

炎症性腸疾患患者における免疫寛容破綻メカニズムの解明

大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 消化器外科学

荻野 崇之

1.緒言

炎症性腸疾患（IBD）患者は世界的に増加傾向にあるが、病因は未だに不明であり根本的治療も確立していない。正常腸管では免疫細胞は異物を認識し攻撃する一方で、自己に有益な腸内細菌や食餌に対しては反応しない免疫寛容の状態を保つことで腸管恒常性が維持されている。腸管における免疫寛容機構の破綻により過剰免疫応答が惹起され、腸管炎症が生じていることがIBDの病態であると考えられる。

これまで免疫寛容機序は明らかではなかったが、近年の研究でマウス腸管における3型自然リンパ球（group 3 innate lymphoid cell: ILC3）が炎症性T細胞による自己腸内細菌に対する過剰免疫応答を制御していることが報告された¹⁾。ILCは近年新たに同定されたリンパ球サブセットで、T細胞やB細胞と異なり抗原受容体を持たず、自然免疫を担当するリンパ球である。発現する転写因子と産生するサイトカインによりILC1, ILC2, ILC3に分類される。腸管粘膜にはILC3が豊富に存在しており、サイトカイン等の刺激により速やかに反応し、免疫細胞や上皮細胞、間質細胞に作用することで、組織恒常性維持に貢献している²⁾。腸管に存在するILC3が様々な疾患に関与することが示唆されてきているが、IBDにおける役割を詳細に解析した報告はない。本研究ではIBDの病因および病態に関与する免疫寛容破綻メカニズムをILC3に着目して解析を行った。

2.方法

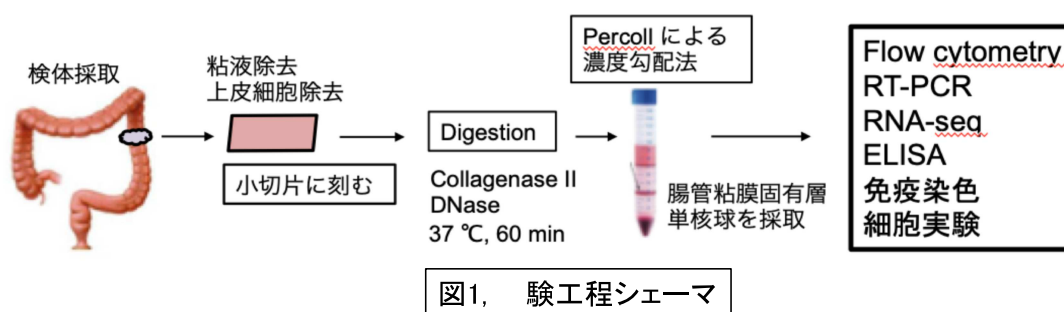
同意の得られたIBD患者、大腸癌患者の手術検体を用いて以下の解析を行った。

(1) 大腸癌手術切除症例の正常粘膜部から検体を採取した。検体から粘膜固有層を採取した後、digestion（Collagenase II, DNase）を行い、Percoll濃度勾配法を用いて粘膜固有層単核球（LPMC）を採取した（図1）。flow cytometryでは、既知の各種免疫細胞の代表的な表面抗原マーカー（CD3, CD4, CD14, CD16, CD19, CD20, CD25, CD45, CD56, CD127）およびILC分画関連マーカー（NKp44, Nkp46, CD94, CD161, CCR6, HLADR等）を用いて細分化することでILC分画を展開した。

(2) (1)で同定した各分画の細胞数・割合の比較を行った。各分画におけるILC関連の転写因

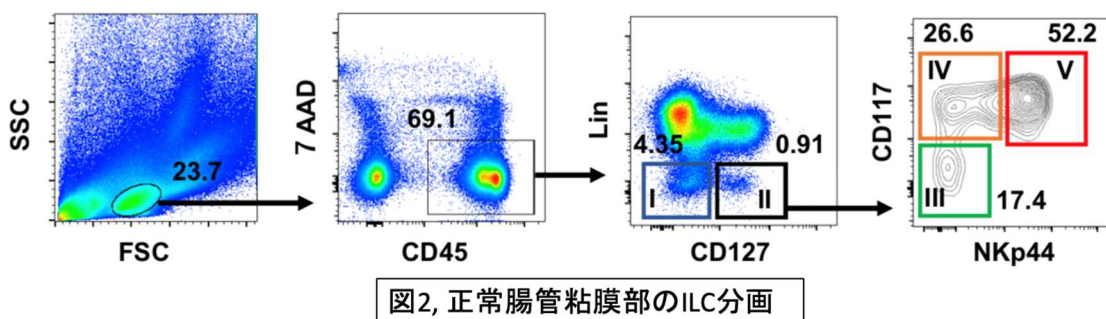
子 (*Rorc*, *Tbx21*, *Gatta3*) やサイトカイン (*Il22*, *Ifng*, *Tnf*, *Il17*, *Csf2*等) の遺伝子発現を RNA-Seqを用いて行い、RT-PCRでさらに検証した。また単離した細胞のMay-Giemsa染色を行い、形態学的評価を行った。

(3) IBD手術切除症例の炎症部および非炎症部粘膜部から検体を採取した。検体から粘膜固有層を採取した後、digestion、Percoll濃度勾配法を行いLPMCを採取した。各種表面抗原マーカーを用いてflow cytometryを行うことでIBD腸管におけるILC分画を展開した。正常粘膜とIBD腸管粘膜における、各分画の細胞数・割合の比較を行った。



3.結果

ヒト正常大腸粘膜に存在するILCについて解析を行った。大腸癌患者の手術検体を用いて、正常粘膜部の粘膜固有層より細胞を採取しflow cytometryにてILC分画を展開した (図2)。



RT-PCR解析において、サブセットIIIはILC1のマスターレギュレーターであるTBX21を発現していた。RNA-seq解析ではTBX21発現はサブセットIIIに限定されており、他サブセットと比較してIFNGを強発現しており、このサブセットがILC1であることが示された。一方でRT-PCRではサブセットIVおよびサブセットVは共にILC3に特異的に発現するRORCを高発現していたが、異なるパターンの遺伝子発現を示した (図3)。ILC3関連サイトカインに関しては、IL17AはサブセットIVで高度に発現し、IL22の発現はサブセットVで高く、サブセットVは、LTA、LTB、TNF、CXCR5、ITGB1、ITGAL、NRP1など、新生児期のリンパ組織形成に関連するいくつかの遺伝子を発現していた。これらの結果よりサブ

セットIVとVがILC3の異なるサブポピュレーションであることを示唆しており、サブセットIVをNKp44⁻ ILC3、サブセットVをNKp44⁺ ILC3とそれぞれ定義した（図3）。

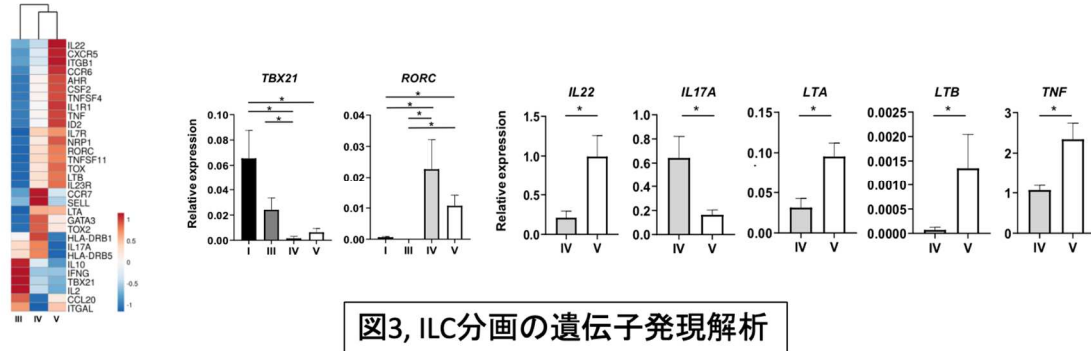


図3, ILC分画の遺伝子発現解析

正常大腸には、ILC1、NKp44⁺/NKp44⁻ ILC3が存在しており、ILC2はこれらと比較し非常に少ない分画であった。この中で、NKp44⁺ ILC3が正常大腸に最も多く存在するILC分画であった。またILC1、NKp44⁺/NKp44⁻ ILC3はリンパ球様の単核球であった（図4）。

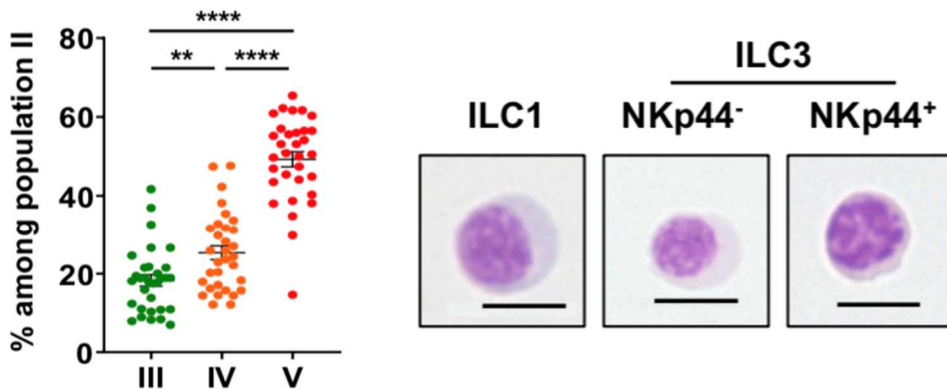


図4, 各ILC分画の割合と形態学的評価

次に、IBD手術切除症例の炎症部および非炎症部粘膜部から検体を採取してILC分画を解析した。潰瘍性大腸炎患者の非炎症部腸管では正常粘膜と同様にILC1、NKp44⁺/NKp44⁻ ILC3が存在していた。しかしクローン病患者の腸管においては炎症部だけでなく、非炎症部においてもNKp44⁺ ILC3の著明な減少を認めており（図5）、ILC3がその病態に関わっている可能性が示唆された。

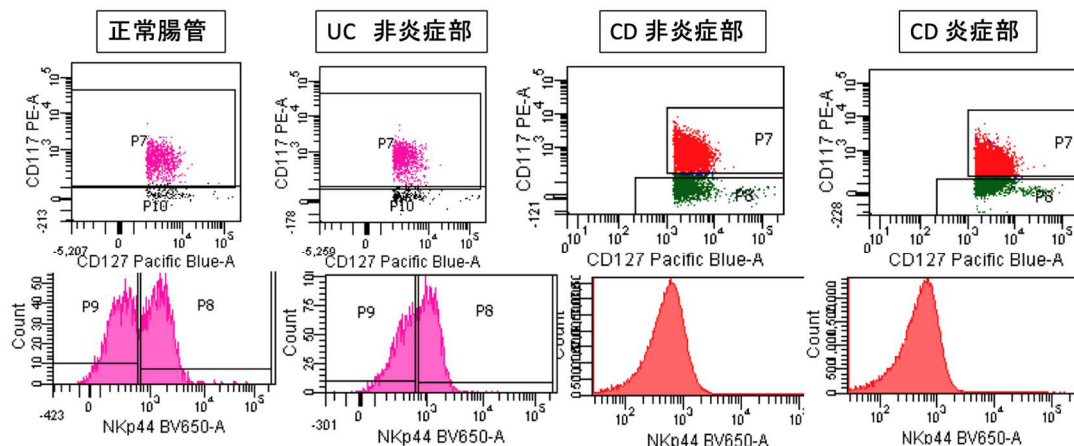


図5, IBD腸管におけるILC分画

4.考察

ヒト大腸癌組織には正常大腸粘膜と同様のILC分画が存在していた。正常大腸において、NKp44⁺ ILC3が主要なILC分画であり、リンパ組織誘導に関与する遺伝子を高発現していた。クローン病患者の腸管粘膜ではNKp44⁺ ILC3は減少していた。NKp44⁺ ILC3がリンパ組織誘導を介してクローン病の病態に関与している可能性が示唆された。

5.結語

クローン病患者の腸管粘膜では正常腸管と比較してNKp44⁺ ILC3は減少していた。なお、本研究成果の一部は2020年にCancer Immunology Researchに報告している³⁾。

6.文献

- 1) Hepworth MR, Fung TC, Masur SH, Kelsen JR, McConnell FM, Dubrot J, et al. Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells. *Science* 2015;348:1031–5.
- 2) Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054-66.
- 3) Ikeda A, Ogino T, Kayama H, Okuzaki D, Nishimura J, Fujino S, et al. Human NKp44⁺ group 3 innate lymphoid cells associate with tumor-associated tertiary lymphoid structures in colorectal cancer. *Cancer Immunol Res*. 2020. doi: 10.1158/2326-6066.