



Glutamine supplementation increases Th1-cytokine responses in murine intestinal intraepithelial lymphocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 堀尾, 嘉昭 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/782

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 520号	学位授与年月日	平成21年 3月10日
氏 名	堀 尾 嘉 昭		
論文題目	<p>Glutamine supplementation increases Th1-cytokine responses in murine intestinal intraepithelial lymphocytes (グルタミンの補充はマウス小腸上皮間リンパ球の Th1 系サイトカイン産生を増加させる)</p>		

博士(医学) 堀 尾 嘉 昭

論文題目

Glutamine supplementation increases Th1-cytokine responses in murine intestinal intraepithelial lymphocytes

(グルタミンの補充はマウス小腸上皮間リンパ球の Th1 系サイトカイン産生を増加させる)

論文内容の要旨

[はじめに]

小腸上皮間リンパ球 (Intraepithelial lymphocytes: IEL)は腸管の粘膜免疫の最前線に存在し、消化管のみならず、生体全体にとっても免疫防御機構の重要な位置を占める。IEL のほとんどは T 細胞で構成され、消化管上皮細胞近傍での免疫サーベイランスや、経口的に侵入する外来抗原に対する免疫応答に重要な役割を演ずると考えられる。IEL は T 細胞受容体 (TCR) $\gamma\delta$ 型 T 細胞、CD4(-)CD8(-)T 細胞、CD4(+)CD8(+)T 細胞を有し、末梢血リンパ球が主に胸腺由来の TCR $\alpha\beta$ 型 T 細胞を主体とする点と異なる特徴を有する。IEL は、脾臓や末梢血のリンパ球とは異なる役割や制御機構を持つと考えられているが、その機能は未だ十分に解明されていない。

消化管細胞は栄養素の取り込みの入り口である故に、多くの異なった種類の外的因子に常に曝される。栄養素自体も外的な因子であり、アレルギーの原因や疾病の発症に関わることがある。一方、生体の栄養状態が強く免疫状態に関わることは長く知られた事実である。免疫制御の障害が来す消化管の慢性炎症である炎症性腸疾患では、アミノ酸栄養に特化させた「成分栄養」が治療に大きな役割を担う。

グルタミンは、ヒトではいわゆる必須アミノ酸ではないが、様々な生体機能への関わりから、重要なアミノ酸である。免疫系においても、末梢リンパ球での免疫応答への関与や、グルタミン栄養が消化管の粘膜免疫能に影響することは知られている。本研究では、グルタミンが IEL に直接的制御を及ぼすか否かを明らかにすべく、*in vitro* での影響を検討した。

[材料ならびに方法]

C3H/HeN マウスより小腸を摘出、Percoll 法を用いて IEL を分離した。IEL の subset は、フローサイトメトリーにより解析を行った。抽出した IEL を一次培養し、phorbol myristate acetate (PMA)及びイオノマイシンにより刺激を加えてサイトカインを産生させ、グルタミン存在下での培養を行い、経時的なサイトカイン産生を測定した。サイトカイン測定は、cytometric bead array システムを用い、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-5 濃度をフローサイトメトリーにより解析した。

[結果]

IEL は TCR $\alpha\beta$ 型が 62.2 %、TCR $\gamma\delta$ 型が 25.7 %で構成されており、TCR $\alpha\beta$ 型では CD4(+)CD8(-)が 15.5 %、CD4(-)CD8(+)が 68.9 %を占めていた。TCR $\gamma\delta$ 型では CD8 α (+)CD8 β (-)が 88.8 %を占めていた。PMA+イオノマイシン刺激は、非刺激群(対照群)に比較して、測定したいずれのサイトカイン産生も増加させた。PMA+イオノマイシン刺激下でグルタミン濃度依存的に、IL-2 の産生を増加させた。10 mM グルタミン投与 48 時間後の測定では、IL-2 産生は最大 50 %強の増加を示した。IFN- γ 産生は、2 mM のグルタミンで最大 50 %増加した。一方、TNF- α 、IL-4、IL-5 産生はグルタミン投与による変化を示さなかった。また、糖質栄養源グルコース、代替アミノ酸アラニン投与では、IEL の IFN- γ 、IL-2 の産生に影響が見られなかった。

[考察]

本研究は、グルタミンが、IEL によるサイトカイン産生に直接的な影響を与えることを初めて明らかにした。グルタミンは、*in vitro* では、直接刺激により IEL による IFN- γ 及び IL-2 産生の増加に至った。一方グルタミンは、IEL による TNF- α 産生には影響を与えず、同じ Th1 系と括られるサイトカイン群でも反応に差が認められた。類似の現象は末梢血リンパ球でも観察報告されているが、その理由については明確ではない。グルタミンの比較対照として用いた糖質、代替アミノ酸投与の影響が観察されないことから、グルタミンが単なる栄養源としてサイトカインの増加を促進しているものではないと考えられた。なお、過去の末梢リンパ球での報告では、グルタミン投与により細胞増殖能が増加することが知られているが、サイトカインの産生の増加パターンに差が認められたことから、サイトカインの増加は、一律に IEL 増殖能の増加によるものではなく、グルタミンによる特異的制御であると考えられた。本研究結果から、グルタミンの消化管への投与は、炎症性腸疾患などにより消化管に炎症が惹起されている状態では、疾患病勢に悪影響を与える可能性が示唆される。今後、実験腸炎モデルなどで *in vivo* でのグルタミンの投与による影響を検討する必要がある。

[結論]

グルタミンは IEL において Th1 系サイトカインである IL-2 及び IFN- γ 産生を賦活化し、Th2 系サイトカインには影響を与えなかった。小腸におけるアミノ酸栄養が腸管局所での粘膜免疫応答に直接の影響を与えている可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

消化管は栄養素の取り込みの入り口であるとともに、様々な外的因子の侵襲を受ける臓器でもある。そのため、これら有害な侵入物を排除する gut-associated lymphoid tissues(GALT)をはじめ様々な免疫機構が発達している。小腸上皮間リンパ球(intraepithelial lymphocytes: IEL)は約 90%以上が T 細胞で、T 細胞受容体(TCR) $\alpha\beta$ 型 CD8(+)細胞が最も多く、他に CD4(+)細胞、TCR $\gamma\delta$ 型 T 細胞も存在する。IEL は腸管粘膜直下に位置し、消化管における免疫サーベイランスに重要な役割を果たしている。発生的には胸腺に非由来性で、クリプトパッチを供給源とし、IL-7 の作用で成熟 T 細胞に分化する。

クローン病、潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患では、腸管免疫機構の破綻によるサイトカイン産生異常が病態の主たるものである。病変部ではインターフェロン(IFN)- γ 、TNF- α といった前炎症性 Th1 サイトカインが過剰に産生され、IL-10 のような抗炎症性サイトカイン産生低下が見られる。しかし、腸管免疫に果たす IEL 機能と炎症性腸疾患の発症病理との関連は未解明の部分が多い。

グルタミンは重要なアミノ酸栄養素であり、IEL を含めリンパ球の増殖やサイトカイン産生に影響を及ぼすことが報告されている。炎症性腸疾患ではアミノ酸栄養に特化させた「成分栄養」が治療に大きな役割を担うことから、申請者はグルタミンが IEL の *in vitro* サイトカイン産生能にどのような影響を及ぼすかを、炎症性腸疾患の病態の面と関連させて検討した。

実験に用いられた材料、方法は適切なものであった。すなわち、C3H/HeN マウスの小腸より、既に確立された方法により IEL を単離した。サイトカイン産生では、*in vitro* phorbol myristate acetate (PMA) 及びイオノマイシン(いずれも 40 nM) 刺激下での IEL による IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5 産生を検討した。IEL 刺激時にグルタミンを 0.5mM、2mM あるいは 10mM 加え、そのサイトカイン産生に及ぼす影響をみた。対象栄養素としてアラニン、グルコースを用いた。サイトカイン測定は cytometric bead array

(CBA) システムを用い、フローサイトメトリーにより解析した。

得られた結果は以下の通りである。

1. IEL を構成する主細胞は T 細胞で、T 細胞受容体(TCR) $\alpha\beta$ 型 CD8(+)細胞で 40~50%を占め、他に TCR $\alpha\beta$ 型 CD4(+)細胞が 10%、TCR $\gamma\delta$ 型 T 細胞が 20%であった。
2. IEL による IL-2、INF- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5 産生は PMA+イオノマイシン刺激群では、非刺激群と比較して増加していた。
3. IL-2 及び INF- γ 産生はグルタミン濃度 (2 mM, 10 mM) 依存性かつ時間 (刺激後 36、48 時間) 依存性に増強した。IL-2 産生では 24 時間後にも産生増強効果が見られた。
4. TNF- α 、IL-4、IL-5 産生はグルタミンの影響を受けなかった。
5. 0.5 mM、2 mM のアラニン及びグルコースは IL-2、INF- γ 産生に影響を及ぼさなかった。

本申請内容の最も注目すべき点は IEL による Th1, Th2 サイトカイン産生にグルタミンがどのような影響を及ぼすかを見たことにある。従来は末梢血リンパ球を用いて、そのサイトカイン産生が検討されてきた。さらに、本研究は炎症性腸疾患における成分栄養という治療ストラテジーを考える上で重要な示唆を与えるものである。すなわち、グルタミンは T 細胞を活性化させる IL-2、また炎症を惹起する INF- γ の産生を増強し、かつ炎症を抑制する IL-4、IL-5 の産生に影響を及ぼさないため、グルタミンの不適切な投与により Th1 疾患である炎症性腸疾患の悪化が懸念されよう。INF- γ と同様に炎症惹起サイトカインである TNF- α 産生へのグルタミンの影響については、今後のさらなる検討を待ちたい。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) IEL とグルタミンとの相互作用に注目した理由について
- 2) 腸管における免疫防御バリアーについて
- 3) IEL と lamina propria lymphocyte (LPL) との機能の違いについて
- 4) 絶食 (IVH) による IEL からのサイトカイン産生について
- 5) IEL の in vitro での増殖能について
- 6) マウスの選択、特に C3H/HeN を選んだ理由について
- 7) CBA アッセイを用いた理由について
- 8) T 細胞サイトカイン産生におけるグルタミンの作用機序について
- 9) グルタミン以外のアミノ酸の IEL 機能に及ぼす影響について
- 10) グルタミン投与による IEL サブセットの変化について
- 11) 経口グルタミンの腸管免疫に及ぼす影響について
- 12) 抗 CD3 抗体、LPS、Con A など PMA+イオノマイシン以外の刺激による効果について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 瀧川 雅浩

副査 永田 年

中村 利夫