



Title	大腸炎モデルの発症におけるSTAT1を介したLy6c陽性マクロファージの誘導に関する研究
Author(s)	木井, 修平
Description	配架番号 : 2739
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15240号
Issue Date	2022-12-26
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15240">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15240</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/88260">https://hdl.handle.net/2115/88260</a>
Type	doctoral thesis
File Information	KII_Shuhe_i.pdf



学 位 論 文

大腸炎モデルの発症におけるSTAT1を介した  
Ly6c陽性マクロファージの誘導に関する研究

(Studies on the STAT1-mediated induction of  
Ly6c-expressing macrophages in the onset of  
an experimental colitis model)

2022年12月

北 海 道 大 学

木井 修平



学 位 論 文

大腸炎モデルの発症におけるSTAT1を介した  
Ly6c陽性マクロファージの誘導に関する研究

(Studies on the STAT1-mediated induction of  
Ly6c-expressing macrophages in the onset of  
an experimental colitis model)

2022年12月

北 海 道 大 学

木井 修平

## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
方法	11 頁
結果	18 頁
考察	43 頁
結論	46 頁
謝辞	48 頁
利益相反	49 頁
引用文献	50 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Shuhei Kii, Hidemitsu Kitamura, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikeo, Nobuki Ichikawa, Tadashi Yoshida, Shigenori Homma, Mishie Tanino, Akinobu Taketomi  
STAT1-mediated induction of Ly6c-expressing macrophages are involved in the pathogenesis of an acute colitis model  
Inflammation research, 71・1079-1094, (2022)
2. Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Weidong Shen, Xiangdong Wang, Naoki Okada, Shuhei Kii, Ko Sugiyama, Toshihiro Nagato, Hiroya Kobayashi, Kazuho Ikeo, Shinichi Hashimoto, Mishie Tanino, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura  
IFN- $\alpha/\beta$ -mediated NK2R expression is related to the malignancy of colon cancer cells  
Cancer Science, 113・2513-2525, (2022)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 木井 修平, 豊島 雄二郎, 岡田 尚樹, 項 慧慧, 寺田 聖, 本間 重紀, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 武富 紹信, 北村 秀光  
STAT1-mediated signaling cascade is associated with inflammatory bowel disease  
第 45 回 日本免疫学会学術集会, 2016 年 12 月 5 日-7 日・沖縄
2. 木井 修平, 北村 秀光, 豊島 雄二郎, 岡田 尚樹, 項 慧慧, 寺田 聖, 大野陽介, 市川 伸樹, 吉田 雅, 本間 重紀, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 武富 紹信  
炎症性腸疾患における STAT1 を介したシグナルカスケードの関与  
第 117 回 日本外科学会定期学術集会, 2017 年 4 月 27-29 日・横浜
3. 木井 修平, 北村 秀光, 豊島 雄二郎, 岡田 尚樹, 項 慧慧, 寺田 聖, 市川 伸樹, 吉田 雅, 本間 重紀, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 武富 紹信  
炎症性腸疾患における STAT1 の関与  
第 72 回 日本大腸肛門病学会, 2017 年 11 月 10-11 日・福岡
4. 木井 修平, 北村 秀光, 項 慧慧, 橋本 真一, 池尾 一穂, 豊島 雄二郎, 岡田 尚樹, 大野 陽介, 市川 伸樹, 吉田 雅, 本間 重紀, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 武富 紹信  
炎症性腸疾患における STAT1 シグナルの関与についての研究

- 第 118 回 日本外科学会定期学術集会, 2018 年 4 月 5-7 日・東京
5. Shuhei Kii, Hidemitsu Kitamura, Naoki Okada, Ko Sugiyama, Huihui Xiang, Futoshi Kawamata, Yosuke Ohno, Nobuki Ichikawa, Tadashi Yoshida, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi  
STAT1 signal pathway is associated with inflammatory bowel disease  
European Society of Coloproctology 13<sup>th</sup> Scientific and Annual meeting, 2018 年 9 月 26 日-28 日・Nice, France
6. 木井 修平, 北村 秀光, 項 慧慧, 豊島 雄二郎, 岡田 尚樹, 大野 陽介, 市川 伸樹, 吉田 雅, 本間 重紀, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 武富 紹信  
DSS 誘発大腸炎モデルにおける STAT1 シグナルの関与  
第 73 回 日本大腸肛門病学会, 2018 年 11 月 9 日-10 日・東京
7. 木井 修平, 北村 秀光, 岡田 尚樹, 項 慧慧, 杉山 昂, 川俣 太, 大野 陽介, 市川 伸樹, 吉田 雅, 柴崎 晋, 本間 重紀, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 武富 紹信  
DSS 誘発大腸炎モデルの病態発症における STAT1 を介したシグナルカスケードの関与  
第 119 回 日本外科学会定期学術集会, 2019 年 4 月 18 日-20 日・大阪
8. 木井 修平, 北村 秀光, 岡田 尚樹, 杉山 昂, 大野 陽介, 市川 伸樹, 吉田 雅, 柴崎 晋, 本間 重紀, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 武富 紹信  
DSS 誘発大腸炎モデルの病態発症における STAT1 シグナルカスケードの関与  
第 74 回 日本大腸肛門病学会, 2019 年 10 月 11-12 日・東京

## 要旨

### 【背景と目的】

炎症性腸疾患は、再発と寛解を繰り返しながら腸管に慢性的な炎症を起こす疾患である。代表疾患としてはクローン病や潰瘍性大腸炎があげられるが、本邦において患者数はともに増加傾向にある。炎症性腸疾患の発症や増悪には遺伝的要因・腸内細菌・環境要因など多因子が関わっていると考えられているが、それらの詳細な作用メカニズムについて明らかにはされていない。現在、炎症性腸疾患に行われている治療は内科的治療、外科的治療など多岐にわたり、最近、生物学的製剤である抗 TNF- $\alpha$  抗体が治療薬として使用されるようになって治療成績は改善した。その一方で耐性や二次無効例の問題があり、新規治療法の開発も望まれている。

本研究では TNF- $\alpha$  とは異なる標的分子として STAT1 とその下流のシグナル伝達経路に着目した。一般に STAT1 は、細胞の増殖や分化、活性化あるいはアポトーシスを誘導し、様々な宿主免疫応答を調節する転写活性化因子であることが知られている。これまでに炎症性腸疾患患者の大腸組織において STAT1 が活性化し、特に単球や好中球でリン酸化した STAT1 (pSTAT1) が多く発現していたとの報告があるが、炎症性腸疾患の病態発症と STAT1 の活性化に関わるメカニズムについては報告が少ない。

本研究において、STAT1シグナル伝達経路と炎症性腸疾患の発症・増悪との関与について明らかにすることを目的として、マウス急性大腸炎モデルを構築し、STAT1シグナル伝達経路と腸炎の発症・増悪との関与について検証を行った。

### 【材料と方法】

野生型 C57BL/6マウスおよび同系のSTAT1欠損マウスに3% (w/v) DSS溶液を給水瓶から7日間自由摂取させることで大腸炎を発症させ、その後は通常の水を飲水させた。DSS溶液を投与後の10日間の体重推移を評価し、7日目に大腸組織や血液を採取して、腸管の長さ、組織学的スコア、大腸組織における免疫細胞、定量PCR法による遺伝子発現レベルの評価を行った。

大腸組織における免疫細胞中のLy6c発現細胞についてセルソーターを使用して単離し、定量PCR法による遺伝子発現レベルの評価を行った。またSTAT1の下

流標的分子を探索、同定するために、急性大腸炎モデルで腸炎を発症した野生型 C57BL/6マウスにCCR2阻害剤を投与し、病態に及ぼす影響を検討した。

さらに*in vitro*実験にて野生型 C57BL/6マウスおよび同系のSTAT1欠損マウスの脾臓の細胞および腹腔滲出細胞を採取し、各種IFNの添加によるLy6c陽性細胞の誘導とその形質についてフローサイトメトリーにて解析、評価した。

潰瘍性大腸炎患者の臨床検体を使用し、大腸組織における各種炎症・免疫担当細胞の浸潤とSTAT1の活性化を免疫組織化学染色により検討した。

## 【結果】

DSS誘発急性大腸炎モデルの大腸組織において、IL-6、TNF- $\alpha$ 産生に加えて、IFN- $\alpha/\beta$ の誘導とSTAT1の活性化を確認した。STAT1欠損マウスでは野生型マウスに比べて体重減少、腸管短縮の程度が改善し、腸炎の病態が改善していた。DSS投与7日目でのマウス血清中のIL-6、TNF- $\alpha$ はSTAT1欠損マウスにおいて有意に低下し、大腸の組織学的スコアはSTAT1欠損マウスにおいて有意に低下していた。

大腸炎を発症しているマウスの大腸組織に浸潤する免疫細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、Ly6c 高発現細胞の集積が野生型マウスに比べてSTAT1 欠損マウスでは減弱していた。Ly6c 高発現細胞では Ly6c を中程度発現している細胞に比べて IL-6、CCL2、CCR2 の遺伝子発現が増強する一方で Ly6c を中程度発現している細胞では Ly6c 高発現細胞に比べて TNF- $\alpha$  および IFN- $\alpha/\beta$  の遺伝子発現が増強していた。

*in vitro*実験において、野生型マウス由来の脾臓細胞と腹腔滲出細胞をIFN- $\alpha$ 、あるいはIFN- $\beta$ で刺激した結果、Ly6c発現細胞が有意に誘導され、IFN- $\gamma$ で軽度誘導された。一方、IFN- $\alpha/\beta$ 刺激によるLy6c発現細胞の誘導はSTAT1欠損マウスの脾臓の細胞および腹腔滲出細胞においては微量であった。

急性大腸炎モデルにおいて野生型マウスに CCR2 阻害剤を投与したところ、コントロールに比べて大腸炎の病態は有意に改善した。

潰瘍性大腸炎患者の大腸組織において STAT1 の活性化が認められるとともに、CCR2 を発現している CD68 陽性マクロファージの集積が確認された。

## 【考察】

潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患の発症メカニズムの解明は、病態の改善、治療において重要である。本研究より、大腸炎の発症においてSTAT1シグナル伝達経路の活性化が関与する可能性が示唆された。また本研究で、大腸炎を発症している大腸組織にSTAT1依存的にLy6c発現細胞が集積することが明らかとなり、さらに上流分子として、I型IFNが関与している可能性も示唆された。ケモカインレセプターであるCCR2の阻害実験結果から、急性大腸炎モデルにおいてSTAT1の活性化を介したCCL2-CCR2の発現を通して、Ly6cを発現するマクロファージが炎症組織に誘導され、大腸炎の発症に関与する可能性が考えられた。さらにLy6c高発現細胞群ではLy6cを中程度発現する細胞群に比べてIL-6、CCL2、CCR2の遺伝子発現が増強している一方で、Ly6cを中程度発現している細胞群ではLy6c高発現細胞群に比べてTNF- $\alpha$ およびIFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現が高値であることが明らかとなった。本研究データから、ウイルス感染や細菌感染などの刺激により上皮細胞や線維芽細胞などの免疫細胞より産生されたIFN- $\alpha/\beta$ に加えて、Ly6c陽性細胞により産生されるI型IFNによりSTAT1が活性化され、さらにLy6c発現マクロファージが誘導される可能性が考えられた。Ly6cを中程度発現する細胞群はIFN- $\alpha/\beta$ を産生し、Ly6c高発現細胞をパラクライン機構により誘導するとともに、Ly6c高発現細胞はCCL2の産生を介して、オートクライン機構により自身に発現するCCR2に結合し、炎症反応の亢進に関与することが考えられた。さらにLy6c高発現細胞群はIL-6を産生して炎症反応を惹起するとともに、Ly6cを中程度発現する細胞群はTNF- $\alpha$ に加えIFN- $\alpha/\beta$ を産生してLy6c高発現細胞群を誘導することが考えられた。これらの2種類の機能の異なるLy6c陽性マクロファージの誘導とそれらの協働により、大腸組織における炎症の惹起、病態の増悪、持続に関与することが考えられた。

## 【結論】

本研究において、IFN- $\alpha/\beta$ によるSTAT1の活性化を介して機能の異なる2種類のLy6c発現マクロファージが誘導され、大腸炎の発症、病態の悪化に関与している可能性が示唆された。本研究で得られた知見によりSTAT1シグナル伝達経路とその下流標的による炎症性腸疾患の発症メカニズムの解明と新たな治療法の開発への貢献が期待されると考えられる。

## 略語

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

7AAD 7-Aminoactinomycin D  
CCL2 chemokine ligand 2  
CCR2 chemokine receptor 2  
cDNA complementary DNA  
DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride  
DMSO Dimethyl sulfoxide  
DSS Dextran sulfate sodium  
DW Distilled Water  
GAS interferon-gamma-activated site  
HE hematoxylin and eosin  
IFN- $\alpha$  interferon-alpha  
IFNAR interferon-alpha receptor  
IFN- $\beta$  interferon-beta  
IFN- $\gamma$  interferon-gamma  
IFNGR interferon-gamma receptor  
IL-6 interleukin 6  
IRF9 interferon regulatory factor 9  
ISRE interferon-stimulated response elements  
JAK janus kinase  
LPS lipopolysaccharide  
MFI mean fluorescence intensity  
MHC major histocompatibility complex  
PBS Phosphate buffered saline  
PCR Polymerase Chain Reaction  
poly I:C polyinosinic-polycytidylic acid  
RPMI Roswell Park Memorial Institute -1640 medium  
STAT1 signal transducer and activator of transcription 1  
TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor-alpha  
TYK2 tyrosine kinase 2

## 緒言

炎症性腸疾患は、再発と寛解を繰り返しながら腸管に慢性的な炎症を起こす疾患である。代表疾患としてはクローン病や潰瘍性大腸炎があげられるが、本邦において患者数はともに増加傾向にある (Ng et al., 2017; Kaplan et al., 2019)。炎症性腸疾患の発症や増悪には遺伝的要因・腸内細菌・環境要因など多因子が関わっていると考えられているが、それらの詳細な作用メカニズムは明らかにはされていない (Xavier et al., 2007; Ananthakrishnan et al., 2018; Plichta et al., 2019)。細菌、酵母、菌類、ウイルスなどからなる腸管の微生物叢は炎症性腸疾患と関与しているとされてきた (Al et al., 2019; Borbet et al., 2019; Fachi et al., 2019; Rangan et al., 2019; Schirmer et al., 2019)。近年の研究では炎症性腸疾患患者の腸管の細菌叢の変化が報告されてきた (Zuo et al., 2019; Norman et al., 2015; Ungaro et al., 2019)。そのため、ウイルスや細菌感染による腸管細菌叢の変化が炎症性腸疾患の発症や重症化に関与している可能性があると考えられている。炎症性腸疾患の発症においてマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞が Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )、Interleukin 6 (IL-6)、Interleukin 12 (IL-12)、Interleukin 23 (IL-23)などの炎症性サイトカインを放出し、腸管に炎症を起こすことが報告されている (Bain et al., 2013; Nakanishi et al., 2015; Giles et al., 2017; Bernardo et al., 2018; Na et al., 2019; Eftychi et al., 2019)。

Interferons (IFNs) はウイルス感染に応答し、宿主細胞より産生される。Signal transducer and activator of transcription (STAT) タンパクファミリーは細胞の増殖や分化、活性化あるいはアポトーシスを誘導し、様々な宿主免疫応答を調節する転写活性化因子であることが知られている (Rauch et al., 2013)。STAT タンパクファミリーは細胞膜の受容体である Janus Kinase (JAK) を介して活性化される。

I型IFNであるIFN- $\alpha/\beta$ がInterferon-alpha receptor 1 (IFNAR1)、Interferon-alpha receptor 2 (IFNAR2) で構成される受容体に結合するとTyrosine Kinase 2 (TYK2) とJAK1が活性化され、STAT1とSTAT2がリン酸化される。それらがIRF9 (Interferon regulatory factor 9) と複合体を形成し、ISRE (Interferon-stimulated response elements) と結合することにより転写が開始される。II型IFNであるIFN- $\gamma$ がInterferon-gamma receptor 1 (IFNGR1)、Interferon-gamma receptor 2 (IFNGR2) で構成される受容体に結合するとJAK1とJAK2が活性化され、STAT1とSTAT1が

リン酸化される。それらが2量体を形成し、Interferon-gamma-activated site (GAS) と結合することにより転写が開始される (図1)。

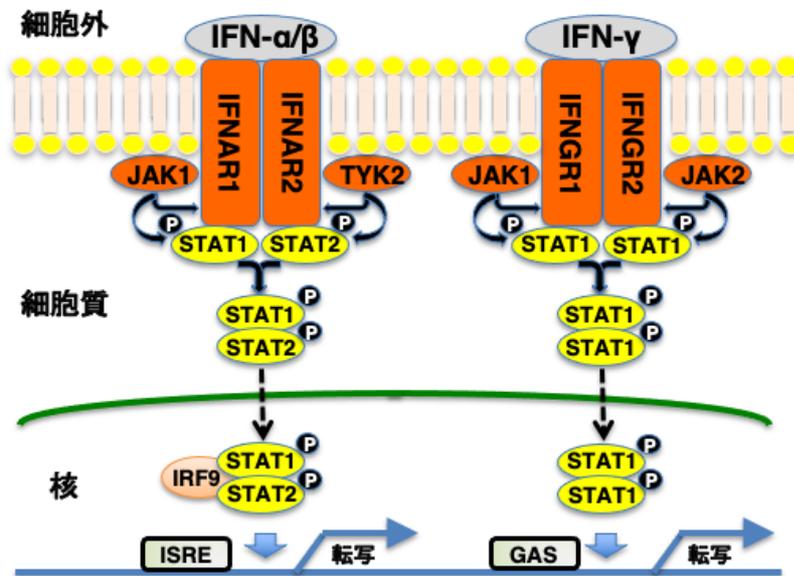


図 1. IFN-JAK-STAT1 を含むシグナル図

一般にIFN- $\alpha/\beta$ は自然免疫を司る骨髄系の細胞や線維芽細胞から産生され、IFN- $\gamma$ はnatural killer (NK) 細胞やNKT細胞、T細胞から産生される (Decker et al., 2002; Ivashkiv et al., 2018)。

これまでの先行研究では、いくつかの大腸炎の実験モデルにおいて大腸炎の発症と増悪において STAT1 の活性化が関与していることが報告されている。急性大腸炎モデルにおいて野生型マウスと STAT1 欠損マウスを用いた検討で、野生型マウスにおける STAT1 の活性化と 16S rRNA ファイロタイプの変化が報告されている (Berry et al., 2012)。急性大腸炎モデルにおいて STAT1 欠損マウスではヒアルロン酸による白血球の接着が減弱し、腸炎が改善したと報告されている。(Bandyopadhyay et al., 2008)。急性大腸炎モデルマウスにおいて上皮特異的に STAT1 を欠損させることにより腸管上皮における CD8 陽性 TCR $\alpha\beta$  陽性グラナゼイム B 陽性 T 細胞が減少し、大腸炎の病態が改善することを報告している (Crnčec et al., 2012)。STAT1 欠損マウスを使用した急性大腸炎モデルにおいて大腸炎の病態が改善し、腸炎惹起性のマクロファージが少ないことにより、IFN- $\gamma$ -STAT1 シグナルが腸炎惹起性のマクロファージの産生に必要であると報告されている (Nakanishi et al., 2015)。2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid solution 腸炎モデルにおいてはリン酸化された Src homology region 2 domain-containing

phosphatase 2 が STAT1 シグナルと Th1 細胞の抑制を通して大腸炎を改善させると報告されている (Wu et al., 2015)。最近の研究では、IL-10rb 欠損マウスを用いた検討で STAT1 のシグナルにより CD4 陽性 T 細胞が NK 細胞により排除されることを防ぎ、大腸炎を発症させるとの報告がされている (Kang et al., 2019)。

ヒトの検体においてはクローン病患者の回腸嚢炎において活性化した STAT1 の増強がみられたとの報告がヒトの炎症性腸疾患患者における STAT1 活性化の最初の報告である (Kühbacher et al., 2001)。その後、クローン病、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織における STAT1 について、潰瘍性大腸炎患者の方がより活性化がみられ、その活性化は好中球および単球でみられたと報告された (Schreiber et al., 2002)。

現在、炎症性腸疾患に行われている治療は内科的治療、外科的治療など多岐にわたり、内科的治療としてはアミノサリチル酸製剤、コルチコステロイド、チオプリン製剤、カルシニューリン阻害剤、生物学的製剤などが使用される (Pithadia et al., 2011, Bernstein et al., 2015)。最近、生物学的製剤である抗 TNF- $\alpha$  抗体が治療薬として使用されるようになって治療成績は改善したが、耐性や二次無効例 (Gisbert et al., 2016, Gaujoux et al., 2019)、副作用 (Cohen et al., 2015) の問題があった。そのため、新たな標的分子に対しての分子標的治療薬が臨床使用されるようになっており、本邦や諸外国のガイドラインでも使用が推奨されている (Lamb et al., 2019, Nakase et al., 2021)。現在、本邦で使用可能な分子標的治療薬としては TNF- $\alpha$  のキメラ型モノクローナル抗体である Infliximab (Hanauer et al., 2002, Rutgeerts et al., 2005)、ヒト型抗 TNF- $\alpha$  抗体である Adalimumab (Hanauer et al., 2006, Sandborn et al., 2012a)、完全ヒト型抗 TNF- $\alpha$  抗体である Golimumab (Hibi et al., 2017)、抗 IL-12/p40 抗体である Ustekinumab (Teng et al., 2015; Feagan et al., 2016; Sandborn et al., 2012b)、経口 JAK 阻害剤である Tofacitinib (Sandborn et al., 2012c)、 $\alpha 4\beta 7$  integrin 抗体である Vedolizumab (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013; Motoya et al., 2019) があげられる。その他、Tofacitinib より JAK1 に対する選択性をより高めた Filgotinib (Feagan et al., 2021)、Upadactinib (Sandborn et al., 2020a) や IL-23p19 抗体である Risankizumab (Feagan et al., 2018)、Mirikizumab (Sandborn et al., 2020b, c) などに対する臨床実験が現在行われている。

本研究では、炎症性腸疾患の新たな発症メカニズムのとその治療への応用を目指し、TNF- $\alpha$  とは異なる標的分子として STAT1 シグナル伝達経路に着目した。DSS を用いた急性大腸炎モデルを構築し、大腸炎発症時の STAT1 の活性化を基軸

としたシグナルカスケードの病態への関与、作用機序の解明を試みた。さらにSTAT1欠損マウスの大腸組織に浸潤する各種炎症・免疫細胞についてフローサイトメトリー及び候補となる細胞を単離して遺伝子発現を解析し、病態の発症に関与す細胞の同定を行なった。さらにヒト臨床検体を使用した検証で、潰瘍性大腸炎患者の炎症を起こしている大腸組織に浸潤している各種炎症・免疫細胞と候補因子の発現を検証した。本研究で得られたデータを検討し、炎症性腸疾患の大腸炎の制御において、STAT1の活性化とその下流関連分子が有望な治療標的の一つとなり得る可能性を示した。

## 方法

### 実験動物

野生型C57BL/6マウスはCharles River Japan (Kanagawa, Japan)より購入した。STAT1欠損マウスは米国ワシントン大学のR.D. Schreiber博士より提供された。C57BL/6系統由来Ly5.1マウスは理化学研究所バイオリソース研究センターから購入した。全てのマウスは、特定病原体不在 (SPF) 環境下で飼育され、6~9週齢にて実験に使用した。本研究の遂行に伴う動物実験の計画 (14-0062, 19-0065) および遺伝子組み換え実験の研究計画 (2013-015, 2018-027) は、北海道大学の審査を受け承認された後に実施した。また動物実験は全て北海道大学の動物実験に関する規定に従って行った。

### インフォームド・コンセント

ヒト臨床検体を用いた研究計画については、北海道大学大学院医学研究院 (14-043)、遺伝子病制御研究所 (14-0004) の各倫理委員会の承認を得て行った。本臨床研究について患者に対して説明し、文書による同意を得たうえで、個人情報保護を厳密に行なって実施した。2名の潰瘍性大腸炎患者 (#1, 重症, Matts grade 4; #2, 中等症, Matts grade 3) が北海道大学病院で手術を施行された。検体 (採血および切除検体) は手術時に採取された。手術切除検体はホルマリン固定・パラフィン包埋組織として所定の実験室病理履行に従い、本研究に使用されるまで常温で保管した。本研究はヘルシンキ宣言に示されているヒト試料に関する諸原則に従い実施された。

### 試薬と抗体

フローサイトメトリー用の蛍光色素標識 分化した全ての造血細胞を標識する抗マウスCD45 抗体 (30-F11)、骨髄細胞、単球、マクロファージ、好中球、内皮細胞、T細胞の一部を標識する抗マウスLy6c 抗体 (HK1.4)、単球、NK細胞、顆粒球、マクロファージを標識する抗マウスCD11b 抗体 (M1/70)、単球、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、NK細胞を標識する抗マウスCD11c 抗体 (N418)、MHC class II抗マウスI-Ad抗体 (AF6-120.1)、ヘルパーT細胞を標識する抗マウスCD4 抗体 (GK1.5)、キラーT細胞を標識する抗マウスCD8 抗体 (53-6.7)、単球、

マクロファージ、顆粒球、末梢の好中球を標識する抗マウスGr-1 抗体 (RB6-8C5) 、MHC class Iを標識する抗マウスH-2K<sub>d</sub> 抗体 (AF6-88.5)は、BioLegend (San Diego, CA, USA) あるいはBD Biosciences (San Diego, CA, USA) より購入した。7AAD はBeckman Coulter (Brea, CA, USA) より購入した。リコンビナントマウスIFN- $\alpha$  (752802) およびIFN- $\beta$  (581302) はBioLegend (San Diego, CA, USA) より購入した。リコンビナントマウスIFN- $\gamma$  (300-2) はPeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) より購入した。Poly I:C (HMW) はInvivoGen (San Diego, CA, USA)より購入した。クロドロン酸リポソームおよびコントロールリポソーム (F70101-N)はFormuMax (Sunnyvale, CA, USA)より購入した。STAT1 阻害剤 (Fludarabine) は Selleckchem (Houston, TX, USA) より購入した。CCR2阻害剤 (RS504393) は Abcam (Cambridge, United Kingdom) より購入した。

### 細胞培養

マウスの脾臓の細胞および腹腔滲出細胞は、10% FCS、200 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、10 mM HEPES、0.05 mmol/L メルカプトエタノールを添加したRPMI-1640 細胞培地 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を使用し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 下で培養した。脾臓の細胞 ( $2.0 \times 10^6$ ) および腹腔滲出細胞 ( $5.0 \times 10^5$ ) を12穴の細胞培養プレートに播種しIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  (各50 ng/ml)を添加し、24時間後にフローサイトメトリーによる解析を行った。

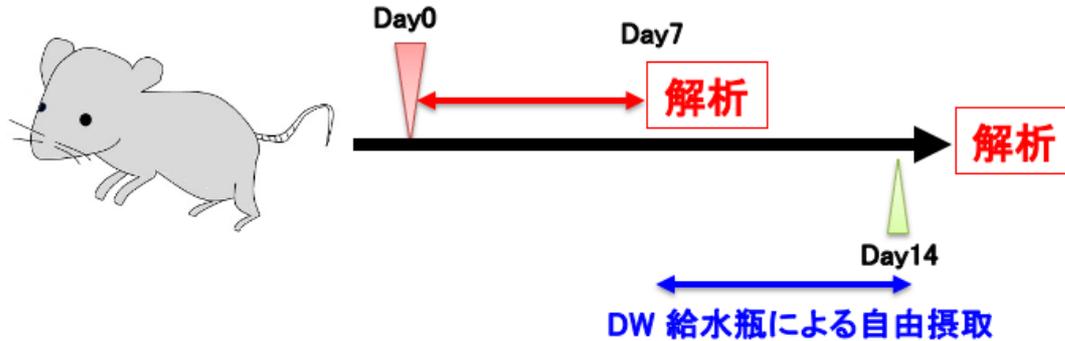
### DSS誘発大腸炎マウスモデル

野生型 C57BL/6マウスおよび同系STAT1欠損マウスに3% (w/v) DSS (Wako純薬)溶液を給水瓶から7日間自由摂取させることで大腸炎を発症させ、その後は通常の水を飲水させた。DSS投与後、7日、10日、14日でマウスを安楽死させ、体重推移、腸管の長さ、組織学的スコア、血清中サイトカイン産生量、大腸組織における免疫細胞などの評価を行った。

# 急性大腸炎モデル

C57BL/6野生型、STAT1欠損マウス

DSS (3% w/v) 給水瓶による自由摂取



## 各種解析・評価項目

1. 体重測定(DSS投与:Day0~Day7, Day7より通常のDWを給水)
2. 大腸組織の病理学的評価(HE染色、免疫染色)
3. 血清の採取(血清サイトカインレベルをELISAで測定)
4. 大腸の写真撮影、長さの計測
5. 大腸組織の回収および各種免疫細胞の解析

図 2. 急性大腸炎モデル

### 組織学的スコア

HE染色を行った大腸組織について炎症の程度、損傷の深さ、隠窩の損傷についてそれぞれ評価し、それに占める組織の割合によって数値をかけてスコアリングを行った。

・炎症の程度

0：なし、1：軽度、2：中等度、3：重症

・損傷の深さ

0：なし、1：粘膜、2：粘膜と粘膜下、3：貫壁性

・陰窩の損傷

0：なし、1：基部より1/3の損傷

2：基部より2/3の損傷

3：上皮の表面のみ損傷なし

#### 4：陰窩と上皮の完全な消失

・それぞれの項目について占める組織の割合によって以下の数値をかけてスコアリングを行った。×1 (0-25%)、×2 (26-50%)、×3 (51-75%)、×4 (76-100%)  
以下に組織学的スコアの代表例を示す。

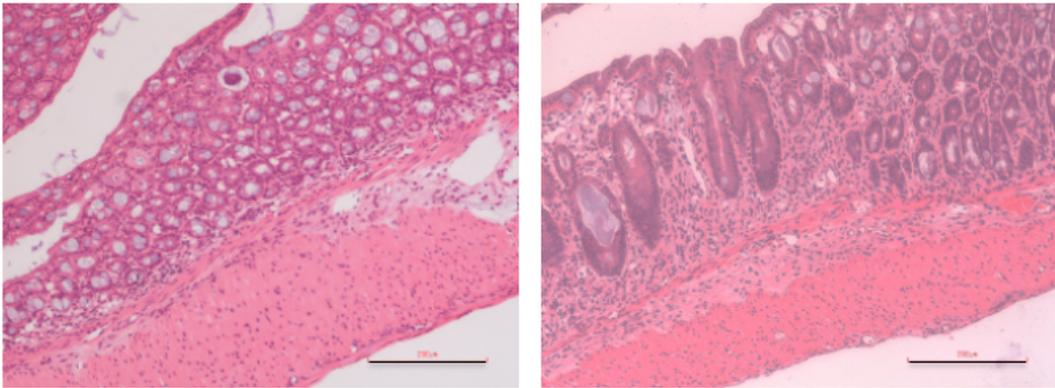


図 3. 組織学的スコアの代表図

左図 炎症の程度 1、損傷の深さ 1、陰窩の損傷 1

右図 炎症の程度 3、損傷の深さ 2、陰窩の損傷 2

直線は200µmを示す。

#### 免疫組織化学染色

急性大腸炎マウスモデルから得た大腸組織について、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を使用して固定した後、パラフィンを用いて包埋標した。脱パラフィンした後に、HE 染色を行なった。pSTAT1タンパク質の発現について、試薬キット (415211, Nichirei Bioscience, Inc., Tokyo, Japan) を使用して抗原を賦活化し、また内因性ペルオキシダーゼは0.3%の過酸化水素を使用して不活化した。洗浄後、一次抗体として抗pSTAT1 (Tyr701) 抗体 (#9167, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)を反応させた。反応後に 3 回洗浄し、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 マウス/ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Histofine Simple Stain MAX PO, Nichirei Bioscience, Inc., Tokyo, Japan) で反応させた。洗浄後にMayer のヘマトキシリンで核染色を行った。3-3'-diaminobezidine-4 HCL を用い、pSTAT1タンパク質の発現を可視化した。

## PCR 解析

細胞および組織より全RNA を ISOGEN RNA extraction kit (Nippon gene, Toyama, Japan) を用いて抽出し、波長260 nm の吸光度でRNA 濃度を測定した。得られた全DNA は逆転写PCR によりcDNA を得た。

また、マウスIL-6 (*Il6*)、IL-10 (*Il10*)、TNF- $\alpha$  (*Tnfa*)、STAT1 (*Stat1*)、IFNAR1 (*Ifnar1*)、CCR2 (*Ccr2*)、CCL2 (*Ccl2*)、NK2R (*Tacr2*)、IFN- $\alpha$  (*Ifna*)、IFN- $\beta$  (*Ifnb*)、tachykinin-1 (*Tac1*)、 $\beta$ -actin (*Actb*)遺伝子の発現レベルの解析を、定量PCR にて実施した。下記特異的プライマーおよびユニバーサルプローブを用い、CFX 連接定量 PCR 測定システム (BIO-RAD, CA, USA)により標的遺伝子の増幅を行った。各遺伝子におけるプライマー配列およびプローブの番号は、以下の通りである。*Il6* ; left: 5'-gctaccaaactggatataatcagga-3', right: 5'-ccaggtagctatggactccagaa-3', universal probe: #6、*Il10* ; left: 5'-cagagccacatgctcctaga-3', right: 5'-tgtccagctggctcctttgtt-3', universal probe: # 41、*Tnfa* ; left: 5'- -3', right: 5'- -3', universal probe: #49、*Stat1* ; left: 5'-tgagatgtcccggatagtgg-3', right: 5'-cgccagagagaaaattcgtgt-3', universal probe: #99、*Ifnar1* ; left: 5'-gggactacattgcgtctgc-3', right: 5'-tctgaacggcttccagaact-3', universal probe: #72、*Ccr2* ; left: 5'-acctgtaaatgcatgcaagt -3', right: 5'-tgtcttccatttctttgattg -3', universal probe: #27、*Ccl2* ; left: 5'-catccacgtgttgetca-3', right: 5'-gatcatcttgcgtggaatgagt-3', universal probe: #62、*Ifna* ; left: 5'-tcaagccatccttgcgttaa-3', right: 5'-gtctttgatgtgaagaggttcaa-3', universal probe: # 3、*Ifnb* ; left: 5'-ctggcttccatcatgaacaa-3', right: 5'-agagggctgtggtggagaa-3', universal probe: # 18、*Il12a* ; left: 5'-tcagaatcacaaccatcagca-3', right: 5'-cgccattatgattcagagactg-3', universal probe: # 49、*Il12b* ; left: 5'-tgaactggcgttgaagc-3', right: 5'-gcggtctggtttgatga-3', universal probe: # 74、および *Actb*; left: 5'-aaggccaaccgtgaaaagat-3', right: 5'-gtggtacgaccagaggcatac-3', universal probe: # 56。各遺伝子の発現はハウスキーピング遺伝子である $\beta$ -actinを用いて標準化し、 $\Delta\Delta Ct$  法 ( $\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{reference}}$ ) により相対的に比較検討した。

## ELISA

野生型および STAT1 欠損マウスを使用した急性大腸炎モデルより血清を回収した。血清 IL-6 および TNF- $\alpha$  タンパク質レベルについて、市販の Opt EIA mouse IL-6, TNF- $\alpha$  (BD Bioscience, San Diego, CA, USA)キットを用いて測定した。

## 大腸組織の免疫細胞のフローサイトメトリーによる解析と細胞の単離

マウス急性大腸炎モデルマウスより盲腸を除く大腸組織を摘出し、内容物を取り除き、PBSで洗浄した。上清を捨て、HBSS 1 mM EDTA (Ca, Mg free)を5 ml 入れ、振盪 (37°C, 20min) した。遠心し (1500 rpm, 3 min, 20 °C) 、上清を捨てた。1 mg/ml DNase I、1 mg/ml collagenase type IV (10 % FBS-RPMI) を2.5 ml ずつ入れてピペットを用いて懸濁し、その後37°Cで30分間インキュベートした。インキュベート後に15ml チューブに入れて遠心 (1500 rpm、5min、4 °C) し、上清を捨てて10%FBS/RPMI を加え、懸濁した。100 μm セルストレーナー、45 μm フィルターで漉した後に、懸濁液中の細胞数をカウントした。各種蛍光標識抗体を用いて細胞を染色し、FACS CantoII (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) によるフローサイトメトリーを行なった。得られたデータをFlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

マウス急性大腸炎モデルの大腸組織より回収した全細胞について、抗CD45抗体および抗CD11b抗体および7AADあるいは抗CD45抗体および抗Ly6C抗体および7AADを使用して染色し、7AAD 陰性のCD45陽性CD11b陽性細胞およびCD45陽性Ly6C陽性細胞を、FACS AriaII (San Diego, CA, USA) によって単離した。

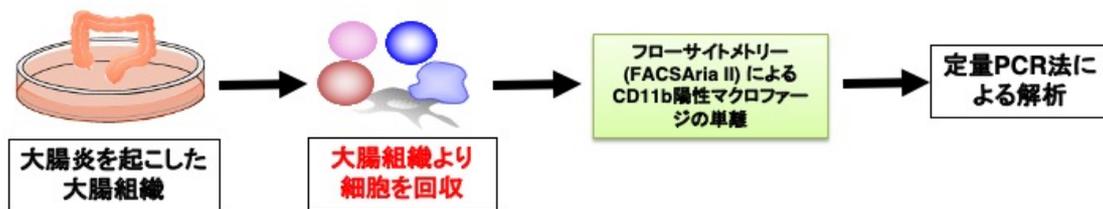


図 4. 急性大腸炎モデルにおける免疫細胞の単離と遺伝子発現の解析スキーム

## 免疫細胞の移入

急性大腸炎モデルで大腸炎を発症させた野生型 (CD45.1) マウスの大腸組織をDSS投与7日目に採取し、大腸組織内のLy6c陽性細胞を単離し、DSS投与4日目のSTAT1欠損 (CD45.2) マウスの尾静脈から静脈内に移植した。コントロールとしてPBSを静脈内に投与した。

## 統計学的分析

*In vitro* の実験系では少なくとも3~5回以上、独立して行なった。マウス生体モデルの実験は、各群4~10匹マウスずつ、2~3回以上独立して実施した。代表的な結果が図中に示されている。各データ群について平均値およびSDを計算して求めた。

多群間での比較について、一元配置分散分析 (ANOVA) とDunnettの多重検定を行なった。一部の試験で、二群間の差を評価する場合、Studentのt検定を用いて評価した。

本研究では $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

## 結果

### DSSを用いた急性大腸炎モデルを構築し、腸炎の発症を確認した

炎症性腸疾患の発症におけるSTAT1の関与について調べるため、急性大腸炎モデルを作出した。腸炎の発症によりDSS投与群では体重減少が生じ、DW群に比べて腸管の長さが短縮した。病理組織においてもDSS群では炎症細胞の浸潤や陰窩の損傷がみられた（図5）。

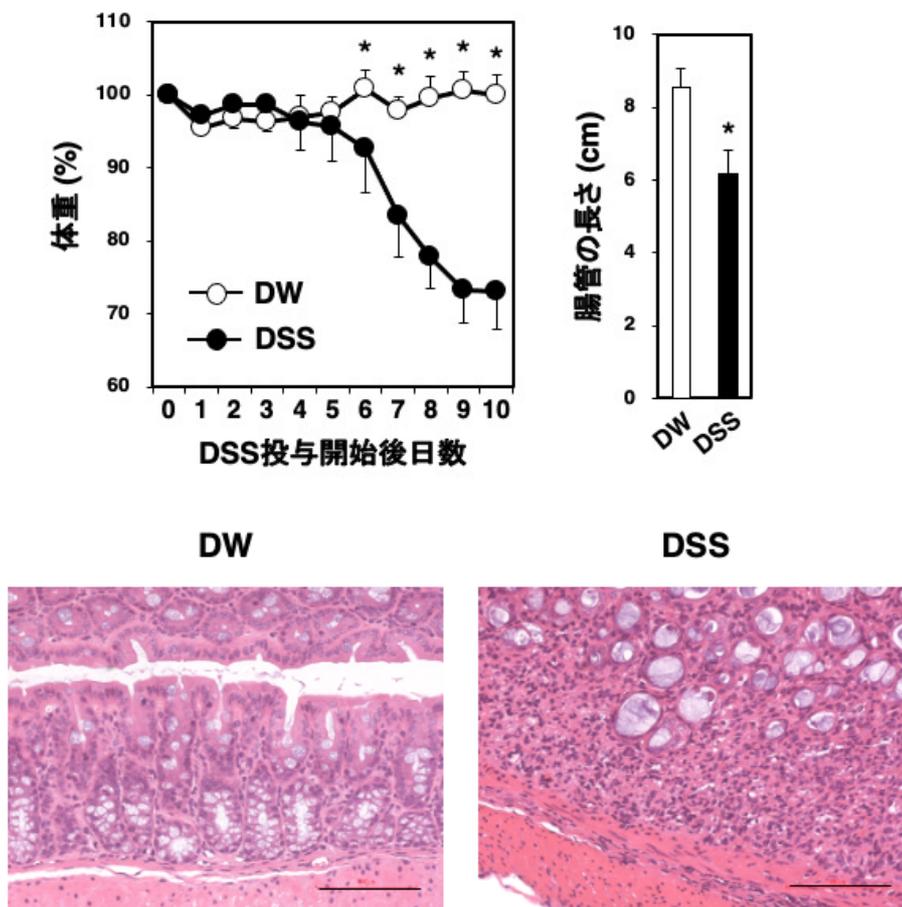


図5. 急性大腸炎モデルの作出

野生型 C57BL/6 マウスに DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させた群 (DSS、n=6) と通常飲水させた群 (DW、n=6) に分けて評価した。

体重推移を 10 日間測定し、投与開始日を 100%とした時の体重推移を評価した。

7 日目に大腸を採取し、大腸の長さを測定し、HE 染色を施行した。直線は 200 $\mu$ m を示す。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

急性大腸炎モデルの大腸組織においてI型IFN-STAT1のシグナルカスケードは活性化している

急性大腸炎モデルにおいて腸炎を発症したマウスの大腸組織においてIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ の遺伝子発現レベルは亢進し、IFN- $\gamma$ の遺伝子発現レベルは変わらなかった。さらにSTAT1の遺伝子発現レベルは亢進し、炎症部位におけるSTAT1蛋白はリン酸化され、活性化していた (図6)。

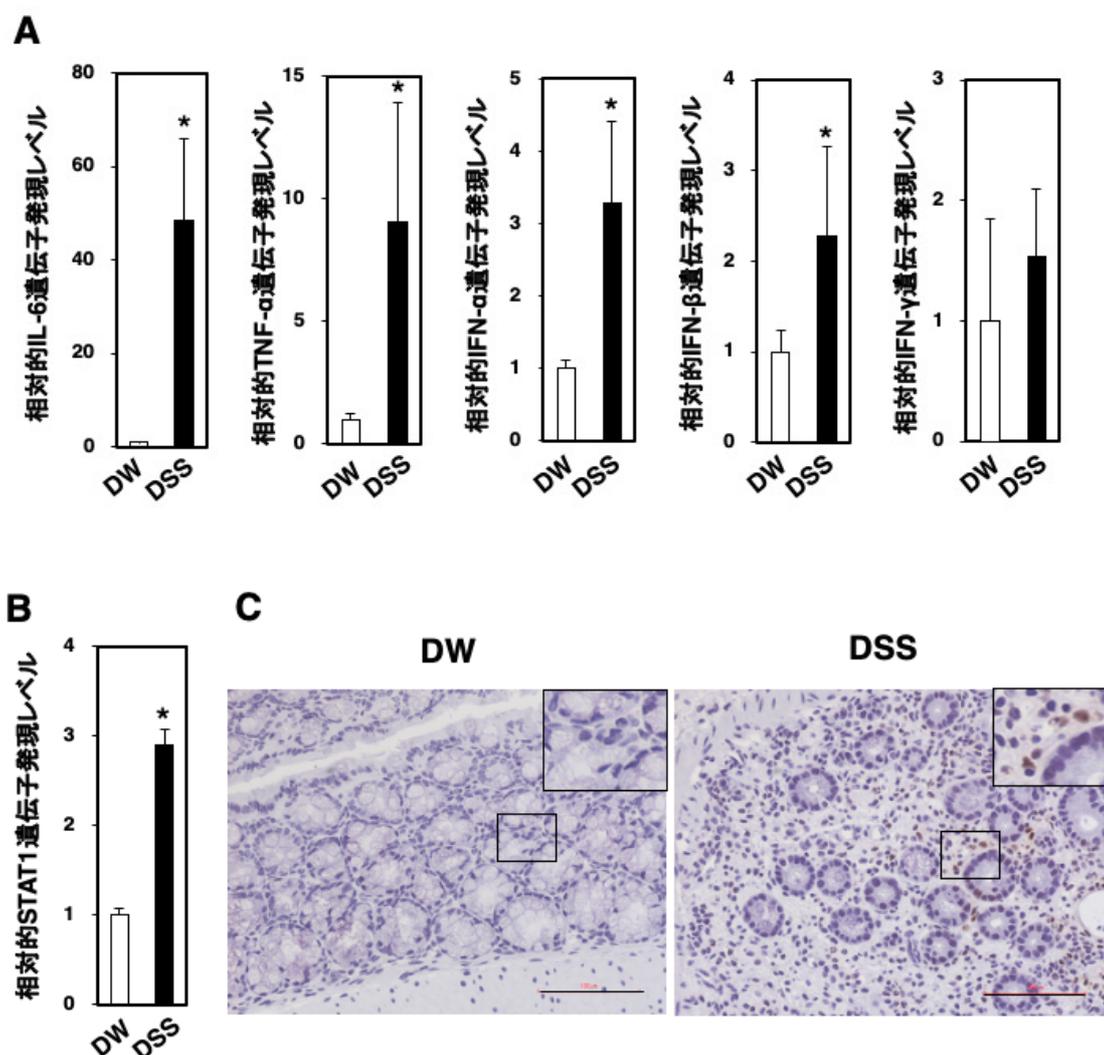


図 6. 急性大腸炎モデルの大腸組織において I 型 IFN-STAT1 シグナルカスケードは活性化している。

野生型 C57BL/6 マウスに DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させた群 (DSS, n = 6) と通常飲水させた群 (DW, n = 6) に分けて評価した。

大腸組織における IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  および IFN- $\gamma$  の遺伝子発現レベル (A) と STAT1

の遺伝子発現レベル (B) を PCR で評価した。大腸組織に免疫染色を行い、リン酸化 STAT1 蛋白の発現 (C) を評価した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルにおいてSTAT1欠損マウスでは野生型マウスに比べて腸炎の病態は改善する

急性大腸炎モデルの病態形成におけるSTAT1の関与について調べるため、野生型マウス (n=8) とSTAT1欠損マウス (n=9) を用いて評価を行った。STAT1欠損マウスでは野生型マウスに比べて体重減少の度合いが改善した (図7)。

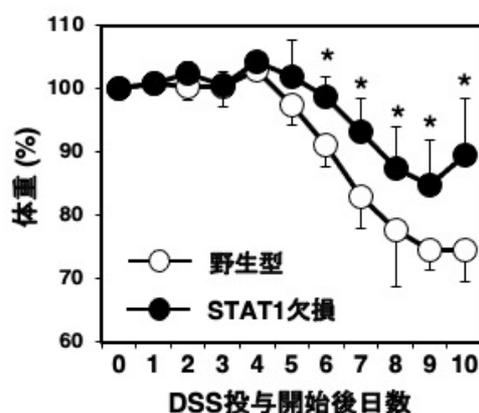


図7. 急性大腸炎モデルの野生型マウスとSTAT1欠損マウスにおける体重推移

野生型 C57BL/6 マウス (n=8) と同系 STAT1 欠損マウス (n=9) に DSS 水溶液を7日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させ、7日目から通常飲水をさせた。

体重推移を10日間測定し、投与開始日を100%とした時の体重推移を評価した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルにおいてSTAT1欠損マウスでは野生型マウスに比べて大腸炎の病態は改善する

次にSTAT1欠損マウスにおける病態の変化を評価するために、DSS投与7日目の大腸組織を採取したところ、STAT1欠損マウスでは野生型マウスに比べて腸管短縮の程度が改善し、腸炎の病態が改善していた。次に10日目に大腸組織を採

取し、病理所見を評価したところ、組織学的スコアがSTAT1欠損マウスで有意に改善した（図8）。

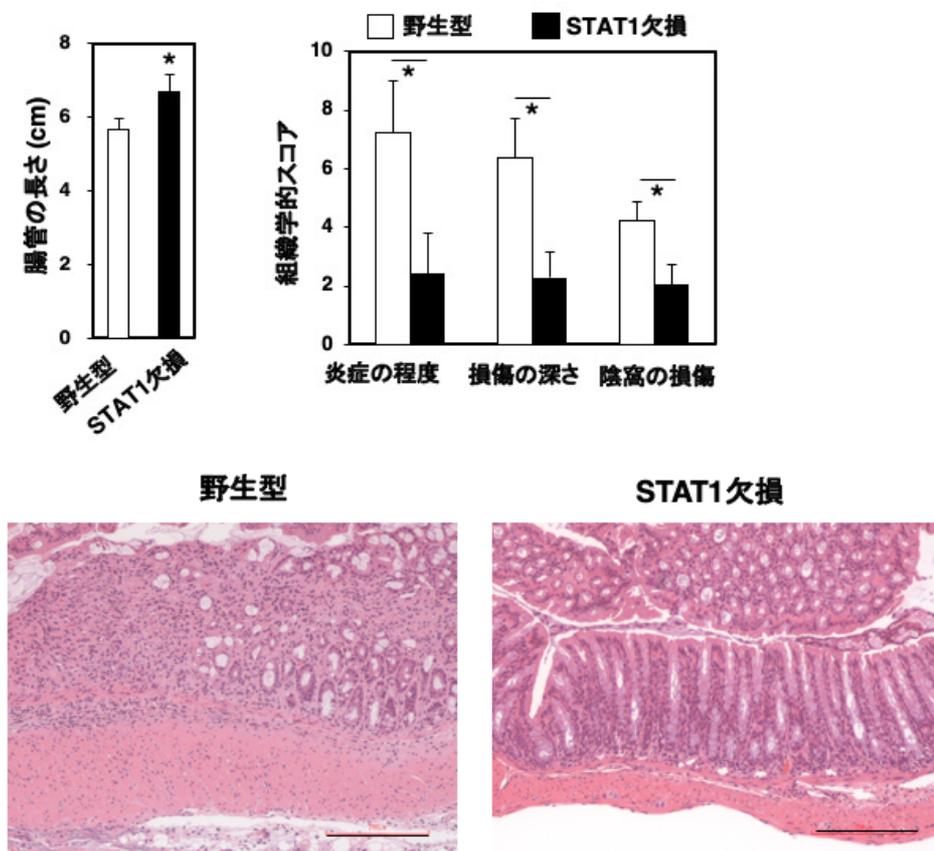


図 8. 急性大腸炎モデルの野生型マウスと STAT1 欠損マウスにおける大腸組織の比較

野生型 C57BL/6 マウス (n = 8) と同系 STAT1 欠損マウス (n = 9) に DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目から通常飲水をさせた。

7 日目に大腸を採取し、大腸の長さを測定した。10 日目に大腸組織を採取し、HE 染色を施行し、組織学的スコアを評価した。直線は 500 μm を示す。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルにおいてSTAT1欠損マウスでは野生型マウスに比べて大腸炎の病態は改善する

次にSTAT1欠損マウスにおける全身における炎症の状態を評価するために、DSS投与7日目における血清中の炎症性サイトカインを評価した。マウス血清中のIL-6、TNF- $\alpha$ はSTAT1欠損マウスにおいて有意に低下していた（図9）。以上

のことから急性大腸炎モデルにおいてSTAT1シグナルの欠損は大腸炎の病態を改善し、炎症を改善させることが示唆された。

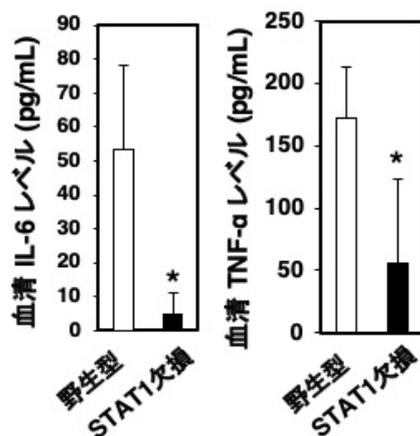


図 9. 急性大腸炎モデルの野生型マウスと STAT1 欠損マウスの比較

野生型 C57BL/6 マウス (n = 8) と同系 STAT1 欠損マウス (n = 9) に DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目から通常飲水をさせた。

7 日目におけるマウス血清 IL-6、TNF- $\alpha$  レベルを ELISA で測定した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルにおいて野生型マウスの骨髄細胞をSTAT1欠損マウスに移入することで大腸炎による体重減少は増悪する

次にSTAT1依存的な大腸炎の発症、病態に関与する責任細胞を明らかにするため、野生型マウスあるいはSTAT1欠損マウスの骨髄細胞を急性大腸炎モデルに移植する実験を行った。6日目の体重は野生型マウスに野生型マウスの骨髄細胞を移植した群ではSTAT1欠損マウスに野生型マウスの骨髄細胞を移植した群に比べて有意に低下していた。10日目の体重はSTAT1欠損マウスの骨髄移植を行ったSTAT1欠損マウスに比べ、野生型マウスの骨髄移植を行った野生型マウス、STAT1欠損マウスにおいて有意に低下していた (図10)。

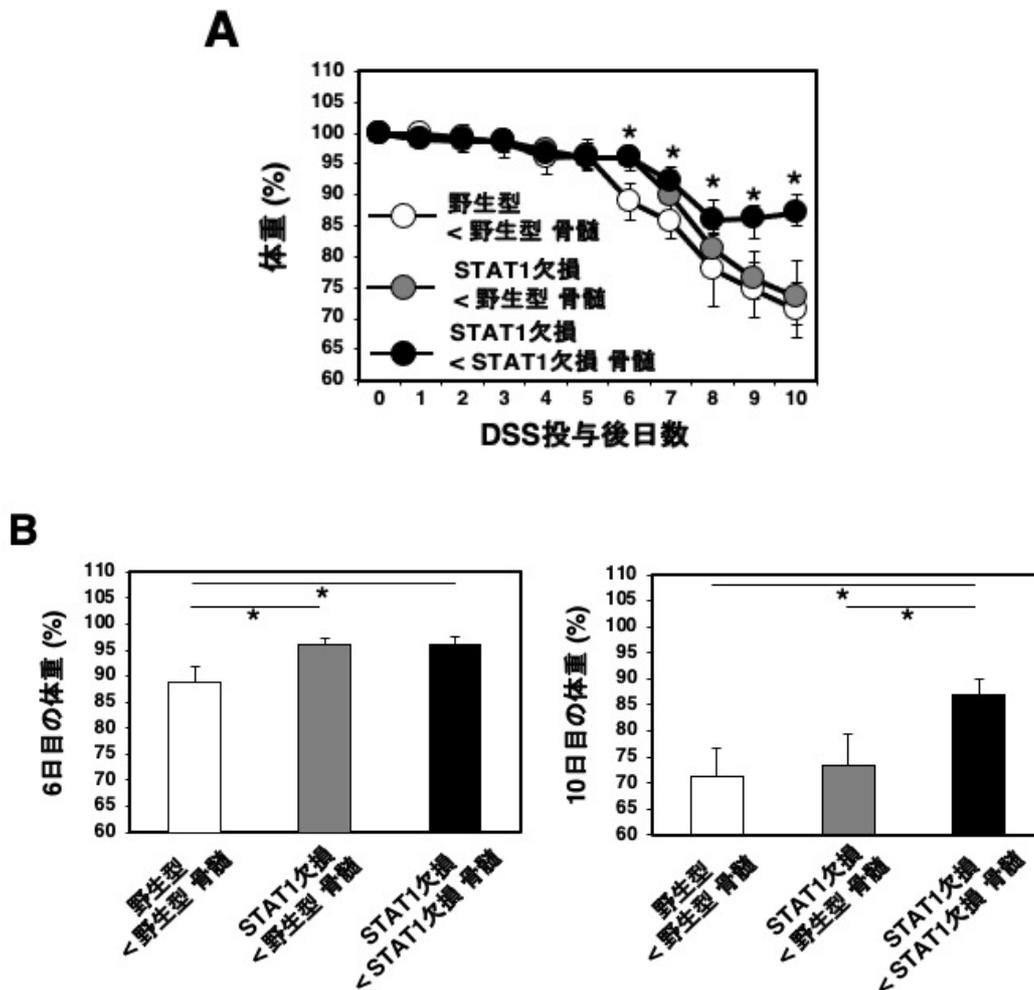


図 10. 急性大腸炎モデルの野生型マウスおよび STAT1 欠損マウスの骨髄細胞の移植

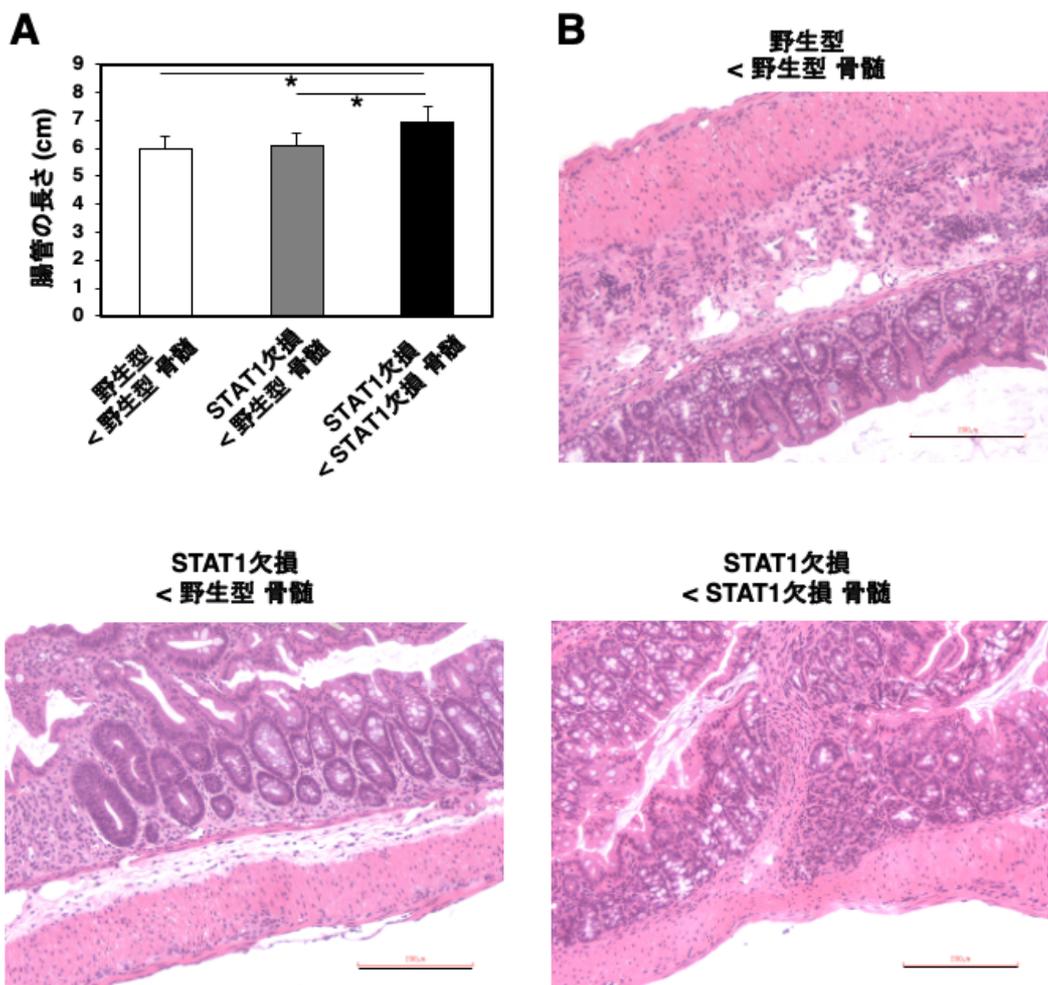
野生型 C57BL/6 マウス (n=8) および同系の STAT1 欠損マウス (n = 8)に、野生型 C57BL/6 マウス由来の骨髄細胞 ( $1 \times 10^7$  / 匹) を、また STAT1 欠損マウス (n=9) に、STAT1 欠損マウス由来の骨髄細胞 ( $1 \times 10^7$  / 匹) を尾静脈より移入した。これらのマウスについて、DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させ、7 日目から通常飲水させた。マウスの体重を移入後から 10 日間測定した。移入した日を 100%とした時の体重推移 (A) を評価し、DSS 投与 6 日目と 10 日目のデータをグラフ化した (B)。

\*はStudentのt検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

急性大腸炎モデルにおいて野生型マウスの骨髄細胞をSTAT1欠損マウスに移入することで腸炎の病態は悪化する

次に骨髄細胞の移植による病態の変化を評価するために採取した大腸組織を評価した。腸管の長さはSTAT1欠損マウスに野生型マウスの骨髄細胞を移植した群でSTAT1欠損マウスにSTAT1欠損マウスの骨髄細胞を移植した群に比べて有意に腸管短縮の程度が増悪していた。

STAT1欠損マウスではSTAT1欠損マウスの骨髄細胞の移植に比べて野生型マウスの骨髄細胞の移植により組織学的スコアの陰窩の損傷が有意に悪化していた。STAT1欠損マウスの骨髄細胞を移植されたSTAT1欠損マウスに比べて野生型マウスの骨髄細胞を移植された野生型マウスでは全ての組織学的スコアが有意に悪化していた。これらのことは急性大腸炎モデルの大腸炎発症において造血系細胞におけるSTAT1の活性化が関与することが示唆された (図11)。



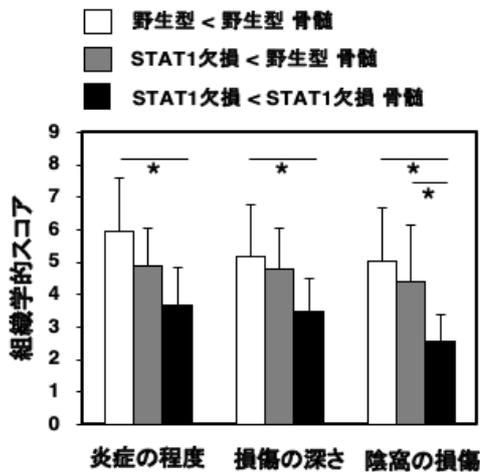


図 11. 急性大腸炎モデルの野生型マウスおよび STAT1 欠損マウスの骨髄細胞の移植

野生型 C57BL/6 マウス (n = 8) および同系の STAT1 欠損マウス (n = 8) に、野生型 C57BL/6 マウス由来の骨髄細胞 ( $1 \times 10^7$  / 匹) を、また STAT1 欠損マウス (n = 9) に、STAT1 欠損マウス由来の骨髄細胞 ( $1 \times 10^7$  / 匹) を尾静脈より移入した。これらのマウスについて、DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させた。7 日目に大腸を採取し、大腸の長さ (A) を測定した。大腸組織について HE 染色を施行し、組織学的スコアを評価した (B)。直線は 500  $\mu\text{m}$  を示す。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルの野生型マウスにおいてマクロファージの除去により大腸炎による体重減少が軽減する

次に急性大腸炎モデルにおいて、病態の発症に関連する細胞を検証するために野生型マウスにクロドロン酸リポソームを投与してマクロファージを除去する実験を行った。

クロドロン酸リポソームの投与によるマクロファージの除去により、大腸炎による体重減少の軽減を認めた (図 12)。

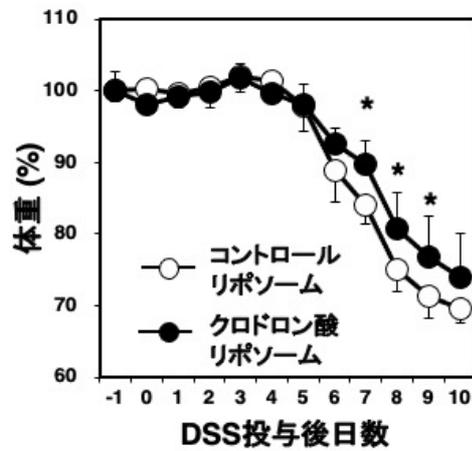


図 12. 急性大腸炎モデルの野生型マウスにクロドロン酸リポソームを投与し、マクロファージを除去したところ、体重減少は軽減する。

野生型 C57BL/6 マウスに DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目から通常飲水をさせた。DSS 投与開始前日、3 日目、7 日目に 150  $\mu$ g のコントロールリポソーム (n=9) およびクロドロン酸リポソーム (n=8) を腹腔内投与した。

投与開始日を 100%とした時の体重推移 (A) を評価した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルの野生型マウスにおいてマクロファージの除去により大腸炎による体重減少が軽減する

次にマクロファージの除去による病態の変化を評価するために、7 日目の大腸組織の評価を行ったところ、クロドロン酸リポソームの投与によるマクロファージの除去により、腸管短縮の軽減、組織学的スコアの改善を認めた(図 13)。

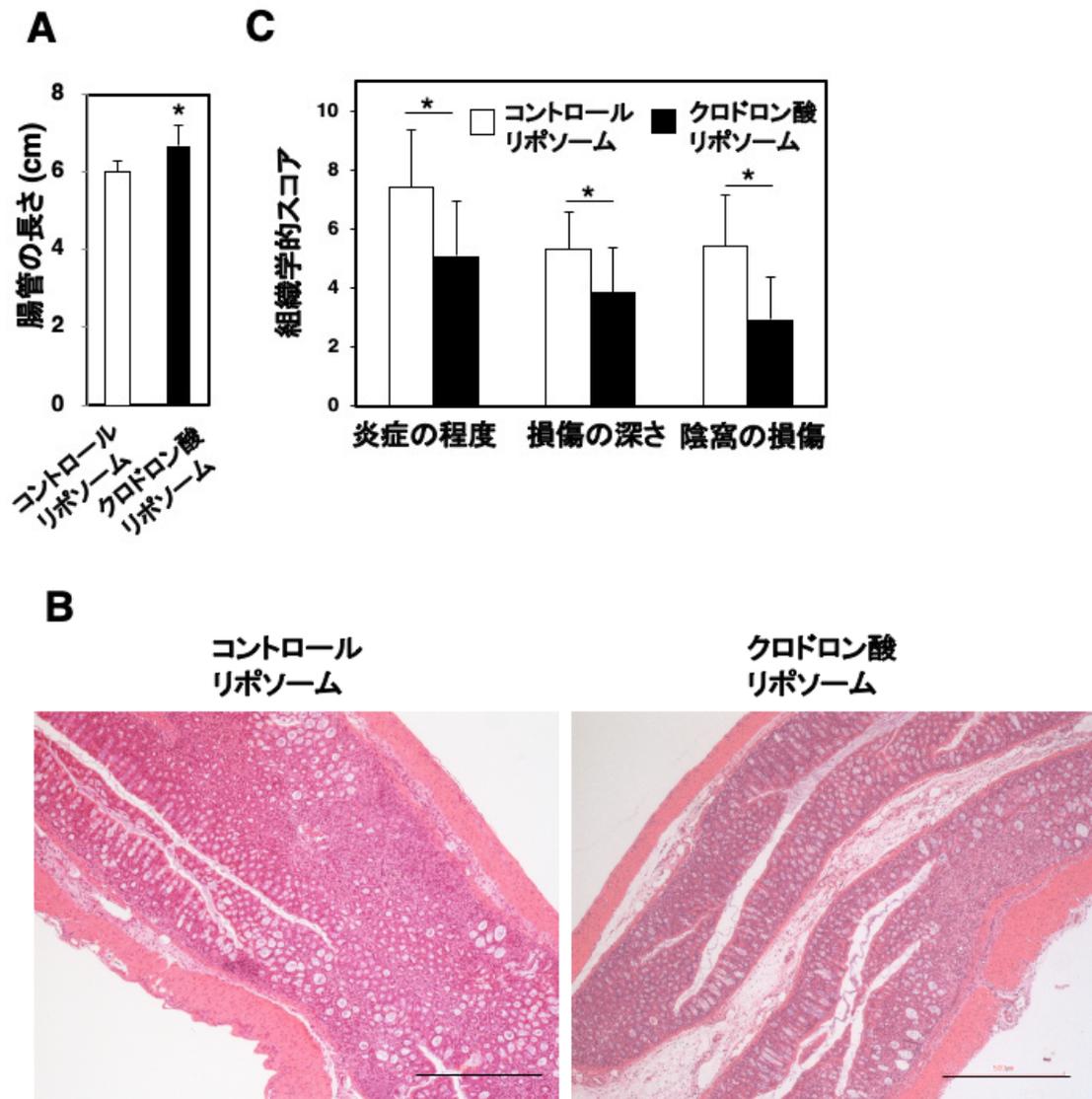


図 13. 急性大腸炎モデルの野生型マウスにクロドロン酸リポソームを投与し、マクロファージを除去したところ、大腸炎の病態は改善する。

野生型 C57BL/6 マウスに DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目から通常飲水をさせた。DSS 投与開始前日、3 日目、7 日目に 150  $\mu$ g のコントロールリポソーム (n = 9) およびクロドロン酸リポソーム (n = 8) を腹腔内投与した。7 日目に大腸を採取し、大腸の長さ (A) を測定した。直線は 500  $\mu$ m を示す。大腸組織について HE 染色を施行し (B)、組織学的スコアを評価した (C)。\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

急性大腸炎モデルの大腸組織における集積するCD4陽性細胞、CD8陽性細胞、CD11b陽性細胞、CD11c陽性細胞、Gr-1陽性細胞の割合は野生型マウスとSTAT1欠損マウスで変わらない。

次に急性大腸炎モデルにおけるpathogenic cellを検証するために大腸組織に集積する免疫細胞について評価を行った。野生型マウスとSTAT1欠損マウスの大腸組織の免疫細胞をフローサイトメトリーで比較したところ、7AAD陰性CD45陽性細胞の数および全細胞中の7AAD陰性CD45陽性細胞の割合ともに有意差はなかった。7AAD陰性CD45陽性細胞中のCD4陽性細胞、CD8陽性細胞、CD11b陽性細胞、CD11c陽性細胞、Gr-1陽性細胞の割合も野生型マウスとSTAT1欠損マウスで有意差はなかった（図14）。

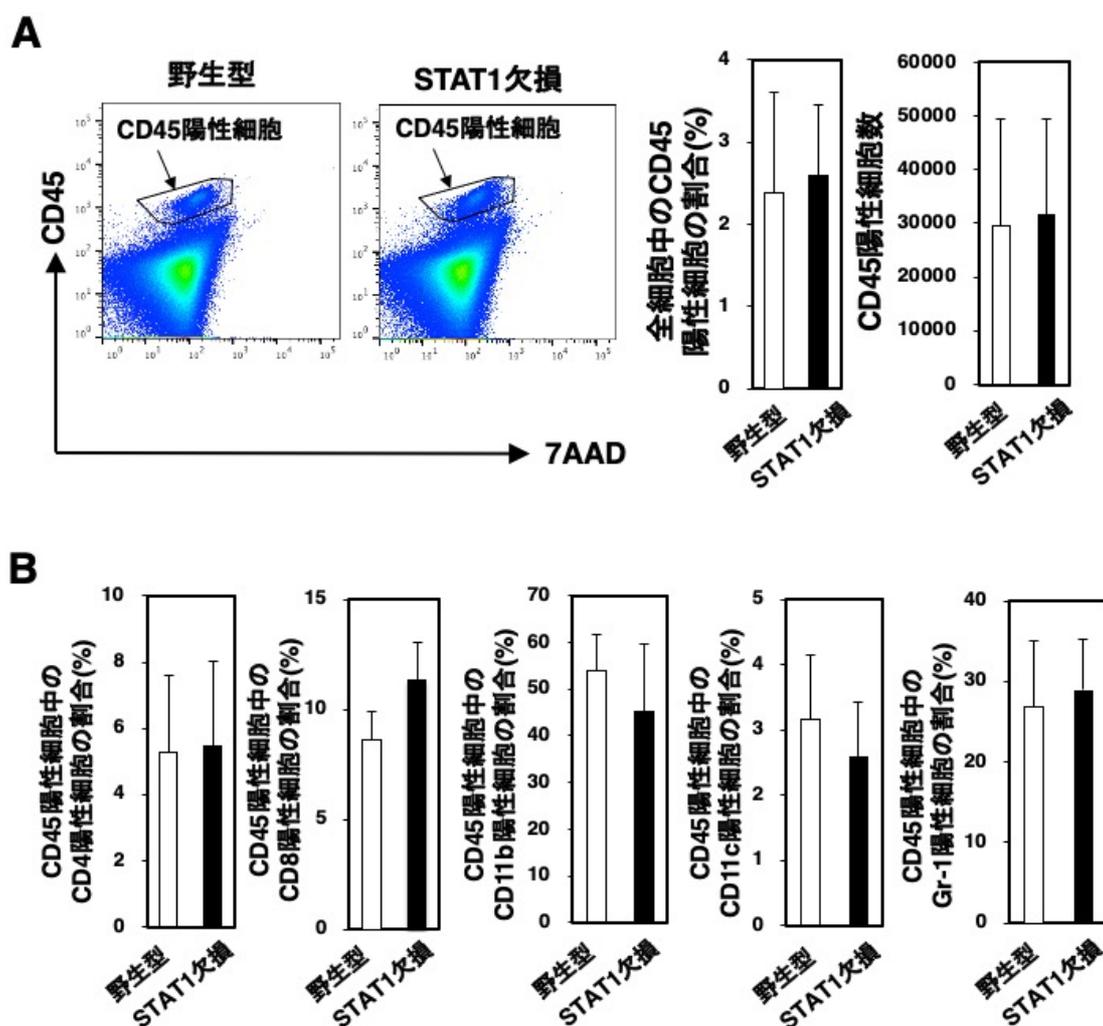


図 14. 急性大腸炎モデルの野生型マウスおよびSTAT1欠損マウスの大腸組織における免疫

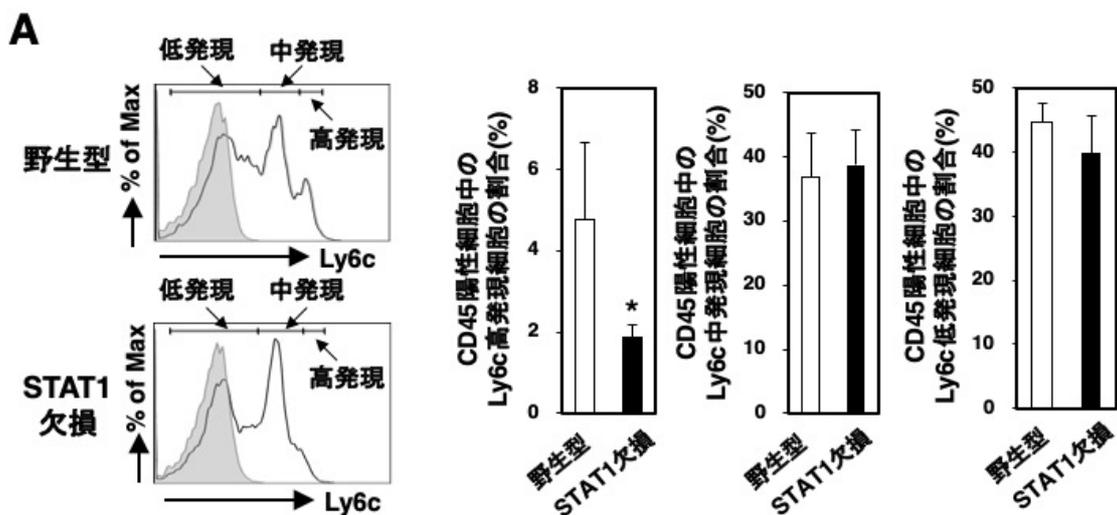
## 細胞の評価

野生型 C57BL/6 マウス(n = 4-6)と同系 STAT1 欠損マウス (n = 4-6) に DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させた。7 日目に大腸組織を採取し、大腸組織内の 7AAD 陰性 CD45 陽性細胞の割合、数をフローサイトメトリーで評価した (A)。7AAD-CD45+細胞の数は大腸組織から採取した全細胞数から計算した。データは 1 群 4-6 匹のマウスで 4 回の実験から算出した。

CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞および Gr-1 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにより算出した (B)。

## 急性大腸炎モデルの大腸組織においてLy6c高発現細胞はSTAT1依存的に誘導される

次に急性大腸炎モデルの大腸組織に集積する免疫細胞のsubpopulationについてフローサイトメトリーで評価を行った。CD45陽性7AAD陰性細胞中のLy6c高発現細胞が野生型マウスに比べてSTAT1欠損マウスでは有意に集積が低下していることがわかった。このことから急性大腸炎モデルの大腸組織においてLy6c高発現細胞はSTAT1依存的に誘導されていることが示唆された。また、Ly6c高発現細胞はCD11bを発現し、CD11cを部分的に発現し、Gr-1を中程度発現していた (図 15)。



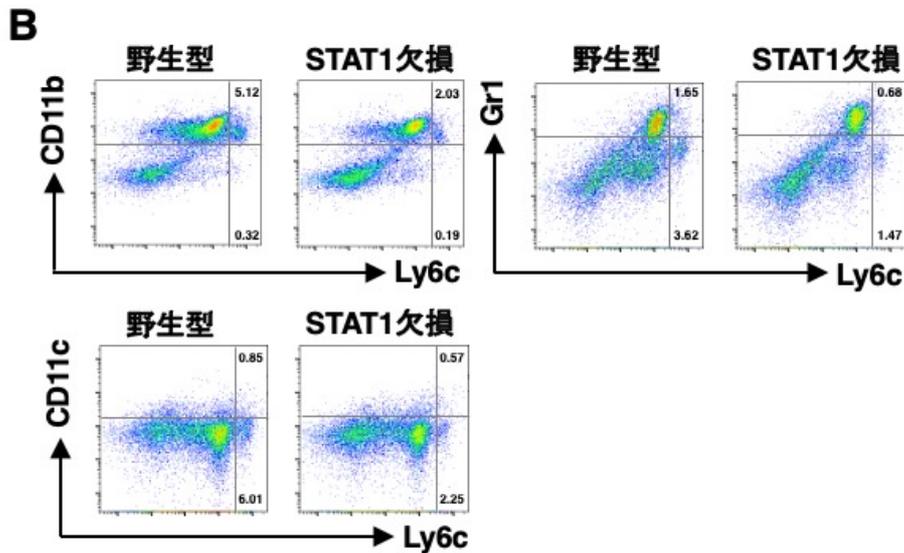


図 15. 急性大腸炎モデルの野生型マウスおよびSTAT1欠損マウスの大腸組織におけるLy6c高発現細胞の細胞集団の評価

野生型 C57BL/6 マウス (n = 4-6) と同系 STAT1 欠損マウス (n = 4-6) に DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させた。7 日目に大腸組織を採取し、大腸組織内の 7AAD 陰性 CD45 陽性細胞中の Ly6c 陽性細胞をフローサイトメトリーで評価し、Ly6c 高発現細胞、Ly6c 中発現細胞、Ly6c 低発現細胞の割合をそれぞれ評価した (A)。データは 1 群 4-6 匹のマウスで 4 回の実験から算出した。Ly6c 陽性細胞における CD11b、Ly6G/C および CD11c の発現をフローサイトメトリーで評価した (B)。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルの大腸組織においてLy6c高発現マクロファージはIL-6、CCL2/CCR2の遺伝子発現を誘導し、Ly6c中発現マクロファージはTNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現を誘導する

次にSTAT1依存的に誘導されるLy6c高発現マクロファージの性質を検討するために、Ly6c陽性マクロファージについて炎症関連のケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカインの遺伝子発現を検討することとした。大腸炎を起こした野生型マウスの大腸と脾臓から全細胞を回収し、Ly6c陽性細胞、Ly6c高発現細胞、Ly6c中発現細胞をCD45陽性7AAD陰性細胞の中から単離した。単離した細胞における炎症性サイトカイン、ケモカイン、ケモカイン受容体の遺伝子発現レベルを定量PCR法で評価した。Ly6c高発現細胞におけるIL-6、CCR2およびCCL2の遺伝子発現レベルはLy6c中発現細胞に比べて高かった。Ly6c中発現細胞における

TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現レベルはLy6c高発現細胞に比べて高かった。さらに大腸組織のLy6c陽性細胞におけるIL-6、TNF- $\alpha$ 、CCR2、CCL2の遺伝子発現レベルは脾臓のLy6c陽性細胞に比べて高かった。これらの結果は、Ly6c陽性マクロファージが腸炎の発症時に炎症を起こすエフェクター細胞に分化することを示唆した (図16)。

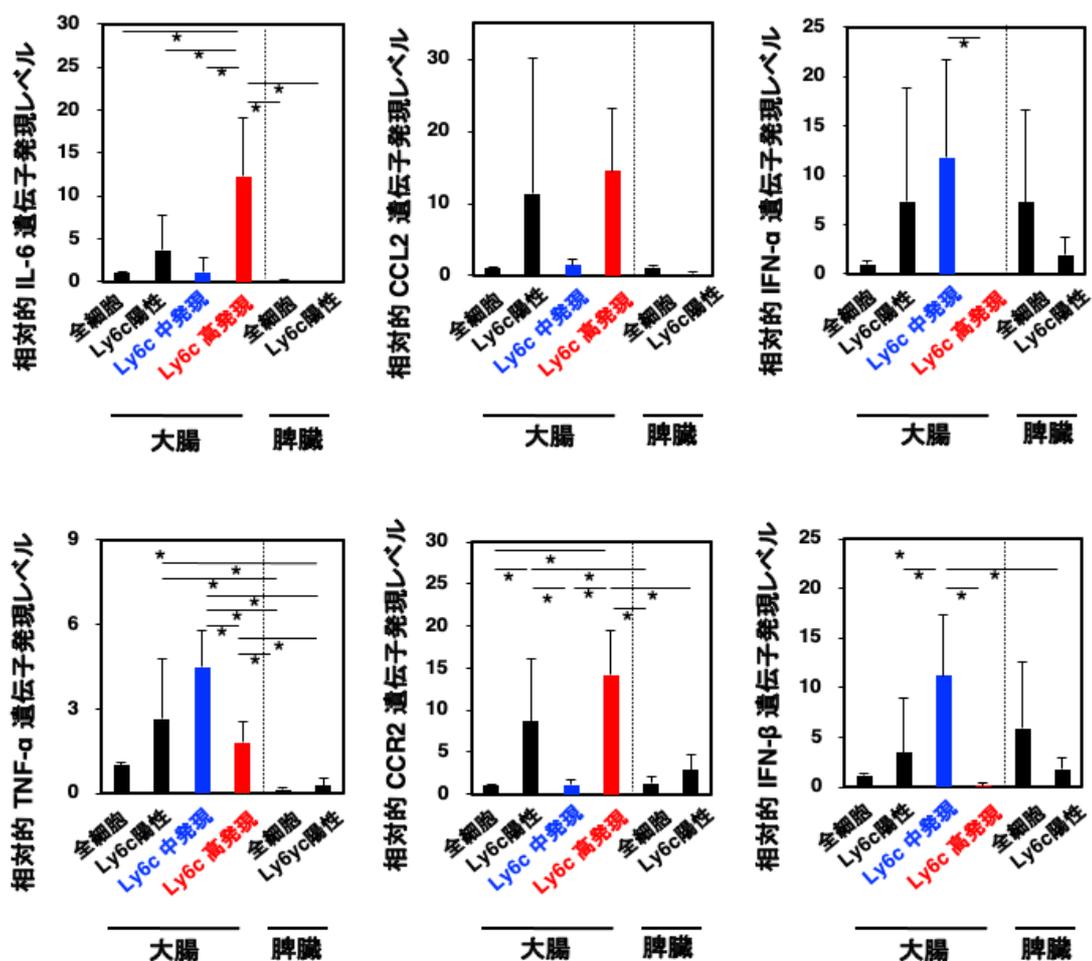


図 16. Ly6c 高発現マクロファージでは IL-6、CCL2、CCR2 の遺伝子発現が亢進し、Ly6c 中発現マクロファージは TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  の遺伝子発現が亢進する

DSS 水溶液を飲水させて大腸炎を発症させた野生型 C57BL/6 マウスの大腸と脾臓の細胞の全細胞と Ly6c 陽性マクロファージを採取した。データは 1 群 13-21 匹のマウスで 4 回の実験から得られたものである。CD45 陽性 7AAD 陰性 Ly6c 陽性マクロファージ、CD45 陽性 7AAD 陰性 Ly6c 高発現マクロファージ、CD45 陽性 7AAD 陰性 Ly6c 中発現マクロファージを野生型マウスの大腸組織から単離した。CD45 陽性 7AAD 陰性 Ly6c 陽性マクロファージを野生型マウスの脾臓から単離した。それぞれの細胞における IL-6、TNF- $\alpha$ 、CCL2、CCR2、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  の遺伝子発現レベルを定量 PCR 法で評価した。定量 PCR 法は 2 回の独

立した各々のサンプルを duplicate で評価した。

\*は Dunnett の検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

急性大腸炎モデルの大腸組織においてLy6C陽性マクロファージはSTAT1依存的に腸炎を惹起するエフェクター細胞に分化している可能性が示唆された。

次に炎症を生じている大腸組織における遺伝子発現についてSTAT1シグナルの関与について検討するため、野生型マウスとSTAT1欠損マウスの大腸組織の全細胞の遺伝子発現の評価を行った。STAT1欠損マウスの大腸組織の全細胞におけるIL-6、TNF- $\alpha$ 、CCR2、CCL2の遺伝子発現レベルは野生型マウスの大腸組織の全細胞に比べて有意に低下していた (図17)。これらの結果と図15の大腸組織内のLy6c高発現マクロファージがSTAT1依存的であったこととあわせ、Ly6c陽性マクロファージがSTAT1依存的に腸炎を惹起するエフェクター細胞に分化する可能性が示唆された。

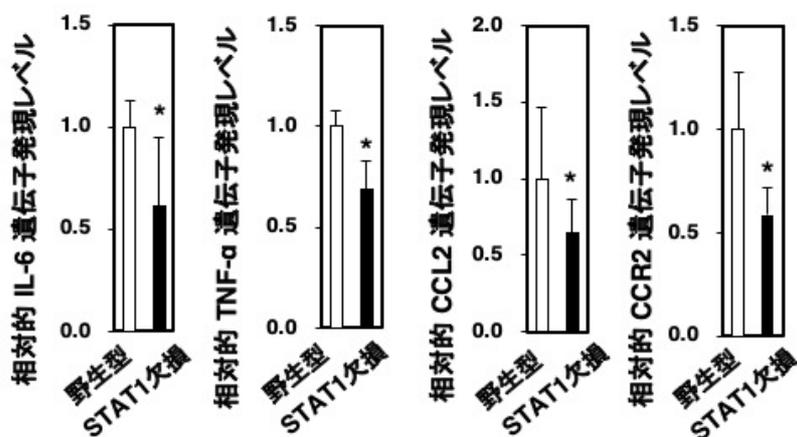


図 17. 野生型マウスと STAT1 欠損マウスの大腸組織の全細胞における遺伝子発現

DSS 水溶液を飲水させて大腸炎を発症させた野生型 C57BL/6 マウスと同系 STAT1 欠損マウスの大腸組織の全細胞を採取した。野生型マウスと STAT1 欠損マウスの大腸組織の全細胞における IL-6、TNF- $\alpha$ 、CCL2 および CCR2 の遺伝子発現レベルを定量 PCR 法で評価した。データは 1 群 13-21 匹のマウスで 4 回の実験から得られたもので、定量 PCR 法は 4 回の独立した各々のサンプルを duplicate で評価し、平均と標準偏差を算出した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

野生型マウスの脾臓の細胞と腹腔滲出細胞においてLy6c発現細胞はIFN- $\alpha/\beta$ の刺激によりSTAT1依存的に誘導される

次に大腸組織内でSTAT1依存的に誘導されるLy6c陽性マクロファージについて、*in vitro*培養系にて上流分子について検討するため、野生型マウスの脾臓の細胞と腹腔滲出細胞にI型およびII型IFNの刺激を行い、評価した。野生型マウスの脾臓の細胞と腹腔滲出細胞においてLy6c発現マクロファージはIFN- $\alpha$ およびIFN- $\beta$ で有意に誘導され、IFN- $\gamma$ による誘導は軽度であった。これらの結果から、I型IFNであるIFN $\alpha/\beta$ は大腸炎を惹起するLy6c発現マクロファージを誘導する上流分子である可能性が示唆された (図18)。

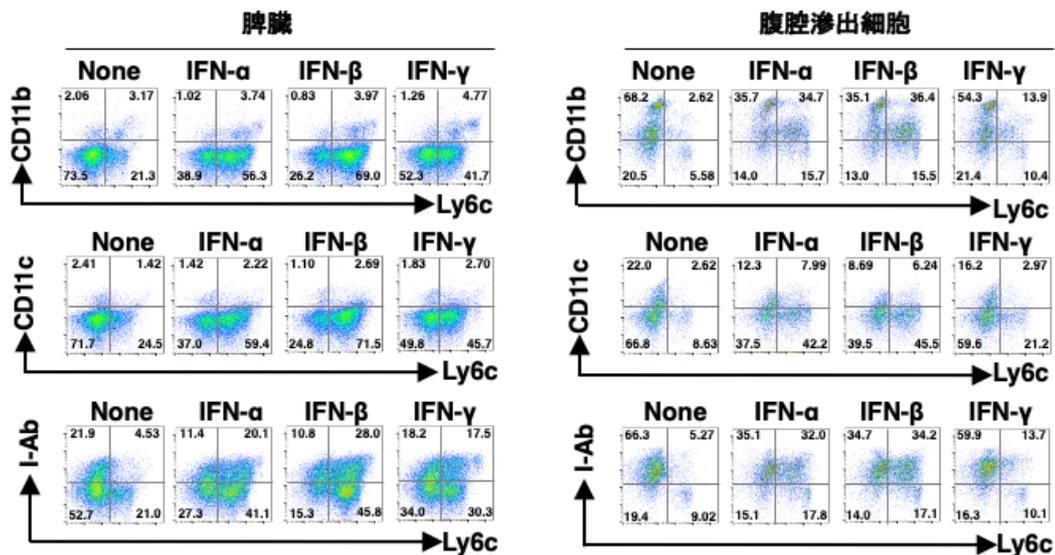


図 18. IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  による Ly6c 発現細胞の誘導

野生型 C57BL/6 マウス (n = 4) および同系 STAT1 欠損マウス (n = 4) の脾臓の細胞と腹腔滲出細胞を採取した。12 穴の細胞培養プレートに播種し、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  または IFN- $\gamma$  (各 50 ng/ml) を添加し、24 時間後にフローサイトメトリーによる解析を行った。各種 IFN 処理を行った脾臓の細胞と腹腔滲出細胞の Ly6c 発現細胞の CD11b、CD11c、I-Ab の発現レベルについてフローサイトメトリーで評価した。代表的なデータを示した。

野生型マウスの脾臓の細胞と腹腔滲出細胞においてLy6c発現細胞はIFN- $\alpha/\beta$ の刺激によりSTAT1依存的に誘導される

次にIFN- $\alpha/\beta$ によるLy6c陽性マクロファージの誘導におけるSTAT1シグナルの関与を検討するために、*in vitro*で野生型マウスとSTAT1欠損マウスにIFNs刺激を行い、評価した。I型IFNによるLy6c高発現細胞およびLy6c中発現細胞の誘導は

野生型マウスに比べてSTAT1欠損マウスの脾臓の細胞および腹腔滲出細胞においては軽度であった。これらの結果から、I型IFNであるIFN- $\alpha/\beta$ は、大腸炎を惹起するLy6c発現マクロファージをSTAT1依存的に誘導していることが示唆された (図19)。

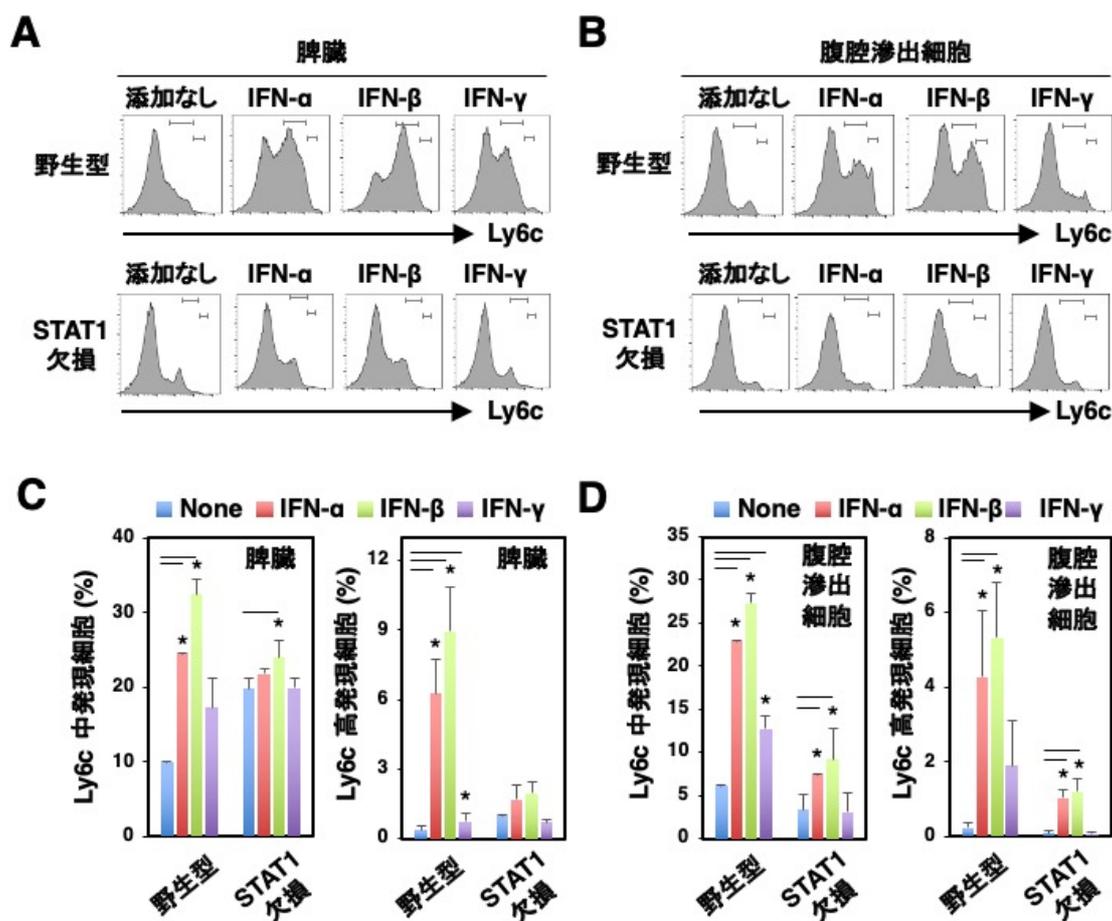


図 19. IFN- $\alpha/\beta$  は STAT1 依存的に Ly6c 発現細胞を誘導する

野生型 C57BL/6 マウス (n = 4) および同系の STAT1 欠損マウス (n = 4) の脾臓の細胞と腹腔滲出細胞を採取した。12 穴の細胞培養プレートに播種し、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  または IFN- $\gamma$  (各 50 ng/ml) を添加し、24 時間後にフローサイトメトリーによる解析を行った。

脾臓の細胞 (A) と腹腔滲出細胞 (B) における Ly6c の細胞内発現レベルについて刺激なし、IFN- $\alpha$  添加、IFN- $\beta$  添加、IFN- $\gamma$  添加の条件下での代表的なヒストグラムを示した。

刺激なし、IFN- $\alpha$  添加、IFN- $\beta$  添加、IFN- $\gamma$  添加の条件下で脾臓の細胞 (C) と腹腔滲出細胞 (D) において 7AAD 陰性 CD45 陽性細胞の中の Ly6c 高発現細胞と中発現細胞の割合をフローサイトメトリーで評価し、代表的なデータを示した。

データは 3 回の独立した実験で各々のマウスから 4 個のサンプルを採取し、平均と標準偏

差を算出した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 野生型マウスの脾臓の細胞と腹腔滲出細胞においてLy6c発現細胞はIFN- $\alpha/\beta$ の刺激によりSTAT1依存的に誘導される

次にIFN- $\alpha/\beta$ により誘導されるLy6c高発現マクロファージの特性を評価するために、in vitroで脾臓の細胞に対してIFN- $\alpha/\beta$ による刺激を加え、フローサイトメトリーで表面マーカーの発現を評価した。Ly6c高発現マクロファージはCD11b、CD11cおよびMHC class IIを部分的に発現していた (図20)。

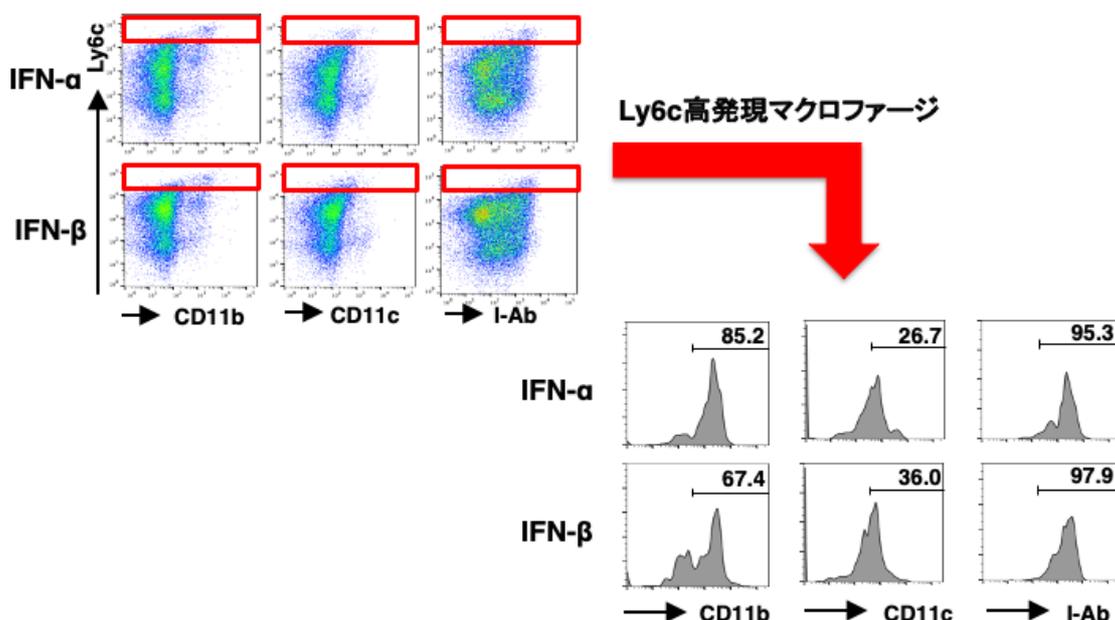


図 20. IFN- $\alpha/\beta$  刺激によって誘導された Ly6c 発現細胞は CD11b、CD11c、MHC クラス II を発現する

野生型 C57BL/6 マウス ( $n = 4$ ) の脾臓の細胞を採取した。12 穴の細胞培養プレートに播種し、IFN- $\alpha$  または IFN- $\beta$  (各 50 ng/ml) を添加し、24 時間後にフローサイトメトリーによる解析を行った。

IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  添加の条件下で脾臓細胞の Ly6c を高発現している細胞群における CD11b、CD11c および I-Ab (MHC クラス II) の細胞内発現レベルについての代表的なヒストグラムを示した。

### Ly6c陽性マクロファージを単離し、移入する実験の系

次に野生型マウスのLy6c陽性マクロファージの大腸炎の病態形成への関与を検討することとした。大腸炎を発症したC57BL/6 Ly5.1マウスの大腸組織から単離したLy6c陽性マクロファージを同系STAT1欠損マウスに移植したが、体重減少などの大腸炎の病態について改善はみられなかった (図21)。

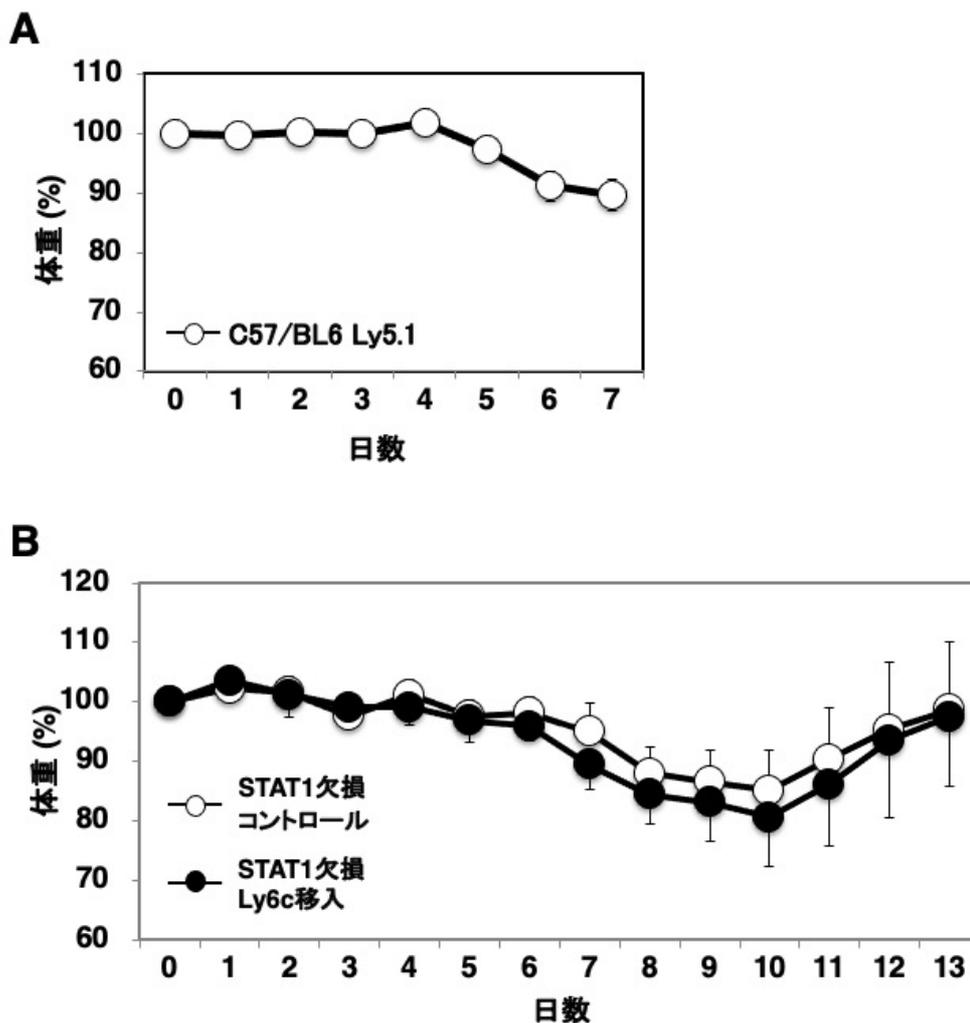


図 21. 大腸炎を発症した野生型マウスの Ly6c 陽性マクロファージの STAT1 欠損マウスへの移植

野生型 C57BL/6 Ly5.1 マウス (n = 17) と同系 STAT1 欠損マウス (n = 8) に DSS 水溶液を 7 日間飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目に DSS 水溶液と通常の水を置き換えた。

(A) 野生型 C57BL/6 Ly5.1 マウスの体重推移を 7 日間測定し、DSS 投与開始日を 100%とした時の体重推移を評価した。

7 日目に野生型 C57BL/6 Ly5.1 マウスの大腸組織を採取し、Ly6c 陽性細胞を単離した。単離

した Ly6c 陽性マクロファージ (細胞数  $4 \times 10^4$  / 匹) あるいはコントロールとして PBS を DSS 投与 4 日目の STAT1 欠損マウス (n=4, 4) に静脈注射して、移植した。

(B) 体重推移を 13 日間測定し、DSS 投与開始日を 100%とした時の体重推移を評価した。

### 急性大腸炎モデルにおいてCCR2を介したシグナル伝達を阻害すると野生型マウスにおいて大腸炎による体重減少は改善する

先の実験で炎症を生じている大腸組織の全細胞ではSTAT1シグナルの欠損条件下ではCCL2、CCR2の遺伝子発現が低下し (図17)、炎症を生じている大腸組織のLy6c高発現マクロファージではCCR2、Ly6c中発現マクロファージではCCL2の遺伝子発現が亢進していること (図16) が明らかになった。そのため、急性大腸炎モデルの大腸炎発症におけるCCR2を介したシグナル伝達の関与を検討することとした。急性大腸炎モデルマウスにおいてCCR2阻害剤を野生型マウスへ投与したところ体重減少は有意に改善したが、STAT1欠損マウスにCCR2阻害剤を投与しても体重減少の改善はみられなかった。これらの結果から、CCR2を介したシグナル伝達がSTAT1依存的に急性大腸炎モデルの病態発生に関与する可能性が示唆された (図22)。

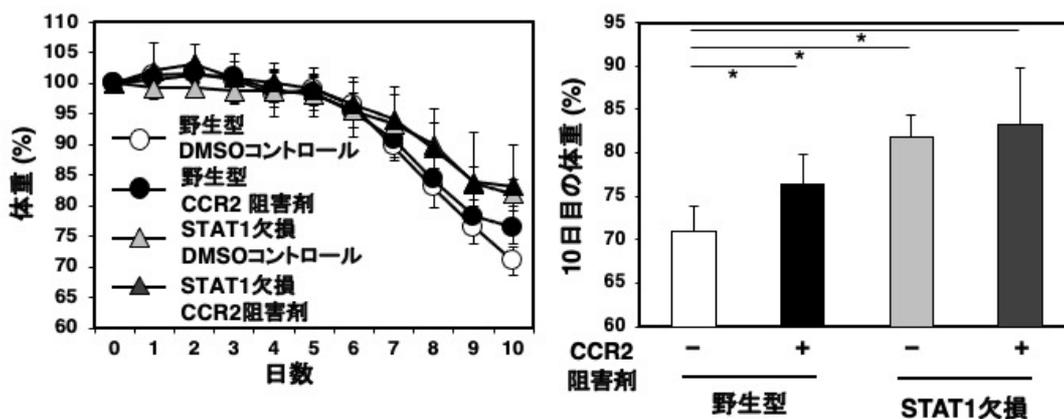


図 22. CCR2 阻害剤の野生型マウスへの投与により急性大腸炎モデルの体重減少は軽減する

野生型 C57BL/6 マウスに DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目から通常飲水をさせた。DSS 投与開始前日より CCR2 阻害剤 (20  $\mu$ g) を PBS 200  $\mu$ l に溶解した薬剤 (CCR2 阻害剤)、あるいは溶媒である DMSO を当量 PBS 200  $\mu$ l に溶解したコントロール薬剤 (DMSO コントロール)を連日腹腔内投与した。

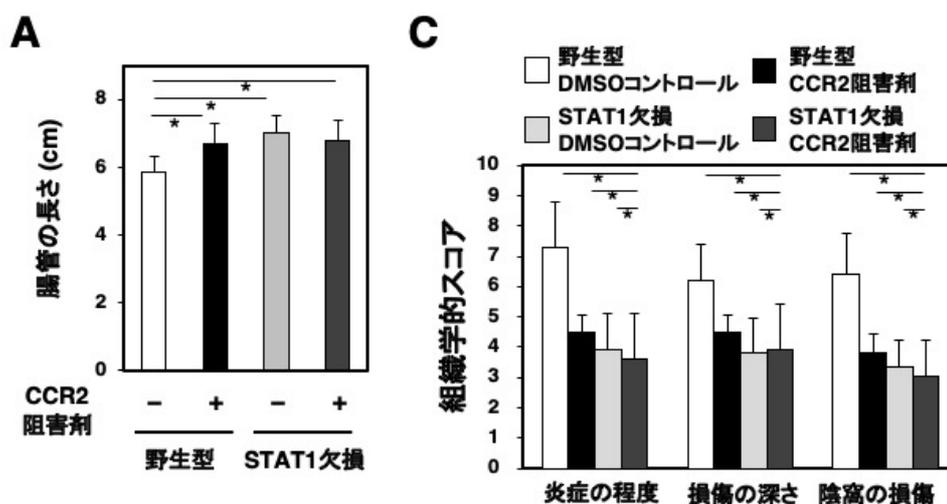
投与開始日を 100%とした時の体重推移と 10 日目の体重を評価した。

データは1群4-8匹のマウスで3回の独立した実験の代表的データを示す。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

### 急性大腸炎モデルにおいてCCR2を介したシグナル伝達を阻害すると野生型マウスにおいて腸炎の病態は有意に改善する

次に急性大腸炎モデルのCCR2阻害剤投与による大腸炎の病態改善を評価するために大腸組織の評価を行った。急性大腸炎モデルマウスにおいてCCR2阻害剤を野生型マウスに投与したところ腸管短縮はコントロール群に比べて有意に改善した一方でSTAT1欠損マウスにCCR2阻害剤を投与してもコントロール群に比べて腸管短縮の改善は見られなかった。大腸組織の病理所見は野生型マウスのコントロール群は野生型マウスのCCR2阻害剤投与群に比べてより重篤であったが、STAT1欠損マウスへのCCR2阻害剤投与群ではCCR2阻害剤を投与した野生型マウスとSTAT1欠損マウスのコントロール群と同様の結果であった。組織学的スコアはCCR2阻害剤の投与により野生型マウスではコントロール群に比べて有意に低下していた。STAT1欠損マウスのCCR2阻害剤投与群ではCCR2阻害剤を投与した野生型マウスとSTAT1欠損マウスのコントロール群と同様の結果であった。これらの結果によりCCR2を介したシグナル伝達がSTAT1依存的に急性大腸炎モデルの病態発生に関与していることが示唆された (図23)。



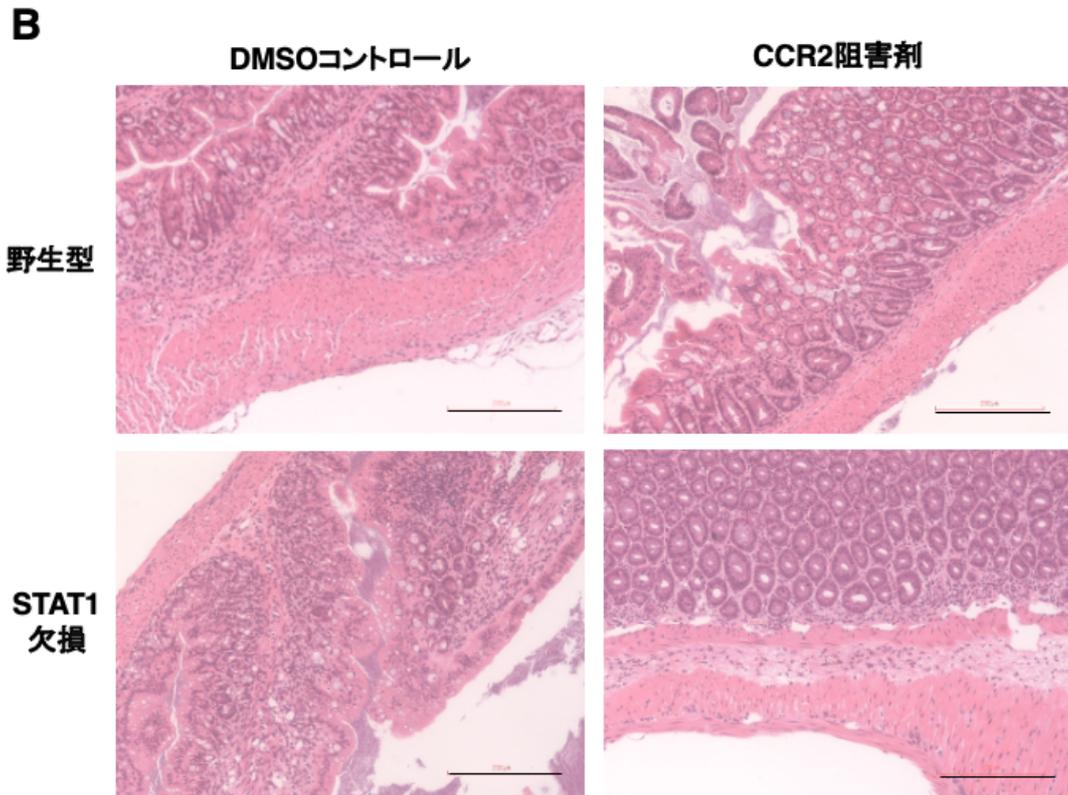


図 23. CCR2 阻害剤の野生型マウスへの投与により急性大腸炎モデルの腸炎の病態は軽減する

野生型 C57BL/6 マウスに DSS 水溶液を 7 日間給水ビンから自由飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目から通常飲水をさせた。DSS 投与開始前日より CCR2 阻害剤 (20  $\mu$ g) を PBS 200 $\mu$ l に溶解した薬剤 (CCR 阻害剤)、あるいは溶媒である DMSO を PBS 200 $\mu$ l に溶解したコントロール薬剤 (DMSO コントロール) を連日腹腔内投与した。

7 日目に大腸を採取し、大腸の長さ (A) を測定した。HE 染色 (B) を施行し、組織学的スコア (C) を評価した。直線は 500  $\mu$ m を示す。

大腸の長さのデータは 1 群 4-8 匹のマウスで 3 回の独立した実験の代表的データを示す。

HE 染色は代表的なデータを示す。組織学的スコアのデータは CCR2 阻害剤投与群、コントロール群とも n=8 で平均と標準偏差を算出した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

急性大腸炎モデルにおいて CCR2 を介したシグナル伝達を阻害すると野生型マウスにおいて血清中の炎症性サイトカインレベルは有意に低下する

次に急性大腸炎モデルのCCR2阻害剤投与による大腸炎の病態改善を評価するためにマウス血清中の炎症性サイトカインであるIL-6、TNF- $\alpha$ について評価を行った。マウスの血清IL-6およびTNF- $\alpha$ レベルは野生型マウスにCCR2阻害剤を投与することにより有意に低下したが、STAT1欠損マウスではコントロール群においても低値であり、CCR2阻害剤の投与による改善はみられなかった。これらの結果によりCCR2を介したシグナル伝達がSTAT1依存的に急性大腸炎モデルの病態発生に関与していることが示唆された (図24)。

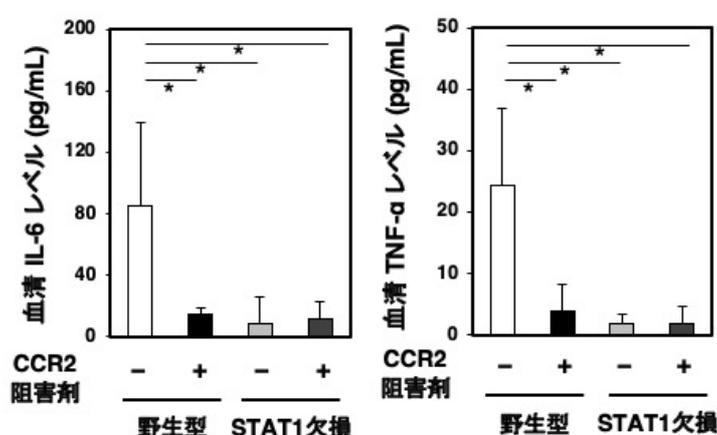


図 24. CCR2 阻害剤の投与は急性大腸炎モデルの病態を改善させる

野生型 C57BL/6 マウスと同系 STAT1 欠損マウスに DSS 水溶液を 7 日間飲水させて大腸炎を発症させ、7 日目に DSS 水溶液と通常の水を置き換えた。DSS 投与開始前日より CCR2 阻害剤 (20  $\mu$ g) を PBS 200 $\mu$ l に溶解した薬剤 (CCR 阻害剤)、あるいは溶媒である DMSO を PBS 200 $\mu$ l に溶解したコントロール薬剤 (DMSO コントロール) を連日腹腔内投与した。7 日目のマウス血清 IL-6、TNF- $\alpha$  レベルを ELISA で測定した。データは 1 群 5-8 匹のマウスを使用し、独立した 2 回の実験の代表的なデータである。

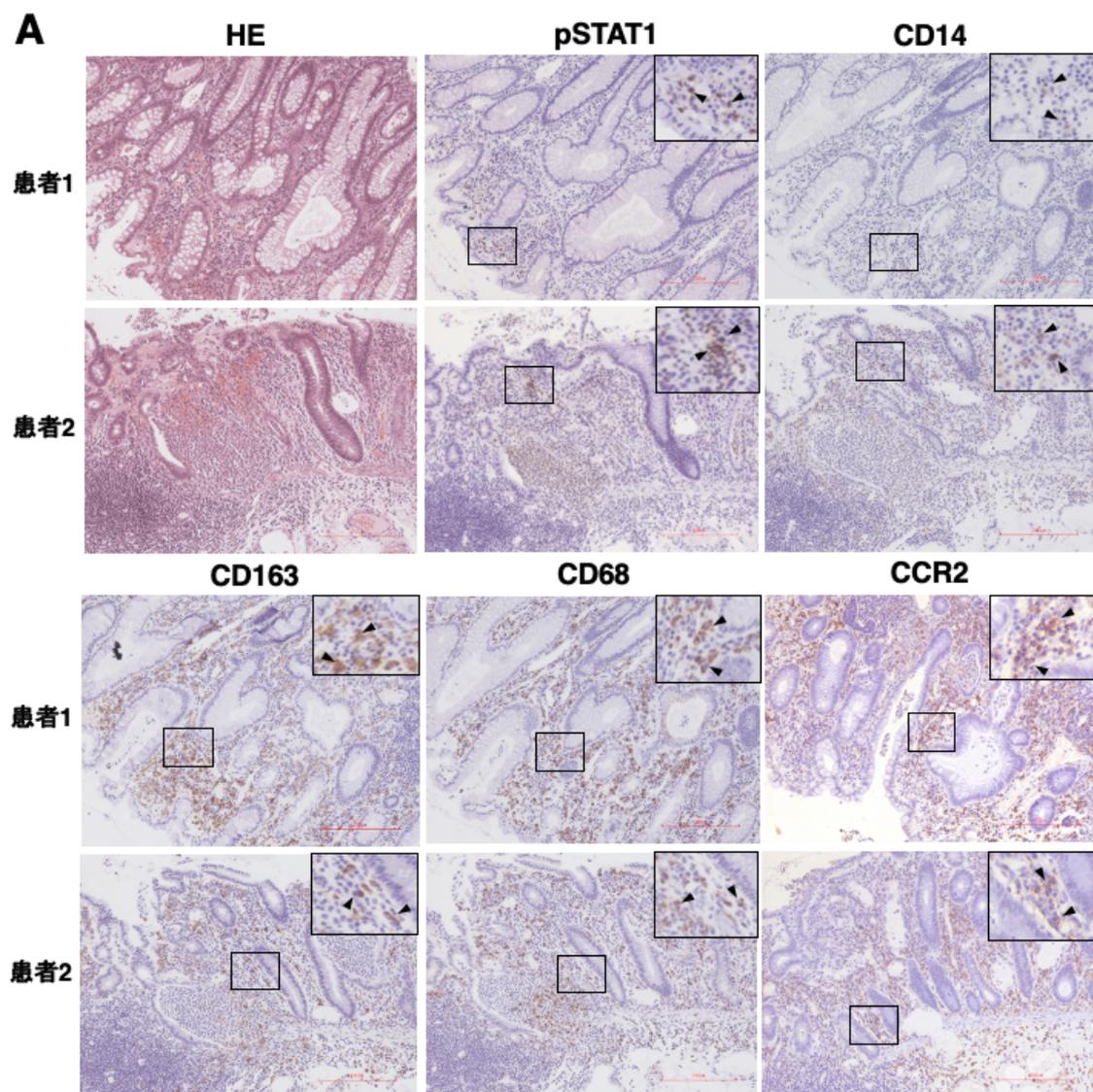
CCR2 阻害剤投与群 n=7、コントロール群 n=8 で平均と標準偏差を算出した。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

## CCR2を発現するマクロファージは潰瘍性大腸炎患者の大腸組織に集積している

次に潰瘍性大腸炎患者の炎症を起こしている大腸組織における STAT1 および CCR2 の発現について免疫組織化学染色で評価した。リン酸化した STAT1 および CCR2 が炎症を起こしている大腸組織内で認められ、CD14、CD68、あるいは

CD163 を発現する単球およびマクロファージの集積も認められた。大腸炎を生じている組織において、CCR2 が CD68 陽性マクロファージの一部で発現していた。さらに、患者 1 (活動性の潰瘍性大腸炎, 重症, *Matts grade 4*) では CD14 は低発現であり、CD163 および CCR2 は患者 2 (活動性の潰瘍性大腸炎, 中等度, *Matts grade 3*) と比べ多く発現された一方で CD68 ではその傾向は認めなかった。これらのデータから CD63 および CCR2 が重症度に関与する可能性が示唆された。以上から STAT1 と CCR2 を介したシグナルカスケードが大腸炎を惹起する炎症性マクロファージの誘導によりヒトの炎症性腸疾患においても発症、増悪、炎症の慢性化に関与している可能性が示唆された (図 25)。



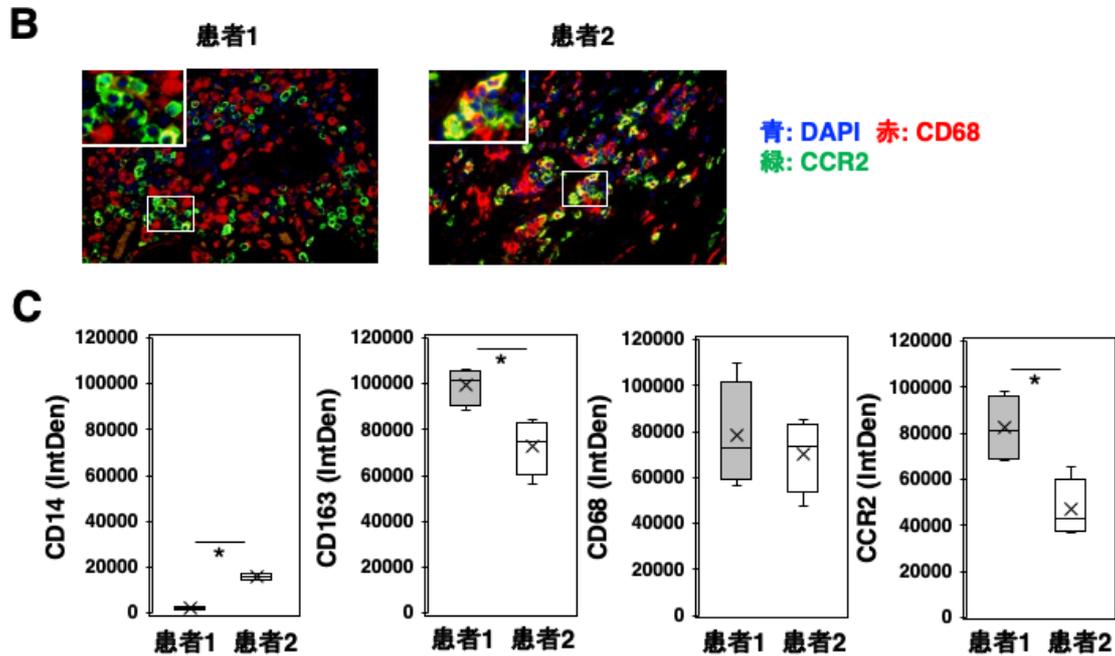


図 25. 潰瘍性大腸炎患者の大腸組織において STAT1 が活性化し、CD68 陽性マクロファージの一部に CCR2 の発現が認められる。

(A) 2 名の潰瘍性大腸炎患者の炎症を生じている大腸組織について、HE 染色と抗リン酸化 STAT1 抗体、抗 CD14 抗体、抗 CD163 抗体、および抗 CD68 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。代表的な画像を示す。直線は 200  $\mu\text{m}$  を示す。

(B) 2 名の潰瘍性大腸炎患者の大腸組織に細胞核 (青)、CD68 (赤) および CCR2 (緑) による三重免疫蛍光染色を行った。青は DAPI により染色された細胞核を示す。

(C) CD14、CD163、CD68 および CCR2 のシグナル強度はイメージ J ソフトウェアで計算した。データは箱ヒゲ図で示す。

\*は Student の t 検定による有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

## 考察

本研究でLy6cを高発現する細胞群が急性大腸炎モデルの大腸組織に集積し、STAT1欠損マウスでは集積が減弱することを見出した。IL-6、CCL2、CCR2の遺伝子発現がLy6c高発現細胞では亢進する一方で、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現がLy6cを中程度発現する細胞群で亢進した。さらに、*in vitro*の実験で脾臓細胞や腹腔滲出細胞においてLy6c発現細胞はIFN- $\alpha/\beta$ の刺激によりSTAT1依存的に誘導されることを明らかにした。また、急性大腸炎モデルを用いた検討で大腸炎を発症した野生型マウスの大腸組織において、IL-6やTNF- $\alpha$ の炎症性サイトカインに加えて、IFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現が有意に亢進すること、野生型マウスに比べてSTAT1欠損マウスで大腸炎の病態が改善することを確認した。これらの結果から、2種類の機能的に異なるLy6c発現マクロファージがSTAT1依存的にIFN- $\alpha/\beta$ により誘導され、大腸炎の発症に関与することが考えられた。さらにLy6c発現マクロファージはIFN- $\alpha/\beta$ を産生してLy6c発現マクロファージをさらに誘導することで病態の重篤化にも関与することが考えられた。

一般に外因性のウイルス感染や細菌感染は*in vivo*でI型IFNを誘導する (McNab et al., 2015)。16S rRNAファイロタイプの解析でRuminococcaceae, Bacteroidaceae, Enterobacteriaceae, Deferribacteraceae, Verrucomicrobiaceaeが急性大腸炎モデルマウスで増えていることが報告された (Berry et al., 2012)。そのため、腸管細菌叢によるI型IFNによるSTAT1の活性化が大腸炎の発症に関与する可能性が考えられた。先行研究では、リーシュマニアやトキソプラズマの感染モデルにおいてSTAT1を介して誘導されるLy6c発現マクロファージが発症に重要な役割を果たしていると報告されてきた (Xin et al., 2010; Terrazas et al., 2017; Detavernier et al., 2019) さらに、大腸がんを含めた複数のがん種においてLy6c発現マクロファージが免疫抑制あるいは免疫賦活に役割を果たしていると報告されている (Jones et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Schouppe et al., 2013; Leon-Cabrera et al., 2018)。これらの先行研究結果から、大腸組織において、Ly6cを発現するマクロファージが腸炎の発症や病態の重篤化にも関与することが考えられた。

ヒトの大腸組織に関する先行研究では、クローン病、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織におけるSTAT1について、潰瘍性大腸炎患者の方がより活性化がみられ、その活性化は好中球および単球でみられたと報告された (Schreiber et al., 2002)。

別の先行研究では、I型IFNであるIFN- $\beta$ が炎症性腸疾患の患者の大腸組織で産生され、T細胞を活性化し、腸炎惹起性のエフェクター細胞に誘導するという報告がなされ (Giles et al., 2017)、これらの先行研究はI型IFNによるマクロファージにおけるSTAT1の活性化が炎症性腸疾患の発症と増悪に関与していることを強く示唆すると考えられた。

また、Ly6c発現細胞やCCR2に関してはLy6c高発現単球が大腸炎の炎症の局所に誘導される際にCCR2の発現が不可欠であり、Ly6c高発現単球の除去が腸炎の病態を減弱させたとの先行研究 (Zigmond et al., 2012) や、アンタゴニストによりCCR2、CCR5、CXCR3を阻害したところ急性大腸炎モデルの病態が改善したとの先行研究 (Tokuyama et al., 2005) の報告がなされた。さらに最近の研究で、マクロファージによるCCL2の産生が大腸炎の発症に密接に関連していると報告された (Mackos et al., 2016; Dai et al., 2019; He et al., 2019)。これらの先行研究および本研究においてSTAT1欠損マウスで急性大腸炎の病態が減弱している結果から、Ly6c陽性マクロファージがSTAT 1-CCL2/CCR2依存性に大腸炎の局所に誘導、集積されることで大腸炎の発症と病態の重篤化に関与する制御メカニズムが考えられた。

本研究では、大腸の炎症局所におけるLy6c高発現細胞群が野生型マウスに比べてSTAT1欠損マウスで減弱していることを見出した。また、IL-6、CCL2、CCR2の遺伝子発現がLy6c高発現細胞群では亢進する一方で、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現がLy6c中発現細胞群で亢進していることを明らかにした。さらに*in vitro*の実験で、野生型マウス由来の脾臓細胞と腹腔滲出細胞をI型IFNで刺激することにより、Ly6c発現細胞が誘導されること、STAT1欠損マウスではLy6c発現細胞の誘導は減弱していることを見出した。これらの結果から、大腸炎の発症において産生されるIFN- $\alpha/\beta$ が、STAT1依存的にLy6c発現細胞を誘導し、炎症組織に集積させることが考えられた。

本研究の急性大腸炎モデルを用いた検討により、大腸炎を生じている野生型マウスの大腸組織においてIL-6、TNF- $\alpha$ の炎症性サイトカイン、IFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現が有意に亢進すること、さらに野生型マウスに比べてSTAT1欠損マウスで大腸炎の病態が改善することが見出された。従って、本研究結果から、炎症の惹起、増悪、持続に関与する機序として、ウイルス感染や細菌感染などの刺激により上皮細胞や線維芽細胞などの免疫細胞より産生されたIFN- $\alpha/\beta$ に加えて、炎症過程で誘導されたLy6c発現細胞がIFN- $\alpha/\beta$ を産生し、これらのI型IFNにより

STAT1が活性化され、病態の発症と重篤化に関与する可能性を考えた。またLy6cを中程度発現する細胞群がIFN- $\alpha/\beta$ を産生し、パラクライン機構によりLy6c高発現細胞群を誘導するとともにLy6c高発現細胞はCCL2を産生し、Ly6c高発現細胞に発現するCCR2に結合するオートクライン機構により活性化する可能性が考えられた。さらにLy6c高発現細胞群は炎症性サイトカインであるIL-6を産生し、Ly6cを中程度発現する細胞群はTNF- $\alpha$ を産生することから、これらの2種類の機能の異なるLy6c陽性細胞の協働により、大腸炎の惹起、増悪、持続に関与することが考えられた。

マウスの脳脊髄炎モデルにおいて正常時あるいは炎症時における自律的なTNFの酸性が単球の生存、維持、機能において不可欠であると報告されている (Wolf et al., 2017)。また、ヒトのCCR2陽性単球が刺激に応じて、TNFを産生するとの報告 (Barrow et al., 2015) もあり、これらの結果よりLy6c発現マクロファージがTNFを産生し、大腸の炎症局所で機能し、急性大腸炎モデルの発症に関与している可能性が示唆された。

現在、炎症性腸疾患に行われている治療は多岐にわたっており、複数の生物学的製剤により治療成績は改善しているものの再発症例や難治症例は存在する。炎症性腸疾患患者は結腸直腸がんの発症リスク2-6倍高くなるとされており、全結腸直腸がんの炎症性腸疾患患者の死因の15%は結腸直腸がんであると報告されている (Yashiro et al., 2014; Keller et al., 2019)。最近、I型IFNによる大腸がんの悪性化に関する研究が報告された (Xiang et al., 2022)。従って、I型IFNを介した炎症性腸疾患の発症に加え、さらに大腸がんの発生およびその悪性化に対する新たな機序解明や新規治療法の開発は重要であると考えられる。

本研究では急性大腸炎モデルを用いた検討で、I型IFNの産生とSTAT1シグナル伝達経路の活性化、下流標的としてCCL2/CCR2の産生誘導が病態の発症に関与すること、I型IFN-STAT1依存的に誘導される2種類のLy6c陽性マクロファージが大腸炎に寄与することを明らかにした。さらに、潰瘍性大腸炎・クローン病患者の大腸炎組織においてSTAT1の活性化とCCR2発現マクロファージが集積していることを確認していることから、STAT1シグナル伝達経路とその下流関連分子は、ヒトにおいても有望な治療、発症予防の標的になりうることを期待される。

## 結論

### ① 本研究から得られた新知見

- ・急性大腸炎モデルにおいて野生型C57BL/6マウスに比べて同系STAT1欠損マウスでは大腸炎の病態が軽減するが、野生型マウスの骨髄細胞をSTAT1欠損マウスに移植することによりSTAT1欠損マウスの大腸炎の病態が増悪した。
- ・急性大腸炎モデルにおいて野生型C57BL/6マウスの大腸組織にLy6c高発現マクロファージが集積し、同系STAT1欠損マウスではLy6c高発現マクロファージの集積が減弱していた。
- ・Ly6c高発現マクロファージにおいてIL-6、CCL2、CCR2の遺伝子発現が亢進する一方で、Ly6c中発現マクロファージではTNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha/\beta$ の遺伝子発現が亢進していた。
- ・急性大腸炎モデルの炎症を起こしている大腸組織の全細胞における遺伝子発現を評価したところ、野生型マウスに比べてSTAT1欠損マウスでは有意にIL-6、TNF- $\alpha$ 、CCL2、CCR2の遺伝子発現が低下した。
- ・*in vitro*の実験で脾臓細胞や腹腔滲出細胞において、Ly6c発現細胞はIFN- $\alpha/\beta$ の刺激によりSTAT1依存的に誘導された。
- ・潰瘍性大腸炎患者の大腸組織においてSTAT1の活性化とCCR2を発現するCD68陽性マクロファージが集積していた。

### ② 新知見の意義

本研究において急性大腸炎モデルの大腸組織においてI型IFN-STAT1-CCL2/CCR2のシグナルが2種類のLy6c発現マクロファージを誘導し、大腸炎の発症、増悪に関与している可能性が示された。炎症性腸疾患の発症・増悪のメカニズムについては不明な点も多く、今回の知見が新たな発症メカニズムの解明・新規治療の開発につながることを期待される。

また、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織においてもSTAT1の活性化とCCR2発現マクロファージが集積していることを確認した。急性大腸炎モデルで解明された炎症のメカニズムがヒトにも応用できる可能性が示されたと考えられる。

### ③ 本研究で得られた新知見に基づいた今後の展開

本研究において急性大腸炎モデルの大腸組織においてI型IFN-STAT1-CCL2/CCR2のシグナルが2種類のLy6c発現マクロファージを誘導し、大腸炎の発症、増悪に関与している可能性が示された。さらなる研究により急性大腸炎の発症メカニズムを解明していくことが期待できる。

潰瘍性大腸炎患者の大腸組織においてもSTAT1の活性化とCCR2発現マクロファージが集積していることを確認しており、ヒトにおけるcounterpartの探索・同定を行うことが不可欠である。さらにSTAT1の下流分子を同定していくことにより現在治療で用いられているJAK阻害剤の治療効果の機序についても新たな発見につながることを期待される。

### ④ 今後の課題

今回見出された2種類のLy6c発現マクロファージについて、さらに詳細な特性を明らかにしていく必要がある。また、今回、大腸炎モデルについて野生型マウスのLy6c発現細胞をSTAT1欠損マウスに移植した実験では大腸炎の病態が変化しなかった。移植の時期、移植する細胞数、移植の方法など様々な条件を検討する必要があると考えられる。マウスモデルで得られたデータ、知見をもとに、さらに炎症性腸疾患患者の臨床検体を蓄積して、STAT1シグナル伝達経路の病態への影響を検討し、大腸炎発症の機序解明を行う必要があると考えている。

## 謝辞

本研究の機会を与えていただき、ご指導とご鞭撻をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能学分野の北村秀光准教授に深謝いたします。

本研究を実施するにあたり、数多くのご協力をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能学分野の項慧慧さん、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰの杉山昂先生、岡田尚樹先生に深謝いたします。

本研究の遂行において重要でありましたヒト臨床検体を使用した検証、ヒトがん細胞の分与、さらに多くの有意義なご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰの大野陽介先生、市川伸樹特任助教、吉田雅特任助教、本間重紀准教授、国立遺伝学研究所遺伝情報分析研究室の池尾一穂准教授、旭川医科大学病院病理部病理診断科の谷野美智枝教授、和歌山県立医科大学医学部先端医学研究所分子病態解析研究部の橋本真一教授に心より感謝いたします。

最後に、当教室で研究を行う機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰの武富紹信教授に深く感謝いたします。

## 利益相反

本研究に関して開示すべき利益相反はありません。

## 引用文献

Al Nabhani Z, Dulauroy S, Marques R, Cousu C, Al Bounny S, Déjardin F, Sparwasser T, Bérard M, Cerf-Bensussan N, Eberl Gérard. A weaning reaction to microbiota is required for resistance to immunopathologies in the adult. (2019). *Immunity*. 50, 1276–1288.

Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, Vavricka SR, Fiocchi C. (2018). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 39–49.

Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, Williams M, Malissen B, Agace WW, Mowat AM. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal. Immunol.* 6, 498–510.

Bandyopadhyay SK, de la Motte CA, Kessler SP, Hascall VC, Hill DR, Strong SA. (2008). Hyaluronan-mediated leukocyte adhesion and dextran sulfate sodium-induced colitis are attenuated in the absence of signal transducer and activator of transcription 1. *Am J Pathol* 173, 1361–1368.

Bernardo D, Marin AC, Fernández-Tomé S, Montalban-Arques A, Carrasco A, Tristán E, Ortega-Moreno L, Mora-Gutierrez I, Díaz-Guerra A, Caminero-Fernández R. (2018). Human intestinal pro-inflammatory CD11c<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> macrophages, but not their tolerogenic CD11c<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup>CX3CR1<sup>-</sup> counterparts, are expanded in inflammatory bowel disease. *Mucosal. Immunol.* 11, 1114–1126.

Bernstein CN. (2015). Treatment of IBD: Where We Are and Where We Are Going. *Am. J. Gastroenterol.* 110, 114-126.

Barrow AD, Palarasah Y, Bugatti M, Holehouse AS, Byers DE, Holtzman MJ, Vermi W, Skjødtt K, Crouch E, Colonna M. (2015). OSCAR is a receptor for surfactant protein D

that activates TNF-alpha release from human CCR2+ inflammatory monocytes. *J. Immunol.* *194*, 3317–3326.

Berry D, Schwab C, Milinovich G, Reichert J, Mahfoudh KB, Decker T, Engel M, Hai B, Hainzl E, Heider S, et al. (2012). Phylotype-level 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. *ISME J.* *6*, 2091–2106.

Borbet TC, Blaser MJ. (2019). Host genotype and early life microbiota alterations have additive effects on disease susceptibility. *Mucosal. Immunol.* *12*, 586–588.

Cohen BL, Sachar DB. (2017). Update on anti-tumor necrosis factor agents and other new drugs for inflammatory bowel disease. *BMJ.* *357*, j2505.

Crnčec I, Modak M, Gordziel C, Svinka J, Scharf I, Moritsch S, Pathria P, Schleder M, Kenner L, Timelthaler G, et al. (2018). STAT1 is a sex-specific tumor suppressor in colitis-associated colorectal cancer. *Mol. Oncol.* *12*, 514–528.

Dai L, Liu Y, Cheng L, Wang H, Lin Y, Shi G, Dong Z, Li J, Fan P, Wang Q, et al. (2019). SARI attenuates colon inflammation by promoting STAT1 degradation in intestinal epithelial cells. *Mucosal. Immunol.* *12*, 1130–1140.

Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Müller M, Kovarik P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest.* *109*, 1271–1277.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* *114*, 385–391.

Eftychi C, Schwarzer R, Vlantis K, Wachsmuth L, Basic M, Wagle P, Neurath MF, Becker C, Bleich A, Pasparakis M. (2019). Temporally distinct functions of the cytokines IL-12 and IL-23 drive chronic colon inflammation in response to intestinal barrier impairment. *Immunity.* *51*, 367–380.

Fachi JL, Felipe JS, Pral LP, da Silva BK, Corrêa RO, de Andrade MCP, da Fonseca DM, Basso PJ, Câmara NOS, et al. (2019). Butyrate protects mice from *Clostridium difficile*-induced colitis through an HIF-1-dependent mechanism. *Cell Rep.* 27, 750–761.

Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, Blank MA, Johanns J, Gao LL, Miao Y, et al. (2016). Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 1946-1960.

Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim HJ, Danese S, et al. (2013). Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 369, 699-710.

Feagan BG, Panés J, Ferrante M, Kaser A, D'Haens GR, Sandborn WJ, Louis E, Neurath MF, Franchimont D, Dewit O, et al. (2018). Risankizumab in patients with moderate to severe Crohn's disease: an open-label extension study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 3, 671-680.

Feagan BG, Danese S, Loftus EV Jr, Vermeire S, Schreiber S, Ritter T, Fogel R, Mehta R, Nijhawan S, Kempinski R, et al. (2021). Filgotinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis (SELECTION): a phase 2b/3 double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 397, 2372-2384

Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Panés J, Kaser A, Ferrante M, Louis E, Franchimont D, Dewit O, Seidler U, et al. (2017). Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet.* 389, 1699–1709.

Gaujoux R, Starosvetsky E, Maimon N, Vallania F, Bar-Yoseph H, Pressman S, Weissshof R, Goren I, Rabinowitz K, Waterman M, et al. (2019). Cell-centred meta-analysis reveals baseline predictors of anti-TNF alpha non-response in biopsy and blood of patients with IBD. *Gut.* 68, 604–614.

Giles EM, Sanders TJ, McCarthy NE, Lung J, Pathak M, MacDonald TT, Lindsay JO, Stagg AJ. (2017). Regulation of human intestinal T-cell responses by type 1 interferon-STAT1 signaling is disrupted in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* *10*, 184–193.

Gisbert JP, Marin AC, Chaparro M. (2016). The risk of relapse after anti-TNF discontinuation in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *111*, 632–647.

Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, et al. (2002). Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet.* *359*, 1541-1549.

Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P. (2006). Human Anti-Tumor Necrosis Factor Monoclonal Antibody (Adalimumab) in Crohn's Disease: the CLASSIC-I Trial. *Gastroenterology* *130*, 323-333.

He J, Song Y, Li G, Xiao P, Liu Y, Xue Y, Cao Q, Tu X, Pan T, Jiang Z, et al. (2019). Fbxw7 increases CCL2/7 in CX3CR1hi macrophages to promote intestinal inflammation. *J Clin Invest.* *129*, 3877–3893.

Hibi T, Imai Y, Senoo A, Ohta K, Ukyo Y. (2017). Efficacy and safety of golimumab 52-week maintenance therapy in Japanese patients with moderate to severely active ulcerative colitis: a phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled study (PURSUIT-J study). *J Gastroenterol.* *52*, 1101-1111.

Ivashkiv LB. (2018). IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 545–558.

Jones GR, Bain CC, Fenton TM, Kelly A, Brown SL, Ivens AC, Travis MA, Cook PC, MacDonald AS. (2018). Dynamics of colon monocyte and macrophage activation during colitis. *Front. Immunol.* *9*, 2764.

Kang YH, Biswas A, Field M, Snapper SB. (2019). STAT1 signaling shields T cells from NK cell-mediated cytotoxicity. *Nat. Commun.* *10*, 912.

Kaplan GG. (2015). The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 720–727.

Kitamura H, Kamon H, Sawa S, Park SJ, Katunuma N, Ishihara K, Murakami M, Hirano T. (2005). IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity.* *23*, 491–502.

Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, Ohtake J, Homma S, Kawamura H, Takahashi N, Taketomi A. (2017). Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* *108*, 1947–1952.

Kühbacher T, Gionchetti P, Hampe J, Helwig U, Rosenstiel P, Campieri M, Buhr HJ, Schreiber S. (2001). Activation of signal-transducer and activator of transcription 1 (STAT1) in pouchitis. *Clin. Exp. Immunol.* *123*, 395-401.

Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, Hayee B, Lomer MCE, Parkes GC, Sellinger C, et al. (2019). British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut.* *68*, s1–s106.

Leon-Cabrera S, Vázquez-Sandoval A, Molina-Guzman E, Delgado-Ramirez Y, Delgado-Buenrostro NL, Callejas BE, Chirino YI, Pérez-Plasencia C, Rodríguez-Sosa M, Olguín JE. (2018). Deficiency in STAT1 signaling predisposes gut inflammation and prompts colorectal cancer development. *Cancers.* *10*, 341.

Mackos AR, Galley JD, Eubank TD, Easterling RS, Parry NM, Fox JG, Lyte M, Bailey MT. (2016). Social stress-enhanced severity of *Citrobacter rodentium*-induced colitis is CCL2-dependent and attenuated by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Mucosal Immunol.* *9*, 515–526.

McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O’Garra A. (2015). Type I interferons in

infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 87–103.

Motoya S, Watanabe K, Ogata H, Kanai T, Matsui T, Suzuki Y, Shikamura M, Sugiura K, Oda K, Hori T, et al. (2019). Vedolizumab in Japanese patients with ulcerative colitis: A Phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *PLoS One* *14*, e0212989.

Nakanishi Y, Sato T, Ohteki T. (2015). Commensal gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Nat. Rev. Gastroenterol Mucosal Immunol.* *8*, 152–160.

Nakanishi Y, Sato T, Takahashi K, Ohteki T. (2018). IFN- $\gamma$ -dependent epigenetic regulation instructs colitogenic monocyte/macrophage lineage differentiation in vivo. *Mucosal Immunol.* *11*, 871–880.

Nakase H, Uchino M, Shinzaki S, Matsuura M, Matsuoka K, Kobayashi T, Saruta M, Hirai F, Hata K, Hiraoka S, et al. (2021). Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease 2020. *J. Gastroenterol* *56*, 489-526.

Na YR, Stakenborg M, Seok SH, Matteoli G. (2019). Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 531–543.

Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, et al. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet.* *390*, 2769–2778.

Nguyen A, Ho L, Workenhe ST, Chen L, Samson J, Walsh SR, Pol J, Bramson JL, Wan Y. (2018). HDACi delivery reprograms tumor-infiltrating myeloid cells to eliminate antigen-loss variants. *Cell Rep.* *24*, 642–654.

Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, et al. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome

in inflammatory bowel disease. *Cell*. *160*, 447–460.

Ohno Y, Kitamura H, Takahashi N, Ohtake J, Kaneumi S, Sumida K, Homma S, Kawamura H, Minagawa N, Shibasaki S, et al. (2016). IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* *65*, 193–204.

Ohno Y, Toyoshima Y, Yurino H, Monma N, Xiang H, Sumida K, Kaneumi S, Terada S, Hashimoto S, Ikeo K, et al. (2017). Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* *108*, 1959–66.

Ohtake J, Kaneumi S, Tanino M, Kishikawa T, Terada S, Sumida K, Masuko K, Ohno Y, Kita T, Iwabuchi S, et al. (2015). Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* *136*, 1690–1694.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* *98*, 694–702.

Pithadia AB, Jain S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Rep* *63*, 629–642.

Plichta DR, Graham DB, Subramanian S, Xavier RJ. (2019). Therapeutic opportunities in inflammatory bowel disease: mechanistic dissection of host-microbiome relationships. *Cell.* *178*, 1041–1056.

Rangan P, Choi I, Wei M, Navarrete G, Guen E, Brandhorst S, Enyati N, Pasia G, Maesincee D, Ocon V, et al. (2019). Fasting-mimicking diet modulates microbiota and promotes intestinal regeneration to reduce inflammatory bowel disease pathology. *Nat Rev Gastroenterol. Hepatol.* *26*, 2704–2719.

Rauch I, Müller M, Decker T. (2013). The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT* 2, e23820.

Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, et al. (2005). Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 353, 2462-2476.

Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, Colombel JF, D'Haens G, Wolf DC, Kron M, Tighe MB, Lazar A, Thakkar RB. (2012a). Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 142, 257-265.

Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, Guzzo C, Sands BE, Hanauer SB, Targan S, Rutgeerts P, et al. (2012b). Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 1519-1528.

Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, Niezychowski W, et al. (2012c). Tofacitinib, an Oral Janus Kinase Inhibitor, in Active Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 367, 616-624.

Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, et al. (2013). Vedolizumab as Induction and maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* 369, 711-721.

Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Schreiber S, D'Haens G, Tanida S, Siffledeen J, Enejosa J, Zhou W, Othman AA, et al. (2020a). Efficacy of Upadacitinib in a Randomized Trial of Patients With Active Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 158, 2139-2149.

Sandborn WJ, Ferrante M, Bhandari BR, Berliba E, Feagan BG, Hibi T, Tuttle JL, Klekotka P, Friedrich S, Durante M, et al. (2020b). Efficacy and Safety of Mirikizumab in a Randomized Phase 2 Study of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 158, 537-549.

Sandborn WJ, Ferrante M, Bhandari BR, Berliba E, Feagan BG, Hibi T, Tuttle JL, Klekotka P, Friedrich S, Durante M, et al. (2020c). Efficacy and safety of Mirikizumab in a randomized phase 2 study of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. *158*, 537-549.e10.

Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, O'Brien CD, Zhang H, Johanns J, Adedokun OJ, Li K, Peyrin-Biroulet L, Van Assche G, et al. (2019). Ustekinumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* *381*, 1201–1214.

Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, Xavier RJ. (2019). Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Microbiol.* *17*, 497–511.

Schoupe E, Mommer C, Movahedi K, Laoui D, Morias Y, Gysemans C, Luyckx A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. (2013). Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subsets exert either inhibitory or stimulatory effects on distinct CD8<sup>+</sup> T-cell activation events. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2930–2942.

Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kühbacher T, Hämling J, Fölsch UR, Seegert D. (2002). Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. *51*, 379–385.

Sumida K, Ohno Y, Ohtake J, Kaneumi S, Kishikawa T, Takahashi N, Taketomi A, Kitmura H. (2015). IL-11 induces differentiation of myeloid-derived suppressor cells through activation of STAT3 signalling pathway. *Sci. Rep.* *5*, 13650.

Teng MW, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, Cua DJ. (2015). IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* *21*, 719-729.

Terrazas C, Varikuti S, Oghumu S, Steinkamp HM, Ardic N, Kimble J, Nakhasi H, Satoskar AR. (2017). Ly6Chi inflammatory monocytes promote susceptibility to

Leishmania donovani infection. *Sci. Rep.* 7, 14693.

Detavernier A, Azouz A, Shehade H, Splittgerber M, Van Maele L, Nguyen M, Thomas S, Achouri Y, Svec D, Calonne E, et al. (2019). Monocytes undergo multi-step differentiation in mice during oral infection by *Toxoplasma gondii*. *Commun. Biol.* 2, 472.

Tokuyama H, Ueha S, Kurachi M, Matsushima K, Moriyasu F, Blumberg RS, Kakimi K. (2005). The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulfate-mediated colitis. *Int. Immunol.* 17, 1023–1034.

Ungaro F, Massimino L, D'Alessio S, Danese S. (2019). The gut virome in inflammatory bowel disease pathogenesis: from metagenomics to novel therapeutic approaches. *United European Gastroenterol. J.* 7, 999–1007.

Wolf Y, Shemer A, Polonsky M, Gross M, Mildner A, Yona S, David E, Kim KW, Goldmann T, Amit I, et al. (2017). Autonomous TNF is critical for in vivo monocyte survival in steady state and inflammation. *J. Exp. Med.* 214, 905–917.

Wu X, Guo W, Wu L, Gu Y, Gu L, Xu S, Wu X, Shen Y, Ke Y, Tan R, Sun Y, Xu Q. (2012). Selective sequestration of STAT1 in the cytoplasm via phosphorylated SHP-2 ameliorates murine experimental colitis. *J. Immunol.* 189, 3497–3507.

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. (2007) *Nature.* 448, 427-434.

Xiang H, Toyoshima Y, Shen W, Wang X, Okada N, Kii S, Sugiyama K, Nagato T, Kobayashi H, Ikeo K, et al. (2022). IFN- $\alpha/\beta$ -mediated NK2R expression is related to the malignancy of colon cancer cells. *Cancer Sci.*, 113, 2513-2525.

Xin L, Vargas-Inchaustegui DA, Raimier SS, Kelly BC, Hu J, Zhu L, un J, Lynn S. (2010). Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. *J. Immunol.* 184, 7047–7056.

Zigmond E, Varol C, Farache J, Elmaliah E, Satpathy AT, Friedlander G, Mack M, Shpigel N, Boneca IG, Murphy KM. (2012). Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity*. 37, 1076–1090.

Zuo T, Lu XJ, Zhang Y, Cheung CP, Lam S, Zhang F, Tang W, Ching JYL, Zhao R, Chan PKS, et al. (2019). Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut*. 68, 1169–1179.