

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	①MHC class II ②制御性T細胞 ③CD103陽性樹状細胞 ④E3ユビキチンリガーゼ		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医学部 病原微生物学	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 学 部 病 原 微 生 物 学	講 師	免疫細胞解析、動物実験
林 周 平	医 学 部 国 際 観 光 医 療 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 学 部 消 化 器 外 科 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 学 部 消 化 器 外 科 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 学 部 病 原 微 生 物 学	講 師	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

(1)腸管の CDXX⁺ dendritic cell (DC)の MHC class II 発現が亢進していること、(2)CDXX⁺ DCにおいて、MARCH-I の発現抑制と、MARCH-I 関連分子である YYY の発現が認められること、(3)CDXX⁺ DCにおけるユビキチン化抑制による MHC II 発現亢進を、MARCH-I ホモログである c-MIR を恒常的に発現させることによってキャンセルすると、Th17 細胞依存性大腸炎が出現すること、(4)MARCH-I の発現抑制は NF-κB に一部依存していること、(5)IBD 患者の腸間膜リンパ節 CDXX⁺ DC の MHC II 発現が低下しており、腸間膜リンパ節の iTreg の活性化が低下していることを見出した。

これらのことから、昨年度に提唱した仮説にさらに YYY の関与の仮説を追加し検証をおこなう。すなわち、CDXX⁺ DC は、MARCH-I の発現抑制のみではなく、YYY が発現することによって MHC II のユビキチン化を抑制させ、MHC II による抗原提示を安定化させることによって、iTreg を誘導し、腸管恒常性の維持を行っており、その破綻によって、IBD が発症するとの仮説である。したがって、MARCH-I と YYY の発現制御の観点から、MHC II 制御異常による炎症性腸疾患発症メカニズムの探索を目的とした。

2. 研究の計画

(1)YYY 発現による MARCH-I 抑制を介した MHC II ユビキチン化抑制の iTreg 分化・維持への関与とその破綻による腸炎発症の可能性の検討：

DC にて YYY が欠損しているマウスにて、iTreg の異常、Th17 依存性腸炎の発症を検討する。さらに、CD11c-Cre:XX flox/flox マウスとの mixed chimera を作成し、CDXX⁺ DC 特異的に YYY を欠損させ同様の検討を行う。

(2)MARCH-I 発現制御における NF-κB の関与の検討：

MARCH-I promoter の NF-κB 結合候補領域の情報を基に Chip-qPCR あるいは Chip-seq による結合領域の同定、さらには、NF-κB シグナル関連分子に関する遺伝子改変マウスを用いて検討する。

(3)マウス粘膜固有層と腸間膜リンパ節における CDXX⁺ DC の single cell RNAseq(sc-RNAseq)による NF-κB 活性化機構の解明：

リンパ節への遊走に関連する NF-κB 活性化の確認を single cell レベルにて行い、その pathway の詳細を明らかにする。

(4)IBD 患者における腸管 CDXX⁺ DC の single cell RNAseq による MHC II 制御関連因子に関する解析：

IBD 患者の CDXX⁺ DC と早期大腸がん患者を、(3)と同様の手法にて解析し、MARCH-I を含む MHC II 制御関連分子の異常の同定を試みる。

3. 研究の成果

(1)YYY 発現による MARCH-I 抑制を介した MHC II ユビキチン化抑制の iTreg 分化・維持への関与とその破綻による腸炎発症の可能性の検討：

DC にて YYY が欠損し、MARCH-I 機能亢進による MHC II 異常が認められる CD11c-Cre:YYY flox/flox にて、iTreg の異常について検討を通常の 8 週齢マウスにて検討を行った。しかしながら、iTreg の減少が認められなかった。この検討を行なっている中で、Nature にて、新たに発見された RORγt⁺ CD11c⁺ DC が離乳において iTreg を誘導しているとの報告がなされた。そこで、8 週齢ではなく 4 週齢において、YYY 欠損の影響を検討した。しかしながら、8 週齢での検討と同様に、iTreg の減少はみとめられなかった。

(2)MARCH-I 発現制御における NF-κB の関与の検討：

2022 年度に得られた抑制剤による検討結果を検証するため、TNF-α と Z (NF-κB シグナル

の根幹分子) の double 欠損マウスを導入した。Z のみの欠損であると DC が TNF- α の過剰発現によってアポトーシスをおこし、検討する事が困難であると考えられたため、double 欠損マウスのコロニーを現在作製中である。

(3) マウス粘膜固有層と腸間膜リンパ節における CDXX+ DC の single cell RNAseq(scRNAseq) による NF- κ B 活性化機構の解明、および(4) IBD 患者における腸管 CDXX+ DC の scRNAseq による MHC II 制御関連因子に関する解析：

本解析を行うにあたって、2022 年 Nature 誌に腸管での iTreg 誘導 DC として RORgt+ CD11c+ Itgb8+ DC であり、CDXX+ CD11c+ DC ではないとの報告がなされた(Nature 2022 Oct;610(7933):752-760)。さらに、RORgt+ DC の MHC II の抑制が IBD のひとつである、若年性 Crohn's disease にてみとめられるとの報告がなされた(Nature 2022 Oct;610(7933):752-760)。したがって、我々が持つ成人 IBD 患者の腸間膜リンパ節の DC における MHC II の発現を検討した。その結果、RORgt+ DC では MHC II の抑制はみとめられず、RORgt- CD11c high DC にて MHC II の抑制をみとめた。Nature での報告は、離乳期における iTreg の誘導に RORgt+ DC が関わっており、CDXX+ DC は adult においても関与していないとの報告であることから、adult にておいて、CDXX+ DC とは異なる DC が腸管 iTreg の誘導に関与している可能性があると考えられた。

4. 研究の反省・考察

我々は、本 grant のサポートを受け、遺伝子改変マウスの解析から、CD11c+ Itgb8+ DC の MHC II の発現制御異常によって病原性 Th17 細胞が出現し、腸炎が発症することを見出したことから、IBD 発症に MHC II の発現異常が関与している可能性を見出している。さらに、研究開始当初、腸管において iTreg (末梢にて誘導される制御性 T 細胞) を誘導すると考えられていた CDXX+ CD11c+ Itgb8+ DCs において MHC II のユビキチンリガーゼである MARCH-I の発現が抑制されていることをマウスにて見出したことから、CDXX+ CD11c+ Itgb8+ DCs での MARCH-I 抑制による MHC II の安定化によって iTreg が誘導・維持され、腸管での免疫異常活性化を制御しているのではと考えていた。事実、IBD 患者の腸間膜リンパ節における CDXX+ DC では MHC II の発現が抑制されていることを見出していた。

しかしながら、2022 年に Nature において、我々が検討している Itgb8+ CDXX+ CD11c+ DC ではなく、RORgt+ Itgb8+ CD11c+ DC が iTreg の誘導に関与しており、さらにその MHC II の異常によって IBD が発症している可能性についての報告がなされた(Nature 2022 Oct;610(7933):752-760)。また、RORgt+ Itgb8+ CD11c+ DC は離乳期に出現することによって、iTreg の誘導による免疫寛容は成長初期に確立するとの報告がなされた。しかしながら、我々の検討では、RORgt+ CD11c+ DC ではなく、Itgb+ DC を含む CD11c high RORgt- DC にて MHC II 発現抑制を見出した。Nature の報告では、RORgt- CD11c+ DC の詳細な検討がなされていないこと、Itgb は様々な DC に発現している iTreg の誘導因子であることから、CDXX+ DC 以外の CD11c high DC の中で Itgb を発現している DC における MHC II 発現抑制が IBD 発症に関与している可能性が挙げられた。これらの細胞集団をさらに検討することによって、MHC II 異常による炎症性腸疾患発症機構の提唱を進めたいと考えている。

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