>T 細胞のサブセットのひとつである Th17 細胞が異常分化した病原性 Th17 細胞の出現に注目が集まっている。Th17 細胞の分化は、腸管に存在する CD XX<sup>+</sup>DC の MHC class II (MHC II) を介した抗原提示によって分化誘導・維持される iTreg により制御されていることから、CD XX<sup>+</sup>DC における MHC II の発現異常による iTreg の分化・維持の異常が病原性 Th17 細胞の出現に関与すると考えられる。我々は、MHC II の発現をユビキチン化によって制御する MARCH-I を見出し、その生理学的機能の解析を行っている中で、(1) 腸管にて iTreg を誘導する CD XX<sup>+</sup>DC (粘膜固有層にて抗原を取り込み腸間膜リンパ節に運ぶ樹状細胞) において、MHC II の発現をユビキチン化により抑制する MARCH-I の発現が、CD XX<sup>+</sup>DC と比較して抑制されており、MHC II の発現が亢進していることを見出した。(2) CD XX<sup>+</sup>DC を含むすべての抗原提示細胞の MHC II の発現低下によって、病原性 Th17 細胞が出現し、炎症性腸疾患が起こることを見出した。(3) IBD 患者腸間膜リンパ節の CD XX<sup>+</sup>DC の MHC II の発現が抑制されていた。これらの結果をもとに、CD XX<sup>+</sup>DC の MHC II 発現亢進の異常による病原性 Th17 細胞依存性大腸炎の発症を提唱するに至った。したがって、IBD 発症機構に関する新たな仮説を検証し、治療戦略への道を開くことを本研究の目的とする。具体的には次の 3 つの目的をもって進める。

- ① CD XX<sup>+</sup> DC の MHC II 発現亢進による腸内環境維持への関与を明らかにする。
- ② CD XX<sup>+</sup> DC における MARCH-I の発現抑制機構の解明と、抑制機構のブロックによる iTreg の異常および病原性 T 細胞依存性大腸炎発症に関する検討をする。
- ③ IBD 患者の腸間膜リンパ節の CD XX<sup>+</sup> DC での MHC II 発現異常の分子機構を解明する。

### 2. 研究の計画

- (1) CD XX<sup>+</sup> DC の MHC II 発現亢進による腸管環境維持への関与の検討
  - ① CD11c-cre:Y flox マウスと c-MIR Tg の骨髄キメラマウスを作製することで、腸管における CD XX<sup>+</sup> DC のみにて、MHC II 亢進が抑制されているマウスを作製する。本骨髄キメラマウスを用いて、腸間膜リンパ節での iTreg の異常、腸管炎症を検討する。
- (2) CD XX<sup>+</sup> DC における MARCH-I の発現抑制機構の解明と、抑制機構のブロックによる iTreg の異常および病原性 T 細胞依存性大腸炎の発症に関する検討
  - ① MARCH-I 発現制御機構の解明  
GM-CSF にて骨髄細胞から作製した樹状細胞を用いて、LPS、IL-10 の刺激により MARCH-I の発現を検討する。それをもとに、シグナル抑制剤を用いて発現制御機構の推測を行う。
- (3) IBD 患者の腸間膜リンパ節の CD XX<sup>+</sup> DC での MHC II 発現異常の分子機構の検討
  - ① IBD 患者の腸間膜リンパ節と早期大腸がん患者の腸間膜リンパ節を採取し、CD XX<sup>+</sup> DC における MHC II の異常に関連する T 細胞の異常について詳細に検討する。

### 3. 研究の成果

- (1) CD XX<sup>+</sup> DC の MHC II 発現亢進による腸管環境維持への関与の検討  
c-MIR Tg と CD11c Cre:Y flox/flox マウスとの骨髄 mixed chimera マウスを作製し、樹状細胞の中で CD XX<sup>+</sup>DC のみにて c-MIR によって MHC II のユビキチン化の抑制がキャンセルされているマウスを作製した。作製した骨髄キメラマウスの腸間膜リンパ節において、iTreg が減少し、病原性 Th17 細胞の増加を伴う炎症性腸疾患が発症した。これらのことから、CD XX<sup>+</sup>DC における MARCH-I の発現抑制による MHC II 安定化が iTreg を腸管内にて誘導し恒常性の維持に関与している可能性が強く示唆された。  
さらに、マウス腸間膜リンパ節での CD XX<sup>+</sup>DC にて MARCH-I の拮抗分子である CDZZ の発現が顕著に亢進していることを見出した。これらのことから、CD XX<sup>+</sup>DC において、MARCH-I の転写レベルにて抑制されていることと、CDZZ の発現亢進による MARCH-I の機能抑制 (すなわち

MHCIIのユビキチン化機能) の2つの抑制によって、MHC IIによる抗原提示が安定化され、iTregが誘導されていると考えられた。そこで、CDZZをDCのみにて欠損するマウスを作製し、MHC IIの発現を検討した。予想通りに、CDZZを発現しているCD XX<sup>+</sup> DCにのみにてMHC IIの発現抑制が認められた。

(2) CD XX<sup>+</sup> DCにおける MARCH-I の発現抑制機構の解明と、抑制機構のブロックによる iTreg の異常および病原性 T 細胞依存性大腸炎の発症に関する検討

①MARCH-I発現抑制機構の解明

LPSとIL-10によるMARCH-Iの発現制御による仮説（LPSによるNF-κB, IL-10によるSTAT3がMARCH-Iの発現制御の観点にて拮抗しているとの仮説）を検証するために、それぞれの刺激によるMHC II発現変化を観察し、予想通りの結果を得た。さらに、IL-10の下流であるSTAT3の関与を検討するために、同じSTAT3が関与するIL-6がLPSによるMHC II亢進作用を抑制できるかを検討した。その結果、IL-6は抑制することが出来なかった。したがって、LPSによるMARCH-Iの発現制御に焦点を絞り、LPSの下流であるNF-κBの関与をIKKγ (NEMO) のblockerであるMG132あるいはIKKi VIIの前処理によって検討した。その結果、LPSによるMARCH-Iの抑制が部分的に解除された。これらのことから、NF-κBがMARCH-Iの抑制に関与しており、STAT3は制御に関与していない可能性が示された。

(3) IBD 患者腸間膜リンパ節の CD XX<sup>+</sup> DC での MHC II 発現異常の分子機構の検討の解析

IBD患者での腸間膜リンパ節におけるCD XX<sup>+</sup>DCの機能が低下している（MHC II発現低下による抗原提示機能の低下）ことが推測されることから、IBD患者の腸間膜リンパ節におけるiTregの検討を行った。その結果、機能的マーカーであるFoxp3の発現が低下傾向にあることを見出した。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) CDXX103<sup>+</sup> DC の MHC II 発現亢進による腸管環境維持への関与の検討

2023年6月の段階において、腸管恒常性において、新たな抗原提示細胞がNatureに報告された。この細胞は現在我々が注目している細胞とは異なっている。したがって、現在の方向性に加えて、新規に発見された細胞についてのMHC II発現制御、そして、MARCH-Iの発現状況についての検討も合わせて行っていくことを念頭に入れる必要がある。さらに、現在注目している細胞が、いくつかのグループから腸管におけるiTregの誘導に関連していない可能性についても報告がなされている。このように、現在、かなりホットな研究領域となっており、最新の情報を掴みながら、研究を進める必要がある。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし