

図2 腸管粘膜における樹状細胞・マクロファージサブセット

腸管粘膜には獲得免疫誘導に働く典型的樹状細胞が存在する一方で制御性T細胞を誘導し、炎症抑制に働く抑制性樹状細胞サブセットも存在する。典型的腸管マクロファージは自身からのIL-10産生や制御性T細胞誘導を介して炎症抑制的に働く。クローン病腸管粘膜に認められる樹状細胞様マクロファージサブセットはIL-23の産生を介し、肉芽腫形成やTh1/Th17型免疫誘導に関与していると考えられる。

これは、ヒト腸管におけるIL-23産生細胞として樹状細胞とマクロファージの両方の特徴をもつユニークなミエロイド系細胞を発見した(論文投稿中)。本細胞はミエロイド系細胞マーカーであるCD13, CD33を発現しており、さらにマクロファージマーカーであるCD14, CD68, 樹状細胞マーカーであるCD205, CD209を発現していた。本細胞はCD11b, CD11c, HLA-DRなども高発現していた。単離した本サブセットはマクロファージ様の形態を示し、ナイーブT細胞に対する抗原提示能は有していなかった。また、本細胞は典型的な腸管マクロファージであるCD14-CD33+細胞と比較して、腸内細菌抗原刺激により多量の炎症性サイトカインIL-23, TNF- α , IL-6を産生した。したがって、本細胞サブセットは樹状細胞の形質を有する、腸管特異的なマクロファージサブセットであると考えられる(図1)。興味深いことに、本細胞サブセットはクローン病患者炎症部粘膜では有意に増加していた。さらに、このクローン病腸管粘膜における樹状細胞様マクロファージサブセットは、健康人対照者、お

よび潰瘍性大腸炎患者由来の同サブセットに比べて、腸内細菌抗原刺激により、多量のIL-23を産生した。最近、Mizoguchiらによりマウス腸管において肉芽腫形成にかかわるユニークな樹状細胞サブセットが同定された²⁷⁾。本サブセットは肉芽腫性炎症部位に集積しており、樹状細胞マーカーのCD11cを発現していた。しかしながら、共刺激因子であるCD86の発現は低く、T細胞に対する抗原提示能を有しておらず、逆に強い貪食能を示した。興味深いことに、この樹状細胞サブセットは同時にマクロファージのマーカーであるF4/80を発現していた。このように、マウスの腸管に存在する樹状細胞とマクロファージの両方の形質をあわせもつ特殊なミエロイド細胞は、腸内細菌依存性に多量のIL-23を産生することで肉芽腫形成に寄与していると考えられる。われわれの同定したヒト樹状細胞様腸管マクロファージサブセットは、Mizoguchiらの報告したマウス腸管における肉芽腫形成細胞に酷似しており、ヒトにおける肉芽腫形成においても重要な役割を果たしていると考えられる。腸管にお

ける肉芽腫形成はクローン病の典型的な病像であり、本サブセットのクローン病病態への関与が強く示唆される。興味深いことに、この腸管特異的な樹状細胞様マクロファージは、腸内細菌刺激によりIL-23を高産生する一方、Th1型免疫反応の誘導にかかわるIL-12は産生しない。しかしながら、本細胞分画を除去した粘膜単核細胞は、腸内細菌刺激により誘導されるIFN- γ の産生が減少することから、本細胞から産生されるIL-23がIFN- γ を主体とするTh1型免疫にも関与していることが示唆される。事実、クローン病患者由来腸管CD4⁺T細胞をIL-23で刺激するとIL-17のみならずIFN- γ の産生も誘導される(論文投稿中)。すなわち、クローン病腸管におけるこの特殊な樹状細胞様マクロファージサブセットは、IL-23を介してTh1型およびTh17型免疫反応の両方を活性化することで、クローン病の慢性腸管炎症の発症、持続に関与している可能性がある。

おわりに

以上のように、腸管には炎症反応の誘導にかかわる樹状細胞やマクロファージサブセットと炎症抑制に働くサブセットの両方が存在しており、それらが複雑に制御しあうことで、腸管における生体防御や恒常性維持を行っていると考えられる(図2)。また、その恒常性維持機能の破綻は、クローン病などの炎症性腸疾患(IBD)をはじめとする慢性の腸管炎症の原因となる。近年の研究により、クローン病の病態における鍵となる因子として、腸管特異的な樹状細胞やマクロファージから産生される過剰なIL-23の関与がしだいに明らかになってきた。しかしながら、クローン病では必ずしもTh17優位になっているわけではなく、IFN- γ 産生を主体とするTh1型免疫が亢進しているのも事実である。このように、IL-23がクローン病におけるTh17型、およびTh1型免疫反応にどのように関与しているかは不明な点も多く残されており、今後解明すべき課題であると考えられる。

文 献

1) Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, et al. Abnormally differentiated subsets of intestinal macroph-

- age play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J Immunol* 2005 ; 175 : 6900.
- 2) Denning TL, Wang YC, Patel SR, et al. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1086.
- 3) Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 507.
- 4) Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004 ; 21 : 527.
- 5) Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007 ; 317 : 256.
- 6) Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1757.
- 7) Sun CM, Hall JA, Blank RB, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote *de novo* generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1775.
- 8) Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, et al. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1765.
- 9) Saurer L, McCullough KC, Summerfield A. *In vitro* induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid. *J Immunol* 2007 ; 179 : 3504.
- 10) Niederreither K, Fraulob V, Garnier JM, et al. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev* 2002 ; 110 : 165.
- 11) Szatmari I, Pap A, Ruhl R, et al. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 2351.

- 12) Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007 ; 448 : 427.
- 13) Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996 ; 157 : 1261.
- 14) Matsuoka K, Inoue N, Sato T, et al. T-bet up-regulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 2004 ; 53 : 1303.
- 15) Schmidt C, Giese T, Ludwig B, et al. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease : elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005 ; 11 : 16.
- 16) Steinman L. A brief history of T_H17, the first major revision in the T_H1/T_H2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007 ; 13 : 139.
- 17) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T_H17 lineage. *Nature* 2006 ; 441 : 231.
- 18) Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 950.
- 19) Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003 ; 421 : 744.
- 20) Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 1951.
- 21) Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* 2006 ; 176 : 7768.
- 22) Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1310.
- 23) Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006 ; 314 : 1461.
- 24) Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003 ; 52 : 65.
- 25) Ogawa A, Andoh A, Araki Y, et al. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* 2004 ; 110 : 55.
- 26) van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007 ; 27 : 660.
- 27) Mizoguchi A, Ogawa A, Takedatsu H, et al. Dependence of intestinal granuloma formation on unique myeloid DC-like cells. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 605.

* * *

巻頭言

日比 紀文*

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis ; UC) とクローン病 (Crohn's disease ; CD) は原因不明の難治性炎症性腸疾患であり、その病因については遺伝的、細菌学的、食事を含めた環境的素因のほか、免疫異常が関与すると考えられている。治療法はサラゾスルファピリジンに始まり、1950年代に Truelove によって報告された副腎皮質ホルモンを用いた治療法、さらにアザチオプリン (AZA)、6-メルカプトプリン (6-MP) やシクロスポリンなどの免疫調節剤による治療法の開発が行われるようになり、そして最近では分子生物学の進歩による病態解明が進み、インフリキシマブを中心とした生物製剤が炎症性腸疾患に使用されるようになってきている。

炎症性腸疾患に対する免疫抑制剤の歴史は古く、そもそも抗癌剤として使用されていた薬剤が、強力な免疫抑制作用をもつことが知られるようになり、免疫異常と考えられていた炎症性腸疾患に使用されるようになった。欧米では1960年代に使用され、われわれの施設でも1973年に炎症性腸疾患に対し6-MPの投与を開始した。以来30年以上が過ぎ、近年ようやく本邦においても炎症性腸疾患に対しアザチオプリンが保険適用となり、ステロイド依存性の難治例や緩解維持目的に免疫抑制剤が使用できるようになっている。

免疫抑制剤には6-MPとAZAがあり、AZAは経口投与され吸収されると赤血球中のグルタチオンにより切断され、活性型の6-MPとなる。これらは核酸の合成を阻害することにより免疫抑制効果を発揮する薬剤である。CDについては緩解維持効果、ステロイド減量効果、瘻孔改善に有用であることが報告されている。また、プラセボ試験を行った五つの臨床試験319例のデータを解析したメタアナリシスでは緩解維持効果、ステロイド減量効果が証明されている。UCについても緩解維持、ステロイド減量目的に使用することが多い。一方でCDに比べメタアナリシスされた報告例がなく、プラセボを用いた研究がわずか七つで、うち80人以上を用いた論文がなく30症例以下の論文が含まれていること、

Toshifumi Hibi

*慶應義塾大学医学部消化器内科

1 施設からの報告例も多いこと、二つの論文はアジアからの報告例であることより、エビデンスはCDに比べて劣ることは否めない。しかし、本来チオプリン製剤は効果発現が緩徐であるという薬理機序よりステロイド減量、緩解維持目的に使用するのが望ましく、適応を考慮すればUC、CDともに十分治療効果が期待できる薬剤と考えられる。

本邦においてチオプリン製剤は保険外適用の薬剤であり、一般的に使用することは困難な状況であった。しかし、厚生労働省の外郭団体であるヒューマンサイエンス財団の事業として保険認可を目標とした多施設共同研究が行われ、チオプリン製剤のおもに安全性が確認され、また90%の症例で6カ月緩解維持が可能であることが示された。この研究結果をもとに保険認可への働きかけがなされ、現在AZAがUC、CDの難治例に対して保険適用されるに至っている。

近年の免疫抑制剤の動向としては、インフリキシマブが炎症性腸疾患に対する新しい治療として登場したことが特記される。このことは、これまで30年以上にわたって使用されてきた6-MP、AZAの存在意義について今後議論されていくと考えられる。すなわち、インフリキシマブとチオプリン製剤を併用した例できわめてまれなT細胞リンパ腫が出現していることや、インフリキシマブ単独でもCDに対する治療効果があることが今年のアメリカ消化器病学会で報告されていることより、6-MP、AZAの適応、位置づけについては大きく変わっていく可能性もある。

本特集では6-MP、AZAの薬物動態、緩解導入、緩解維持効果、副作用、妊娠に対する影響など、多岐にわたる内容を第一線の専門の先生が詳細に説明してくださっている。いずれも臨床に則した内容であり、本特集が6-MP、AZA使用する多くの先生方のバイブルになることを願っている。

IL-10 産生性抑制性腸管マクロファージの特殊性と IBD 治療へのアプローチ

鎌田信彦* 久松理一* 日比紀文*

正常腸管マクロファージはインターロイキン (IL)-10 高産生の抑制性マクロファージであり、腸内細菌への過剰な免疫反応を制御している。一方、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD)、とくにクローン病やそのモデル動物では腸管マクロファージの免疫制御機能が破綻し、腸内細菌に対し IL-12 や IL-23 といった炎症性のサイトカインを過剰産生する。このように、過剰な免疫応答を引き起こす異常な腸管マクロファージが IBD の病態に深くかかわっていると考えられ、それらの制御が IBD の新たな治療標的となる可能性がある。

はじめに

通常、免疫装置は外界からの侵入者に対して免疫反応を誘導することで外来抗原に対しすみやかに反応、処理することで生体を守っている。しかしながら、つねに食餌抗原や腸内細菌に曝されている腸管粘膜では、それらの抗原に対して過剰な免疫反応を誘導するのは好ましくなく、むしろ恒常性を保つため過剰な免疫反応を抑制していると考えられる。この腸管の低反応性を説明する機序として腸管の自然免疫をつかさどるマクロファージ (Mφ) の特殊性が明らかとなってきた。

IBD と腸管マクロファージ

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD) は大きく潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis : UC) とクローン病 (Crohn's disease : CD) の二疾患に区別される。これら二つの疾患は基本的に独立した疾患概念と考えられている。潰瘍性大腸炎では標的臓器は大腸のみであるのに対し、クローン病では小腸、大腸を含めた全消化管が標的となり、しばしば瘻孔を形成する。クローン病では腸管局所の免疫応答は type 1 helper T cell (Th1) 型にシフトしていることがわかっており、エフェクター細胞は腸管局所の CD4 陽性 T 細胞である。一方、潰瘍性大腸炎での局所の免疫応答の状態は報告により異なっており type 2 helper T cell (Th2) 型にシフトしているという報告もあるがコンセンサスは得られていない。潰瘍性大腸炎、クローン病ともにその病因はいまだ明らかにはなっていないが、遺伝素因、環境因子、免疫応答の異常が複

Key words

- IBD
- 腸管マクロファージ
- IL-10
- IL-12
- IL-23

*KAMADA Nobuhiko, HISAMATSU Tadakazu, Hibi Toshifumi/慶應義塾大学医学部消化器内科

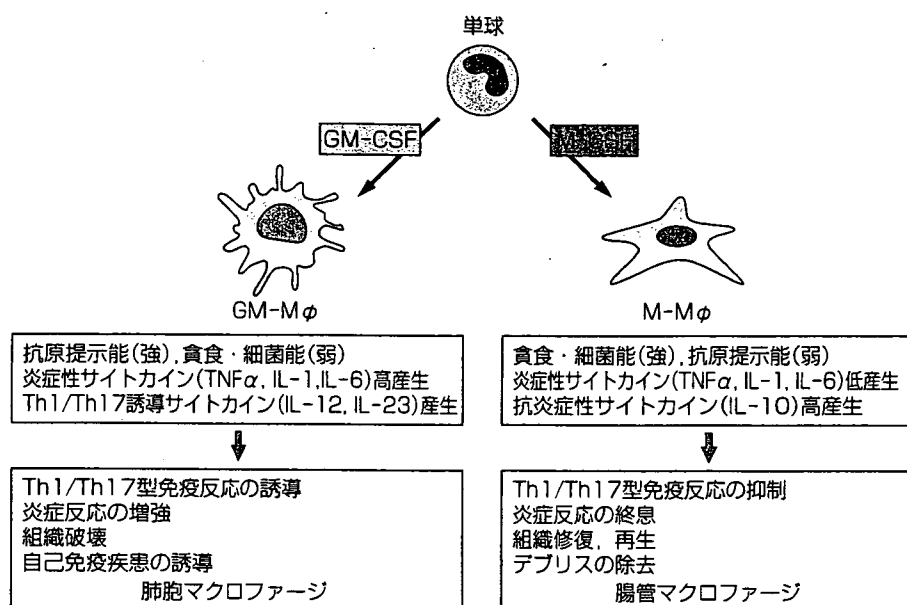


図1 マクロファージの成長因子による機能の違い

マクロファージは成長因子の違いにより異なる二つの phenotype へと分化する。GM-CSF 誘導型の GM-Mφ (Mφ1ともよばれる)は IL-12, 23 高産生な炎症惹起性マクロファージ。一方で、M-CSF 誘導型の M-Mφ (Mφ2ともよばれる)は IL-10 高産生で IL-12, 23 は産生しない炎症抑制性のマクロファージである。腸管は M-CSF 優位の組織であり、抑制性の M-Mφ が分化し常在マクロファージを構築していると考えられる。

雑に関与した多因子疾患であると考えられている。

これまで IBD の病態には前述のように病的にシフトした T 細胞の免疫応答が病態の主体を担っていると考えられてきた。しかしながら、近年、とくにクローン病において Th1 優位な獲得免疫反応の誘導にマクロファージや樹状細胞といったいわゆる自然免疫反応を担う細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。クローン病の腸管局所にはインターフェロン (IFN) γ や IL-2 産生に特徴づけられる Th1 型の CD4⁺ T 細胞が集積している。マクロファージや樹状細胞の産生する IL-12 や IL-18 などの炎症性サイトカインはこれら CD4⁺ T 細胞が産生する IFN γ を強く誘導する¹⁾²⁾。このようにクローン病の病態形成には IL-12/IFN- γ を主体とする Th1 型免疫反応が重要な役割を果たしていると考えられてきた。最近になり、いくつかの Th1 優位な疾患やそのモデルマウスにおいて、むしろ IL-23/IL-17 を主体とする Th17 免疫反応がより病的な意義が高いということが報告されはじめた。実際にクローン病の腸管マクロファージからは IL-12 のみならず、IL-23 も

高産生されるという報告もあり、クローン病の病態において腸管マクロファージから誘導される IL-12/IL-23 の役割も注目されている³⁾⁴⁾。

2. マクロファージの多様性

マクロファージは細菌などの外来抗原に対する自然免疫のおもな担当細胞であり感染防御において重要な役割を果たしている。マクロファージは生体のあらゆる場所に存在しているが、それらは均一な集団ではなく、マクロファージは局在する組織により、クッパー細胞(肝)、肺胞マクロファージ(肺)、マイクログリア(脳)など異なる名称でよばれている。これらのマクロファージは、形態、機能、表面抗原の発現などの点で異なり、マクロファージ特有の抗原を取り込むスカベンジャーとしての役割だけでなく、各組織において固有の働きを担っていると考えられる。このようなマクロファージの多様性は、生体の防御とホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

近年、Akagawa ら⁵⁾の報告により、マクロファージは

分化誘導因子の違いにより相反する機能をもち異なる形態を示す二つのサブセットに分化することが明らかになった。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) により分化誘導される GM-M ϕ は強い抗原提示能を示し、また炎症性サイトカイン IL-12, IL-23 を高産生することで Th1, Th17 型の獲得免疫応答誘導に寄与している炎症性マクロファージであると考えられる。一方で、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) により分化誘導される M-M ϕ は IL-12 や IL-23 をまったく産生せず、反対に炎症抑制性サイトカインである IL-10 を高産生し抗炎症的に働く抑制性 M ϕ であると考えられる (図 1)。

これらマクロファージサブセットの生体局所での働きについてはいまだ不明な部分も多いが、これまでに GM-M ϕ の生体内での働きが明らかとなっている。前述の肺胞マクロファージは *in vitro* で得られた GM-M ϕ と酷似した性質を示し、肺胞感染に対してすみやかに IL-12 を誘導することで免疫反応を惹起し、感染防御に寄与している⁶⁾。事実、GM-CSF 欠損マウスでは肺胞に異常が認められることが報告されている⁷⁾。

このように、これらのマクロファージサブセットは、おのおの細菌感染などの外来抗原刺激に対し Th1, Th17 型の獲得免疫反応を誘導することや、免疫反応を抑制することで感染防御や免疫制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

3 腸管マクロファージの特殊性

前述のように、マクロファージは細菌などの外来抗原に対する自然免疫のおもな担当細胞であり感染防御において重要な役割を果たしている。しかしながら、消化管は病原体や食餌抗原などの外来抗原に恒常的に曝露されている。マクロファージは通常、外界からの侵入者に対して免疫反応を誘導することで外来抗原に対しすみやかに反応、処理することで生体を守っている。しかしながら、つねに食餌抗原や腸内細菌に曝されている腸管粘膜では、それらの抗原に対して過剰な免疫反応を誘導するのは好ましくなく、むしろ恒常性を保つため過剰な免疫反応を抑制的に制御する機構が存在すると考えられる。

近年、われわれの研究により、マウス正常腸管では M-CSF が優位に発現していることが明らかになった⁸⁾。また、M-CSF 欠損マウスである *op/op* マウスでは腸管マクロファージの分化が障害されているという事実からも、腸管は M-CSF の発現が優位な組織であることが報告された⁹⁾。すなわち、正常腸管局所は炎症抑制性である M-M ϕ の分化の場であると考えられる。実際にマウス腸管マクロファージは腸内細菌抗原刺激に対し TNF α や IL-6 などの急性反応性のサイトカインは産生するものの、決して Th1, Th17 型免疫応答を引き起こす IL-12 や IL-23 を産生せず、むしろ抑制性サイトカインである IL-10 を高産生する抑制性のマクロファージであった⁸⁾。また Smythies ら¹⁰⁾ はヒトの腸管マクロファージは細菌に対し食食能を保ったままサイトカイン産生に関しては低応答となっていることを報告している。また、腸管マクロファージが炎症抑制的に働いていることを裏付ける報告として腸管マクロファージ欠損マウスでは dextran sulfate sodium (DSS) 誘導腸炎が増悪することが明らかになった¹¹⁾。このように正常な腸管マクロファージは腸内細菌に対し抑制性の免疫反応を誘導し、ホメオスタシスの維持にかかわっていると考えられる。

4 IBD では腸管マクロファージ特有の抑制能が破綻している

しかしながら、IBD、とくにクローン病の病態には腸管マクロファージが深く関与していると考えられる¹²⁾。われわれの検討においても、クローン病腸管マクロファージから腸内細菌の刺激により、急性期の炎症性サイトカインである TNF α や IL-6 のみならず、獲得免疫反応の誘導にかかわる IL-23 も高産生されていることが確認された (未発表データ)。このことは、前項で述べた腸管マクロファージ特有の炎症制御能とは一致しない。すなわちクローン病において腸管マクロファージは何らかの原因によりその免疫制御機能を失い、その結果、腸内細菌に対する過剰な免疫反応、IL-12/23 産生に起因する Th1/Th17 型獲得免疫反応の増強を引き起こしているのではないだろうか。

IBD モデル動物の一つである *IL-10* 遺伝子欠損 (ノック

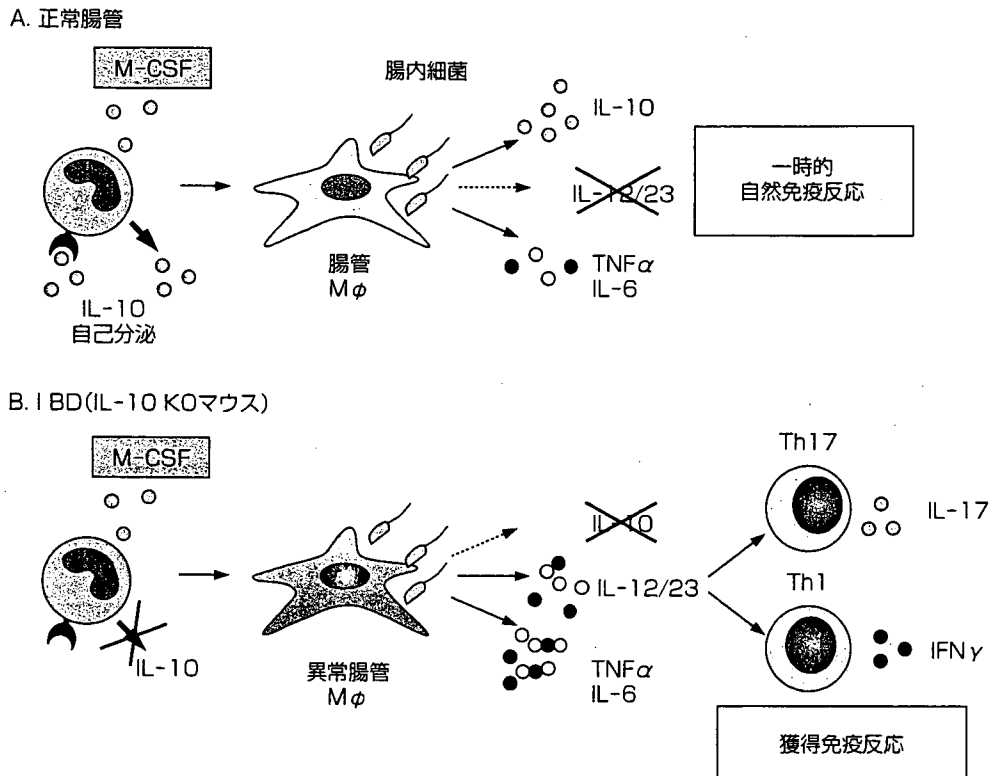


図2 腸管マクロファージ分化異常による免疫抑制能の破綻

A. 正常腸管マクロファージは腸管に存在する M-CSF 依存的に分化する。このとき M-CSF により誘導される IL-10 の刺激を受け、腸管マクロファージは腸内細菌に対し TNF α や IL-6 などの急性反応性のサイトカインは産生するものの、獲得免疫応答を誘導する IL-12 や IL-23 を産生せず、むしろ抑制性サイトカインである IL-10 を高産生する抑制性の機能を獲得すると考えられる。

B. IL-10 KO マウス由来腸管マクロファージはその抑制機能が破綻し、腸内細菌に対し TNF α や IL-6 のみならず IL-12 や IL-23 を過剰産生し、Th1 型や Th17 型の獲得免疫反応を誘導していると考えられる。

(鎌田信彦, 久松理一, 日比紀文: 腸管粘マクロファージによる腸管ホメオスタシスとその破綻. 特集 消化器病と Innate Immunity. 分子消化器病 6: 104-109, 2007 より引用)

クアウト: KO) マウスは Th1 型の慢性腸炎を自然発症するモデルであり、クローン病のモデルとして広く用いられている¹³⁾。IL-10KO マウスのマクロファージや樹状細胞はナイーブ T 細胞やメモリー T 細胞の Th1 反応を誘導する、また、腸管マクロファージを選択的に除去することで腸炎の発症が抑制されることから、本モデルにおいてマクロファージは炎症の主体を担っていると考えられる¹⁴⁾。さらに IL-12 と IL-23 の共通のサブユニットである IL-12/23p40 とのダブルノックアウトマウスや IL-12/23p40 サブユニット抗体治療により IL-10KO マウスの腸炎発症が劇的に抑制されることから、クローン

病と同様に、マクロファージからの IL-12/23 産生が、本モデルの病態形成の鍵となっていると考えられる¹⁵⁾。

われわれは、本モデルを用いて腸管マクロファージの機能について検討をおこなった。その結果、IL-10KO マウスでは、炎症性の GM-M ϕ では IL-12/23 産生能に有意な差は認められなかったのに対し本来抑制性に働いている M-M ϕ 、腸管マクロファージにおいて腸内細菌である *Escherichia coli* や *Enterococcus faecalis* 加熱死菌抗原刺激により過剰な IL-12, IL-23 の産生が認められることが明らかになった⁸⁾。すなわち、IL-10KO 腸炎モデルマウスでは腸管マクロファージの抑制能が破綻していたの

である。つぎに、なぜ IL-10 の欠損は M-CSF 誘導性の抑制性マクロファージにのみ強く影響するのだろうかという疑問が持ち上がる。過去の研究により、単球を M-CSF で刺激すると IL-10 が誘導されることがわかっている。しかしながら GM-CSF にはこのような IL-10 誘導能は認められない。すなわち、M-CSF により分化誘導される抑制性のマクロファージ（腸管マクロファージも含めて）の機能的成熟には分化時に M-CSF により誘導される IL-10 の自己分泌刺激が必要なのではないだろうか。この仮説を証明するために、われわれは IL-10 KO M-Mφ の分化時に IL-10 を加え分化実験をおこなった。結果、IL-10 を分化時に加えたマクロファージでは IL-10 産生能がないにもかかわらず IL-12, IL-23 の過剰産生は抑制された⁹⁾。本結果より、通常下では分化段階で内因性の IL-10 によりマクロファージによる IL-12 誘導機構（つまりは Th1 優位な獲得免疫の誘導）は負に制御されているが、IL-10 欠損下では IL-12 の抑制機構が破綻し、その結果、腸内細菌認識により過剰な IL-12 が産生され、Th1 優位な腸炎を引き起こすことが明らかになった（図 2）。

5. 腸管マクロファージをターゲットとした IBD 治療へのアプローチ

以上のようにクローン病において、本来あるはずの抑制能が破綻した異常腸管マクロファージがその病態に深く関与していることが明らかとなった。ではそれらマクロファージをターゲットとした治療戦略は立てられるのだろうか？

1) 抗 TNF α , 抗 IL-6 抗体

異常分化した腸管マクロファージからは TNF α , IL-6 などの炎症性サイトカイン産生が亢進している。これらのサイトカインをターゲットとした治療はマクロファージを沈静化することができると考えられる。事実、腸管マクロファージへの直接作用は不明ではあるが、抗 TNF α , 抗 IL-6 抗体は臨床的にクローン病への有効性が報告されている^{16)~18)}。

2) 抗 IL-12p40 サブユニット抗体

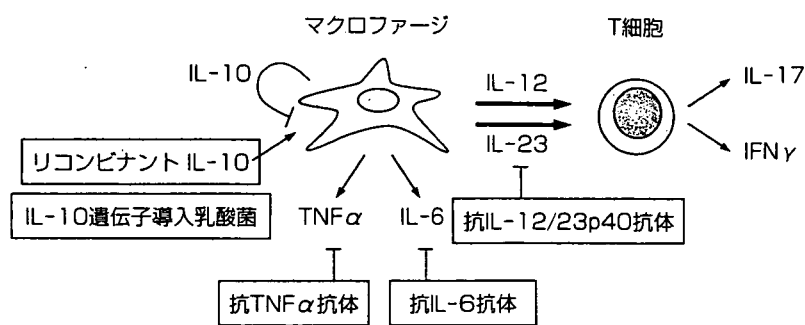
クローン病において、異常分化した腸管マクロファージからの IL-12, IL-23 産生が病態の中心を担っていると考えられることから、IL-12, IL-23 共通のサブユニットである IL-12p40 をターゲットとした治療はクローン病において有効であると考えられる。実際に、完全ヒト型抗 IL-12p40 抗体の活動性 CD に対する有効性が 2004 年に報告された¹⁹⁾。

3) IL-10

IL-10 はクローン病のエフェクターサイトカインである IL-12 や TNF α , IL-6 などの抑制効果を有する抑制性のサイトカインである。このため、クローン病腸管炎症への有用性が期待されたが、クローン病への IL-10 の投与の治療効果は明確になっていない。われわれの研究結果からは IL-10 はエフェクターサイトカインの抑制効果よりむしろ腸管マクロファージの分化において重要であることが示唆された。このことから、クローン病において IL-10 の投与はエフェクターサイトカインの直接的な抑制効果よりむしろ腸管マクロファージの分化異常を是正し、正常な腸管免疫応答を導くことで、とくに緩解維持に有用な可能性があるかもしれない。しかし、現在のところ腸管マクロファージの分化をターゲットとした治療はドラッグデリバリーの観点からも課題が残されている。この点では、ヒト IL-10 遺伝子を導入した乳酸菌のクローン病に対する臨床試験がおこなわれており興味深い。

おわりに

以上のように、IBD、とくにクローン病において、抑制性の腸管マクロファージの分化異常が起こっており、腸管マクロファージの免疫制御能の破綻が IBD という特殊な慢性持続炎症を引き起こすものと考えられる。このように、腸管マクロファージの活性化抑制、分化異常の是正といった腸管マクロファージをターゲットとした治療は根本的な発症メカニズムの抑制、あるいは再燃防止といった観点から、今後の新たな IBD 治療戦略の一つになりうると考えられる（図 3）。



腸管マクロファージをターゲットとした IBD 治療

抗 TNF α 抗体, 抗 IL-6 抗体の投与は, IBD における異常腸管マクロファージに直接作用し, マクロファージ誘導性の炎症反応を抑制する. IL-12, IL-23 の抑制は病的な Th1/Th17 型獲得免疫反応へのシフトを抑制し, 腸管炎症の慢性化を抑制しうる. また, IL-10 の投与は抑制的マクロファージへの分化を誘導することで分化異常を是正すると考えられる.

文 献

- 1) Kanai T, Watanabe M, Okazawa A *et al*: Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 121 : 875-888, 2001
- 2) Matsuoka K, Inoue N, Sato T *et al*: T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 53 : 1303-1308, 2004
- 3) Yen D, Cheung J, Scheerens H *et al*: IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 116 : 1310-1316, 2006
- 4) Fuss IJ, Becker C, Yang Z *et al*: Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 12 : 9-15, 2006
- 5) Akagawa KS: Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int J Hematol* 76 : 27-34, 2002
- 6) Akagawa KS, Kamoshita K, Tokunaga T: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating factor-1 on the proliferation and differentiation of murine alveolar macrophages. *J Immunol* 141 : 3383-3390, 1988
- 7) Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M *et al*: Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264 : 713-716, 1994
- 8) Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S *et al*: Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J Immunol* 175 : 6900-6908, 2005
- 9) Cecchini MG, Dominguez MG, Mocchi S *et al*: Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 120 : 1357-1372, 1994
- 10) Smythies LE, Sellers M, Clements RH *et al*: Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 115 : 66-75, 2005
- 11) Qualls JE, Kaplan AM, van Rooijen N *et al*: Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 80 : 802-815, 2006
- 12) Rogler G: Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 20 : 311-317, 2004
- 13) Kuhn RJ, Lohler J, Rennick D *et al*: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75 : 263-274, 1993
- 14) Watanabe N, Ikuta K, Okazaki K *et al*: Elimination of local macrophages in intestine prevents chronic colitis in interleukin-10-deficient mice. *Dig Dis Sci* 48 : 408-414, 2003
- 15) Davidson NJ, Hudak SA, Lesley RE *et al*: IL-12, but not IFN- γ , plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 161 : 3143-3149, 1998
- 16) Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR *et al*: Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 359 : 1541-1549, 2002
- 17) Schreiber S, Rutgeerts P, Fedorak RN *et al*: A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 129 : 807-818, 2005
- 18) Ito H, Takazoe M, Fukuda Y *et al*: A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126 : 989-996, 2004
- 19) Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L *et al*: Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 351 : 2069-2079, 2004

消化管上皮幹細胞

佐藤俊朗^{*,**} 伊達昌一^{*} 日比紀文^{*}

Summary

腸管上皮幹細胞は自己複製とともに多分化能を有する細胞と定義され、腸管上皮の半永続的な維持と腸管上皮を構成する全分化細胞の源となっている。本稿では、腸管上皮幹細胞の自己複製機構と分化制御に関して、最近の知見、とくに Wnt シグナル、Notch シグナルの活性化機構をもとに概説する。これらのシグナルは腸管腺腫、癌細胞でも活性化されることがわかっており、腸管上皮幹細胞研究と消化器癌研究は新たなクロスロードを展開しつつある。

Key words

腸管上皮幹細胞 Wnt シグナル Notch シグナル 自己複製

はじめに

腸管は人体の中でも最も外界と接する面積の広い臓器であり、異物の侵入を防ぐバリアーになるとともに必要な栄養素を分解（消化）し、選択的に吸収するという生命の維持に欠かせない機能を有している。腸管は腸管上皮細胞と間質から構成されており、その機能の大部分は腸管上皮細胞に担われているが、腸管上皮細胞の機能発現・分化には間質との interaction が不可欠である。腸管上皮幹細胞は陰窩底部に存在するとされ、増殖能の高い娘細胞を生み出す。さらにこれらの娘細胞は分裂をくり返し、腸管内腔に向かって3系統の分化細胞（粘液産生細胞、吸収上皮細胞、内分泌細胞）を生み出す。分化した細胞は徐々に腸管内腔に押し出され、最終的にはアポトーシスを引き

起こし、腸管内腔へ排出される¹⁾。小腸においてはさらにパネート細胞という抗菌作用に特化された細胞に分化し、この細胞は陰窩底部に向かって移動する。近年の研究により、腸管上皮細胞が分化と増殖をどのように制御しているかがわかりつつある。腸管上皮細胞の増殖・分化制御機構の解明は粘膜再生治療や消化管の発癌機構など、さまざまな分野の発展につながると思われる。本稿ではこの点に関して最近の知見とともに概説する。

1 ■ 腸管上皮幹細胞

腸管上皮幹細胞は他の臓器と同様に、多分化能と自己複製能をもつ細胞と定義される。つまり、腸管における幹細胞は腸管上皮を構成する4系統の分化細胞への多分化能を有するとともに、一定の幹細胞数を保つよう自己複製する能力をもって

* SATO Toshiro, DATE Shoichi, HIBI Toshifumi/慶應義塾大学医学部消化器内科学

** SATO Toshiro/Hubrecht Institute, Developmental Biology and Stem Cell Research
Hans Clevers lab

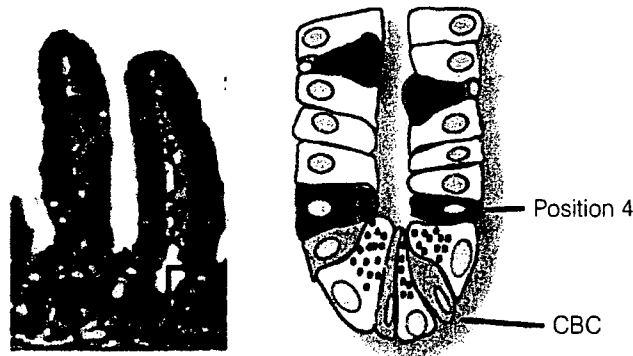


図 1. 小腸幹細胞の局在

いる。他の臓器と異なり、*in vitro* における clonal assay が確立されておらず、腸管上皮幹細胞の機能的な証明はいまだなされていない。1980年代、Bjerknes ら²⁾は放射性物質の取り込みを入念に解析し、パネート細胞の間に存在する crypt base columnar (CBC) cells (図 1) は長時間にわたり増殖をくり返した後、4系統の分化細胞を産生することを示した²⁾。さらに、彼らは遺伝子変異誘導物質により、ランダムに腸管上皮細胞を変異させ、*D. biflorus* agglutinin による染色性の変化を解析した。染色性の変化率はきわめて低く、20~30個の陰窩に1細胞の割合であるため、投与後十分に時間をおくことで、変異した細胞の分化系譜を追うことが可能であった³⁾。残念ながら、4系統の分化細胞を有するクローンは認められなかったが、2~3系統の分化細胞を有するクローンが確認された。このようなクローンではつねに CBC も変異しており、この細胞が腸管における幹細胞であることの傍証となっている。

一方、他の臓器において、幹細胞は定常状態では静止期(G0)にあり、幹細胞の増加が必要になった時に一過性に増殖することが証明されている。Potten ら⁴⁾は幼若マウスまたは放射線照射後に放射性標識物質を投与し、4~6週後に標識を保持している細胞 (label retaining cells : LRC) について解析した。LRC は標識投与時に増殖しており、その後、長期間の静止状態にある性質をもっており、半減期の非常に長い分化細胞か、分裂後静止

期にある幹細胞と考えられる。LRC は典型的には陰窩底部より4番目 [position 4 と呼称されている (図 1)] に存在し、この細胞が腸管上皮幹細胞であると提唱された⁴⁾。しかし、分化細胞にも LRC が含まれているという指摘もあり、皮膚で示されたように LRC が機能的に幹細胞であるという証明もなされておらず、LRC を腸管上皮幹細胞とするには議論の余地がある。

上記のように、腸管上皮幹細胞の同定がなされていないため、腸管上皮幹細胞マーカーも確立されていない。リン酸化 PTEN, Akt, 14-3-3- ζ , Dcamk1 1 は position 4 に存在しており、BrdU を取り込まない静止状態の細胞に発現している⁵⁾。しかし、腸管内分泌細胞も position 4 にしばしば認められ、非特異的に免疫染色されることから、これらのマーカーに関しては慎重な検討が必要である。現時点では position 4 と CBC の両者に存在する Musashi-1 が最も有用なマーカーであろう⁶⁾。

2 ■ 腸管上皮幹細胞の自己複製制御

腸管上皮幹細胞がどのようなメカニズムで自己複製をおこなっているかについては、基礎医学的な観点のみならず、腫瘍学、臨床医学的な見地からも非常に興味深い。腸管上皮幹細胞は他の幹細胞と同様に、自己と同一の娘細胞を2つ生み出す対称性分裂と一方がより分化した娘細胞である非対称性分裂の2つの分裂様式をもつ。アポトーシ

スを起こしている腸管上皮幹細胞はきわめてまれであることから、定常状態では、腸管上皮幹細胞は概して非対称性分裂様式をとり、その数を一定に保っている。また、腸管傷害時や若年期の腸管では、腸管上皮幹細胞の数は増加する必要がある、対称性分裂をとると思われる。Wnt/ β -カテニンシグナルは腸管上皮幹細胞の自己複製の促進において中心的な働きをもつ。 β -カテニンは通常 APC・Axin からなる destruction complex による分解のため、細胞質内では不安定である。しかし、Wnt が受容体である Frizzled と LRP に結合することにより、destruction complex は不活性化され、 β -カテニンは核内移行、転写因子である Tcf との結合を介し、*c-myc* などのさまざまな遺伝子を誘導する。APC をコンディショナルにノックアウトさせたマウスでは、未分化上皮細胞の著明な増加を認め、一過性増殖細胞・腸管上皮幹細胞が非自律的に増殖する⁷⁾。一方、Wnt シグナルの抑制蛋白である Dickkopf 1 (Dkk 1) を過剰発現させたマウスや Tcf 4 のノックアウトマウスでは、腸管上皮の増殖低下と分化促進が認められる⁸⁾⁹⁾。Wnt シグナルは腸管上皮幹細胞、一過性増殖細胞、パネート細胞の3種類の細胞で活性化されており¹⁰⁾、必ずしも幹細胞特異的に働いているわけではない。しかし、腸管上皮幹細胞では *GPR49*, *Sox4*, 一過性増殖細胞では *Nol1* などの増殖関連遺伝子、パネート細胞では *Cryptdin* や *MMP7* などの *innate immunity* 関連遺伝子が誘導されており、シグナルを受容する細胞の分化度、受容時に存在する転写因子など、文脈依存的にアウトプットを変化させている。このことから、Wnt シグナルが幹細胞の自己複製には必須であるが、他の因子が協調的に働いていると考えられる。最近になり、APC のコンディショナルノックアウトマウスにおいて、*c-myc* を同時に不活化させた際、 β -カテニンの核内移行は認められるにもかかわらず、*Axin2* や *EphB* などの Wnt-inducible genes が誘導されることが報告された¹¹⁾。この知

見から、*c-myc* は内因的因子として Wnt シグナルのアウトプットを調節している可能性が示唆された。

Notch シグナルも協調的に Wnt シグナルのアウトプットを変化させている。APC 変異マウスにおける腺腫や、陰窩底部の増殖細胞は Wnt シグナルの活性化によって増殖活性が保たれていると考えられてきたが、Notch シグナルの抑制により、これら増殖活性は著明に低下することがわかった¹²⁾。このことから、腸管上皮幹細胞の自己複製には Wnt と Notch シグナルの両者の活性化が必須であり、さらに、これらのシグナルは腸管における腺腫、癌に対して、有用なターゲットになりうると期待されている。

3 | 腸管上皮細胞の分化制御

前述のように、腸管上皮幹細胞は増殖・分化の過程を経て、4 系統の成熟細胞に分化する。ノックアウトマウスによる知見を基に、分化メカニズムが解明されつつある。Notch シグナルは腸管上皮幹細胞の増殖能の維持とともに、分泌系細胞（杯細胞、腸管内分泌細胞、パネート細胞）への分化抑制に重要な働きをもっている。Notch シグナルはそのリガンドである Jagged または Delta との結合により、Notch レセプターの細胞内ドメイン (Notch intracellular domain : NICD) が γ -セクレターゼ依存的に遊離、核内移行し、転写因子である RBP- $j\kappa$ とともに、Hes に代表される転写因子を誘導する。RBP- $j\kappa$ のコンディショナルノックアウトマウスまたは γ -セクレターゼ阻害剤の投与により Notch シグナルを抑制させると、分泌系細胞、とくに杯細胞への分化が著明に亢進し、また、NICD の過剰発現による Notch シグナルの恒常的活性化マウスでは、逆に、分泌系細胞への分化が欠失する¹²⁾¹³⁾。さらに、Hes により抑制される転写因子 Math 1 のノックアウトマウスにおいても分泌系細胞が欠損することより、Notch シグナルは Hes, Math 1 を介して、それぞれ吸収上

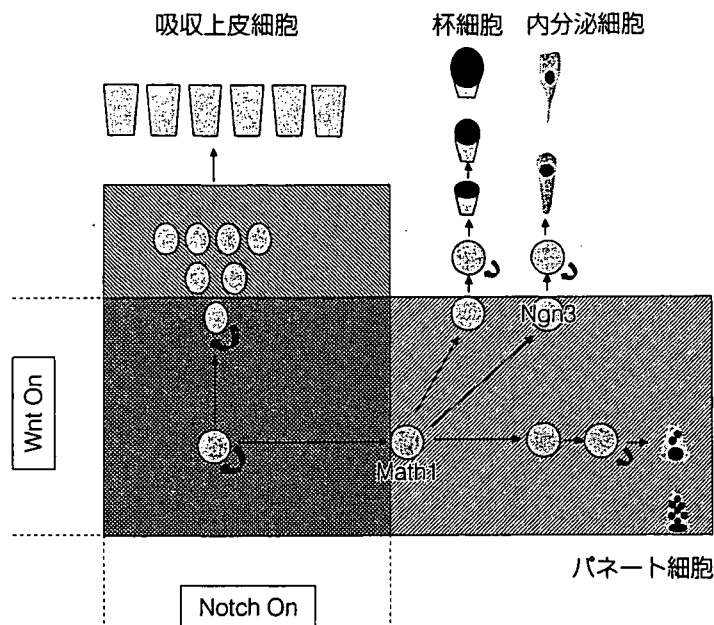


図 2. 小腸上皮細胞の増殖・分化制御

皮，分泌系上皮への分化を司っていることがわかってきた¹⁴⁾。Math 1 の下流因子である neurogenin 3 はそのノックアウトにより内分泌細胞が欠損することから，内分泌細胞の分化誘導を制御すると考えられている¹⁵⁾。また，Math 1 は未知の転写因子を介し，杯細胞，パネート細胞への分化を誘導すると考えられている。

Wnt シグナルは前述のように分化制御にもかかわっており，とくにパネート細胞への分化促進と吸収上皮細胞への分化抑制に重要である。Wnt 受容体の一つである Frizzled 5 を欠損させたマウスでは，パネート細胞の分化異常が認められ¹⁶⁾，Notch シグナルと Wnt シグナルの活性化の違いにより，分化制御はある程度説明が可能である(図 2)。

4 ■ 正常幹細胞から癌幹細胞へ

近年，正常組織と同様に，癌組織にも幹細胞が存在することが報告され，癌幹細胞として脚光を浴びている。両者に共通した性質として，細胞周期が組織内の増殖コンパートメントにくらべ緩やかであり，半永久的に組織を構成する細胞を補いつづけることである。癌幹細胞に関しては研究が始まったばかりであり，正常幹細胞とともに，相

補的にそのメカニズムが解明されていることが期待される。

文 献

- 1) Cheng H, Leblond CP : Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* **141** : 537-561, 1974
- 2) Bjerknes M, Cheng H : The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. *Am J Anat* **160** : 77-91, 1981
- 3) Bjerknes M, Cheng H : Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* **116** : 7-14, 1999
- 4) Potten CS, Owen G, Booth D : Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* **115** : 2381-2388, 2002
- 5) He XC, Zhang J, Tong EG *et al* : BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* **36** : 1117-1121, 2004
- 6) Kayahara T, Sawada M, Takaishi S *et al* : Candidate markers for stem and early progeni-

- tor cells, Musashi-1 and Hes 1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* **535** : 131-135, 2003
- 7) Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ *et al* : Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* **18** : 1385-1390, 2004
 - 8) Pinto D, Gregorieff A, Begthel H *et al* : Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17** : 1709-1713, 2003
 - 9) Korinek V, Barker N, Moerer P *et al* : Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19** : 379-383, 1998
 - 10) Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I *et al* : The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* **132** : 628-632, 2007
 - 11) Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V *et al* : Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* **446** : 676-679, 2007
 - 12) van Es JH, van Gijn ME, Riccio O *et al* : Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435** : 959-963, 2005
 - 13) Fre S, Huyghe M, Mourikis P *et al* : Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435** : 964-968, 2005
 - 14) Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ *et al* : Requirement of Math 1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294** : 2155-2158, 2001
 - 15) Jenny M, Uhl C, Roche C *et al* : Neurogenin 3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *Embo J* **21** : 6338-6347, 2002
 - 16) van Es JH, Jay P, Gregorieff A *et al* : Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* **7** : 381-386, 2005

腸内細菌と腸管免疫

Intestinal microflora and mucosal immunology



日比紀文(写真) 中澤 敦

Toshifumi Hibi and Atsushi NAKAZAWA

慶應義塾大学医学部消化器内科

①炎症性腸疾患はその病因は不明であるが、遺伝子操作で作製された炎症性腸疾患類似動物モデルが、無菌状態では腸炎を発症しないことより、炎症持続上腸内フローラが重要な因子と考えられている。炎症性腸疾患患者における腸内フローラの構成を糞便を用いた定量的PCR法により検討した。炎症性腸疾患患者においては健常人と比較して、*Bacteroides fragilis* groupをはじめとした嫌気性菌が減少していた。一方、腸内細菌に対して腸管マクロファージ(Mφ)はその免疫応答に重要な役割を果たしている。健康な腸管局所ではつねに多数の腸内細菌が存在しているが、腸管マクロファージはIL-10を高産生して過剰な免疫反応を制御している。しかし、炎症性腸疾患モデルであるIL-10ノックアウトマウスでは、本来抑制性である腸管マクロファージの分化異常が腸内細菌に対する過剰な免疫応答を引き起こし、慢性腸炎を発症することも証明した。また、近年、炎症性腸疾患患者においてプロバイオティクスの有効性が報告されてきたが、著者らは非病原性大腸菌Nissle 1917の腸炎モデルにおける抑制効果およびその機序を証明した。今後、腸内細菌の構成・分布を解析し、腸内細菌と腸管マクロファージの関係を解明していくことは、プロバイオティクスなど、炎症性腸疾患の新しい治療法の開発につながると考える。

Key word 炎症性腸疾患, 腸内細菌, 腸管マクロファージ, IL-10ノックアウトマウス, プロバイオティクス

消化管は、消化、吸収、排泄をつかさどるだけでなく、複雑な Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) とよばれる免疫担当装置を形成している。さらに、消化管には豊富な血管網や神経組織が迷路のように存在し、消化管ホルモンや神経ペプチドなどが生理機能を調節している。全消化管粘膜の表面積は、テニスコート 1.5 面分にもおよび、そこに 10^{14} 個以上の腸内細菌が常在している。さらに、消化管は病原体や食餌抗原などの外来抗原にも恒常的に曝露されている。つまり消化管は体内にありながらつねに外界と接している特殊な臓器といえる。

通常、免疫装置は外界からの侵入者に対して免疫反応を誘導することで外来抗原に対し速やかに反応、処理することで生体を守っている。しかし、

つねに食餌抗原や腸内細菌に曝されている腸管粘膜ではそれらの抗原に対して過剰な免疫反応を誘導するのは好ましくなく、むしろ恒常性を保つため過剰な免疫反応を抑制的に制御する機構が存在すると考えられる。腸管上皮は構造的に微生物や

サイド
メモ

嫌気性菌

腸内細菌は発育に絶対的な嫌気的条件を必要とする偏性嫌気性菌 (obligate anaerobes: 嫌気性菌) と、多少の空気の下でも発育できる通性嫌気性菌 (facultative anaerobes: 好気性菌) に分類される。健康人の糞便 1g 中には、嫌気性菌が $10^{10} \sim 10^{11}$ 個、好気性菌が 10^8 個存在しており、圧倒的に嫌気性菌が多い。

抗原の侵入を防いでおり、さらにムチン、trefoil factor や抗菌ペプチドなどの分泌蛋白を産生し粘膜表面を守っている。しかし、これらの上皮細胞による防御にとどまらず、抑制性の免疫学的機構が存在していると思われる。

炎症性腸疾患と腸内細菌

—分子生物学的手法を用いた腸内細菌の構成と分布の検討

炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)は、大きく潰瘍性大腸炎と Crohn 病の二疾患に区別される。潰瘍性大腸炎では標的臓器は大腸のみであるのに対し、Crohn 病では小腸、大腸を含めた全消化管が標的となり、しばしば瘻孔を形成する。潰瘍性大腸炎、Crohn 病ともにその病因はいまだ明らかにはなっていないが、遺伝素因、環境因子、免疫応答の異常が複雑に関与した多因子疾患であると考えられている¹⁾。炎症性腸疾患の動物モデルである interleukin (IL)-10 や IL-2 のノックアウト(KO)マウス、CD4⁺CD45RB^{high} 移入腸炎モデルなどさまざまな実験腸炎モデルにおいて無菌化することで腸炎の発症が抑制されること^{2,3)}、臨床的にも広域抗生剤やプロバイオティクスが有効な症例が存在することから⁴⁾、炎症性腸疾患の発症、進展には腸内細菌が重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、Crohn 病患者血清中に抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体(ASCA)を認め、Crohn 病診断の血清学的マーカーであると報告されて⁵⁾、非病原性細菌と Crohn 病の関連性が示唆された。

これまでの腸内細菌に関する研究は培養法により行われてきた。しかし、培養法は手技が煩雑なうえ、厳密な嫌気培養法を適応しても培養可能な菌数は 50%程度であるとされ、培養できない微生物群集が未解析のまま残されている。近年、16SrRNA/DNA の塩基配列に基づく細菌の分類法が確立され、細菌同定の新しい指標として定着しつつある。現在、著者らはヤクルト中央研究所との共同研究で、従来の培養同定法に変わり菌属、菌種特異性をもつ 16SrRNA/DNA 遺伝子配列をもとにした患者糞便を用いた定量的 PCR 法を開発した。これまでの炎症性腸疾患における腸内フ

ローラの検討によると、大腸粘膜から *Bacteroides vulgatus* をはじめとする、*Bacteroides* 属が効率よく分離されることや患者血清中の *Bacteroides vulgatus* に対する抗体価が高いという報告より、常在腸内細菌である *Bacteroides* を中心とした腸内細菌抗原の病態への関与が想定されてきた。著者らは炎症性腸疾患患者糞便中の腸内細菌の構成を定量的 PCR 法を用いて解析し、健常人と比較検討した。その結果、予想に反して炎症性腸疾患患者の糞便では、健常人と比較して *Bacteroides fragilis* group をはじめとした嫌気性菌が減少していることが明らかになった。この結果は Crohn 病患者の糞便を用いた分子生物学的検討で、腸内細菌の多様性が減少するとともに *Bacteroides fragilis* group をはじめとした嫌気性菌の減少を認めた⁶⁾とするこれまで報告と相違ないものであった。現在、腸内優勢細菌群特異的なプローブを用いた多重染色 FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法により、大腸粘膜内における腸内細菌の構成および分布を検討中である。

炎症性腸疾患におけるプロバイオティクス

1. 動物モデルとプロバイオティクス

慢性大腸炎モデルである IL-10 KO マウスに *Lactobacillus* を投与した検討では、*Lactobacillus* の経肛門的投与により大腸粘膜内の *Lactobacillus* の増加に伴い、大腸炎の抑制を認めた⁷⁾。これに対し CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入腸炎モデルには *Bifidobacterium* が、より有効であったという報告があり、菌種による治療効果を比較した検討であり、興味深い。さらに、著者らは非病原性大腸菌 Nissle 1917 を DSS 腸炎マウスおよび IL-10 KO マウスに投与し、有意な腸炎抑制効果を認めた。また、Nissle 生菌のみならず加熱死菌、DNA 投与群においても DSS 腸炎を有意に改善して本製剤の作用機序を証明した⁸⁾。

また、Steidler らは *Lactobacillus lactis* が IL-10 を産生するように IL-10 遺伝子を導入した。この IL-10 遺伝子導入 *Lactobacillus* を、慢性大腸炎モデルである DSS (dextran sulfate sodium) 腸炎マウスに投与したところ、IL-10 導入 *Lactobacillus* 投与群はコントロール群に比べ、約 50%にまで組織

表 1 単球より誘導されたGM, M型マクロファージの特徴

	GM-Mφ	M-Mφ
growth factor	GM-CSF	M-CSF
phagocytic/bacteriocidal function	weak	strong
antigen presenting function	strong	weak
cytokine production	IL-12(+)	IL-12(-)
	IL-23(++)	IL-23(-)
	IL-10(+/-)	IL-10(++)
<i>in vivo</i> localization	lung	intestine

学的改善を認めたと報告している⁹⁾。通過菌である *Lactobacillus* は一定期間で腸管より排除されるため、治療に必要なときにのみ投与すればよく、安全性にも優れているといえる。その後、Steidlerらは、Crohn病患者に対してIL-10遺伝子導入 *Lactobacillus lactis* (LL-Thy12)の phase I trial を行い、安全性と有効性を報告した¹⁰⁾。

2. プロバイオティクスの炎症性腸疾患への応用

プロバイオティクスのヒト炎症性腸疾患への応用は、腸炎を惹起しない安全な *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* の両菌属を用いておもに行われている。*Lactobacillus* は代謝産物である酪酸が大腸上皮のエネルギーバランスを改善し、またサイトカイン産生を亢進させる転写因子であるNF-κBを抑制することが報告されている¹¹⁾。潰瘍性大腸炎術後の回腸囊炎が、*Lactobacillus* と *Bifidobacterium* など13株を組み合わせたVSL#3というプロバイオティクス製品により改善したことが報告されている¹²⁾。潰瘍性大腸炎患者に非病原性 *E. coli* を投与し、5-ASAと同等の緩解維持効果が認められたとする報告や¹³⁾、ビフィズス菌発酵乳が再発を抑制した成績も報告されている¹⁴⁾。

一方、2006年のアメリカ消化器病学会では、ステロイドによる緩解導入後の潰瘍性大腸炎患者で *Lactobacillus salivarius* および *Bifidobacterium infantis* の緩解維持効果を検討したが、プラセボと比較して有意差を認めないことが報告された。

前述のVSL#3は活動性潰瘍性大腸炎患者に投与されて、77%で有効性が報告されて¹⁵⁾、現在、わが国、欧米を含めてプラセボを用いた二重盲検試験が進行中である。今後は免疫調節作用をはじめとしたプロバイオティクスの作用機序を解明し、病態に応じてそれぞれの腸内細菌を使い分け

ることが期待される。

腸管マクロファージと腸管ホメオスタシス

マクロファージは細菌などの外来抗原に対する自然免疫のおもな担当細胞であり、感染防御において重要な役割を果たしている。しかし、腸管局所ではつねに多数の腸内細菌が存在しているため、マクロファージはそれら腸内細菌に対して過剰な免疫反応を引き起こさないように、何らかの機構によって免疫反応を制御していると考えられる。近年、マクロファージは分化誘導因子の違いにより、相反する機能をもち異なる形態を示す2つのサブセットに分化することが明らかになった^{16,17)}。GM-CSFにより分化誘導されるGM型マクロファージは、Th1型免疫応答を誘導する炎症性サイトカインIL-12、IL-23を高産生する炎症性マクロファージで、一方、M-CSFにより分化誘導されるM型マクロファージは抑制性サイトカインであるIL-10を産生し抗炎症的に働く抑制性マクロファージである。さらに、著者らの研究によりマウス正常腸管ではM-CSFが優位に発現していることが明らかになり、実際にマウス腸管マクロファージは腸内細菌抗原刺激に対しTNF-αやIL-6などの急性反応性のサイトカインは産生するものの、けっしてTh1型免疫応答を引きこすIL-12やIL-23を産生せず、むしろ抑制性サイトカインであるIL-10を高産生する抑制性のマクロファージであった¹⁸⁾。このように正常な腸管マクロファージは腸内細菌に対し抑制性の免疫反応を誘導し、ホメオスタシスの維持にかかわっていると考えられる(表1)。

炎症性腸疾患と腸管マクロファージ

炎症性腸疾患, とくに Crohn 病においてその病態にマクロファージが重要な役割を果たしていることはいくつもの報告がある¹⁹⁻²¹⁾. Crohn 病の腸管局所にはインターフェロン(IFN)- γ や IL-2 産生に特徴づけられる Th1 型の CD4⁺T 細胞が集積している.

IL-10 KO マウスは Th1 型の慢性腸炎を自然発症するモデルであり, Crohn 病の実験腸炎モデルとして広く用いられている²²⁾. 前述のように IL-10 KO マウスの腸炎発症, 進展には腸内細菌の存在が必須であるが, これまで詳細なメカニズムについては不明であった.

著者らはマクロファージの腸内細菌認識に着目し, IL-10 KO マウスの骨髄単球由来 GM 型, M 型マクロファージ, および腸管マクロファージの反応性について検討を行った. その結果, 本来抑制性に働いている骨髄由来 M 型マクロファージ, 腸管マクロファージにおいて, 腸内細菌である *Escherichia coli* や *Enterococcus faecalis* 加熱死菌抗原刺激により過剰な IL-12p70 の産生が認められた¹⁸⁾. IL-12 の過剰産生は転写レベルでも同様に確認された.

つぎに M-CSF により分化誘導される抑制性のマクロファージ(腸管マクロファージも含めて)の機能的成熟には, 分化時に M-CSF により誘導される内因性 IL-10 の必要性が推測される. これを証明するために, IL-10 KO M 型マクロファージの分化時に IL-10 を加え分化実験を行った. 結果, IL-10 を分化時に添加したマクロファージは, IL-10 産生能がないにもかかわらず IL-12, IL-23 の過剰産生は抑制された¹⁸⁾. 本結果より著者らは, 通常下では分化段階で内因性の IL-10 によりマクロファージによる IL-12 誘導機構は負に制御されているが, IL-10 欠損下では IL-12 の抑制機構が破綻し, その結果, 腸内細菌認識により過剰な IL-12 が産生され, Th1 優位な腸炎を引き起こすことを明らかにした.

おわりに

以上より定量的 PCR を用いた検討では, 炎症性腸疾患患者では腸内細菌全体の構成が乱れてお

り, 炎症性腸疾患の病因に関与していることが示唆された. さらに, 腸管局所ではマクロファージは食食, 殺菌能は有しているが, IL-12, IL-23 などの Th1 誘導性サイトカインを産生しない抑制性の性質に分化することで, 外来の病原体に対する防御能を維持しながら食餌抗原や腸内細菌に対する過剰な免疫反応を制御していると考えられる. このように消化管は非常に複雑で精密な仕組みでホメオスタシスを保っており, その破綻が炎症性腸疾患という特殊な慢性持続炎症を引き起こすものと考えられる. このように腸管マクロファージと腸内細菌の関係を解明していくことで炎症性腸疾患における腸内細菌の役割を明確にし, 本疾患の病態解明, プロバイオティクスを用いた治療法の開発につながっていくと考えられる.

文献

- 1) Podolsky, D. K. : Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.*, 347 : 417-429, 2002.
- 2) Sellon, R. K. et al. : Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.*, 66 : 5224-5231, 1998.
- 3) Schultz, M. et al. : IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am. J. Physiol.*, 276 : G1461-1472, 1999.
- 4) Sutherland, L. et al. : Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut*, 32 : 1071-1075, 1991.
- 5) Vermeire, S. et al. : Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 120 : 827-833, 2001.
- 6) Manichanh, C. et al. : Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55 : 205-211, 2006.
- 7) Madsen, K. L. et al. : Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*, 116 : 1107-1114, 1999.
- 8) Kamada, N. et al. : Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 11 : 455-463, 2005.
- 9) Steidler, L. et al. : Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289 : 1352-1355, 2000.
- 10) Braat, H. et al. : A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 4 : 754-759, 2006.