

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19163

研究課題名(和文) Rap1欠損による大腸炎発症機構の解明

研究課題名(英文) The roles of ILC3 and gammadelta T cells in the development of colitis of the model-mice

研究代表者

石原 沙耶花 (ISHIHARA, Sayaka)

北里大学・理学部・助教

研究者番号：50741865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD4+ 細胞特異的にRap1を欠損したマウス(Rap1 KOマウス)は、生後数週間で大腸炎及び高度異型腫瘍を自然発症し、速やかに大腸がんへ進展する。本研究課題では、独自に開発した大腸炎自然発症モデルマウスを用いて、大腸炎の病態形成における T細胞とILC3細胞の役割について研究を行った。その結果、 T細胞は大腸炎の発症初期にIL-17Aを産生することで、病態の悪化に参与している可能性が示唆された。また、CD4+ ILC3細胞の腸管から腸管リンパ節への移動、IL-22の産生にはRap1は関与していないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸炎モデルマウスとして使用されているDSS投与マウスは、大腸粘膜のバリア機能を直接障害することで炎症反応を惹起するため、大腸炎の初期の病態形成に関わる免疫細胞の役割についてはわかっていなかった。今回、我々が独自に開発した大腸炎自然発症モデルマウスを用いた研究で、 T細胞が大腸炎初期の病態悪化に参与していることが明らかとなった。今後このモデルマウスの解析を進めることで、大腸炎発症機構の一端を明らかにすることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mice having CD4+ cell-specific deletion of Rap1 (Rap1KO mice) developed spontaneous colitis. In this study, we investigated the involvement of innate lymphocytes ( T cells and ILC3) in the development of colitis. To examine the roles of T cells for colitis, we crossed Rap1KO mice with TCR  $\alpha^{-/-}$  mice (DKO mice). The reduction in weight and histological scores of colitis were suppressed in DKO mice until 12 weeks of age. These data suggest that T cells play critical role in the promotion of colitis at early phase of onset. Since previous study suggests that ILC3 cells have an important role of intestinal immunity, we examined the cell number and function of ILC3 cells. There was no difference in the cell number and IL-22 production of CD4+ ILC3 cells derived from LI-LP and mLN between control and Rap1KO mice before the onset of colitis. These data indicate that ILC3 cells are not involved in the development of colitis.

研究分野：免疫

キーワード：大腸炎 T細胞 ILC3細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Diseases: IBD) は、腸内細菌に対する免疫寛容が破綻し、共生関係にある腸内細菌に対し、免疫応答が生じることで引き起こされる自己免疫性疾患である。原因不明の難病であり、厚生労働省の特定疾患に指定されているが、決定的治療法は見出されていない。生涯にわたって炎症の再燃と寛解を繰り返し、発症から 10 年を経過すると高い確率でがんを発症する。現在のところ、デキストララン硫酸塩 (DSS) をマウスに摂取させることにより、大腸粘膜を直接損傷させバリア機能を低下させることで潰瘍性大腸炎を誘導するモデルが広く利用されているが、大腸粘膜のバリア機能を直接障害することで炎症反応を惹起するため、免疫応答は関与しておらず、根本的な発症機構の解明に至っていない。

$\gamma\delta$  T 細胞は  $\gamma\delta$  TCR を発現する T 細胞サブセットで、主に皮膚や腸管に存在し、自然免疫と適応免疫の両方で重要な役割を果たす。 $\gamma\delta$  T 細胞は TCR $\gamma$  鎖として V $\gamma$ 1/2/3/4/5/6/7 のいずれかを発現し、発現する TCR $\gamma$  鎖によって細胞の局在や産生するサイトカインが異なる。IBD に  $\gamma\delta$  T 細胞の関与を示した報告はあるが (Kadivar M et al. J Immunol. 2016, Tsuchiya et al. Immunol. 2003) 大腸炎の促進または抑制のどちらに働くのかは不明な点が多く、既存の DSS モデルでは大腸炎発症の初期において  $\gamma\delta$  T 細胞がどのように機能するのかはわかっていなかった。

また、腸内細菌叢の形成や腸管免疫寛容において重要な役割を果たす ILC3 は、細胞表面の CD4、NKp46 の発現によって 3 種類 (CD4<sup>+</sup> ILC3, NKp46<sup>+</sup> ILC3, CD4<sup>+</sup> NKp46<sup>+</sup> ILC3) に分けられる。特に CD4<sup>+</sup> ILC3 は腸管リンパ節において MHC class II を介した抗原提示によって腸内細菌反応性 T 細胞のアポトーシスを誘導し、腸管免疫寛容に寄与している可能性が報告されているが (MR Hepworth et al. Science. 2015) 大腸炎発症にどのように関与しているかは不明な点も多い。

## 2. 研究の目的

我々は、CD4 陽性細胞特異的に低分子量 G タンパク質である Rap1 a 及び b を欠損した conditional knockout マウス (Rap1 KO マウス) を作製したところ、生後数週間で下痢、血便を伴う体重減少が認められ、高度異型腫瘍を伴う激しい大腸炎を自然発症し、速やかに大腸がんへ進展することを見出した (Ishihara S., et al. Nat Commun. 2015)。作製した大腸炎自然発症モデルマウスでは、 $\gamma\delta$  T 細胞が腸管関連組織で顕著に増加していたことから、大腸炎の発症に  $\gamma\delta$  T 細胞が関与している可能性が考えられた。また、CD4<sup>+</sup> ILC3 で Rap1 が欠損することから、腸管リンパ節並びに大腸粘膜固有層において CD4<sup>+</sup> ILC3 の細胞数に影響がある可能性が考えられる。そこで本研究課題では、独自に開発した大腸炎自然発症モデルマウスを用いて、(1)  $\gamma\delta$  T 細胞及び (2) ILC3 細胞の大腸炎発症における役割について解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸炎モデルマウスにおける  $\gamma\delta$  T 細胞の役割を検討するため、Rap1 KO マウスと TCR $\gamma$  KO マウスを掛け合わせ、 $\gamma\delta$  T 細胞が全身で欠損した Rap1 KO マウスである double knockout マウス (DKO マウス) を作製した。作製した TCR $\gamma$  KO マウス、Rap1 KO マウス、DKO マウスの体重の推移及び組織像の比較、フローサイトメトリーによるサブセットの解析を行った。(2) 腸管関連組織における CD4<sup>+</sup> ILC3 の細胞数、MHC class II の発現、サイトカインの産生に影響が及ぼされている可能性を検討するため、フローサイトメトリーによる解析を行った。また、ILC3 の局在を検討するため、Rap1 KO マウスと ROR $\gamma$ t-GFP マウスを掛け合わせ、ILC3 を可視化できるマウスを作製した。このマウスを用いて、クリプトパッチの形成への影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 大腸炎発症における  $\gamma\delta$  T 細胞の関与を明らかにするため、作製した TCR $\gamma$  KO マウス、Rap1 KO マウス、DKO マウスの体重を 4 週齢から 12 週齢にかけて測定したところ、DKO マウスは Rap1 KO マウスと比べて有意に体重が増加し、下痢や血便の症状は見られなかった (図 1-A)。

しかしながら、12 週齢以上になると DKO マウスでも下痢や血便の症状が見られたため、12 週齢以下のマウスと、12 週齢以上のマウスの 2 群に分けて、大腸の組織像の炎症スコアを比較したところ、12 週齢以下では Rap1 KO マウスと DKO マウスとで炎症スコアに有意な差が認められたが、12 週齢以上になるとその差はほとんどなくなった (図 1-B)。すなわち、DKO マウスで大腸炎の発症が遅れたことから、 $\gamma\delta$  T 細胞は、大腸炎の発症初期において炎症の促進に関与している可能性が示唆された。

続いて増加していた  $\gamma\delta$  T 細胞のサブセットを、フローサイトメトリーを用いて解析した。V $\gamma$ 1, 2, 4, 5, 6 陽性細胞の割合を比較したところ、発症初期においては野生型と Rap1 KO マウスの間で大きな差はなかった (図 2-A)。そこで、大腸炎の病態に影響を及ぼすとされる IL-17A 産生  $\gamma\delta$  T 細胞数に変化が生じている可能性を検討した。腸管リンパ節、大腸粘膜固有層より細胞を単離し、プレフェルジン存在下で、PMA、ionomycin 刺激後、細胞内染色によって ROR $\gamma$ t 陽性 IL-17A 産生細胞の割合を解析し、細胞数を算出した。その結果、どちらの組織において

も、Rap1 KO マウスで IL-17A 産生細胞数が増加していることがわかった (図 2-B)。

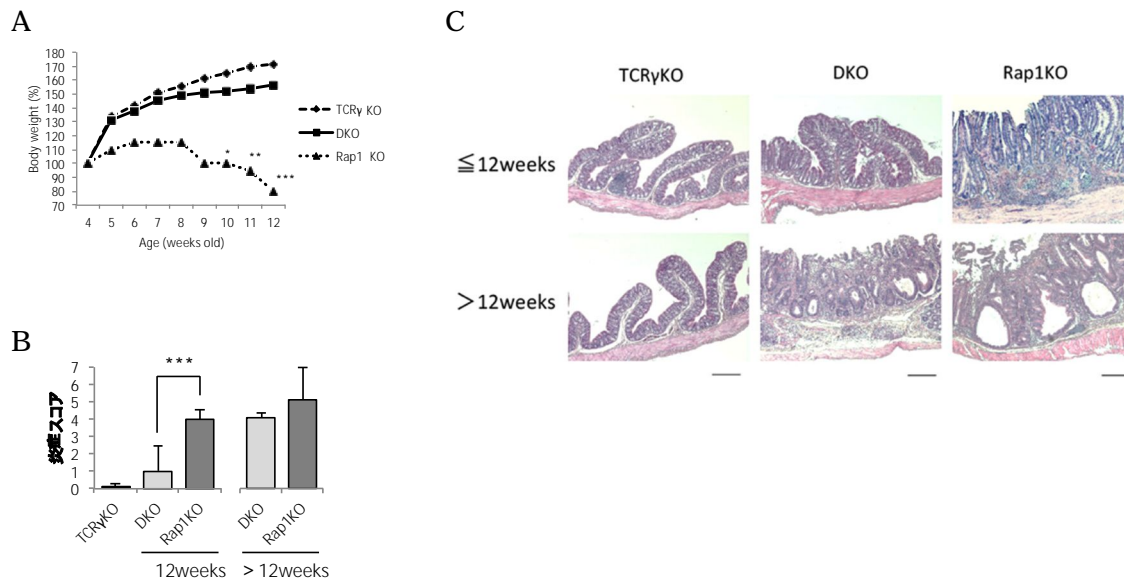


図 1. DKO マウスは Rap1 KO マウスと比較して大腸炎の発症が遅れる

(A) TCR $\gamma$  KO マウス、Rap1 KO マウス、DKO マウスの 4 週齢から 12 週齢までの体重測定の結果を示す。(B) それぞれのマウスの結腸の HE 染色像を観察し、炎症スコアを測定した。(C) それぞれのマウスの結腸を摘出し、ホルマリン固定後、HE 染色を行った。\* $P < 0.02$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (student's t-test). Scale bar, 200 $\mu$ m

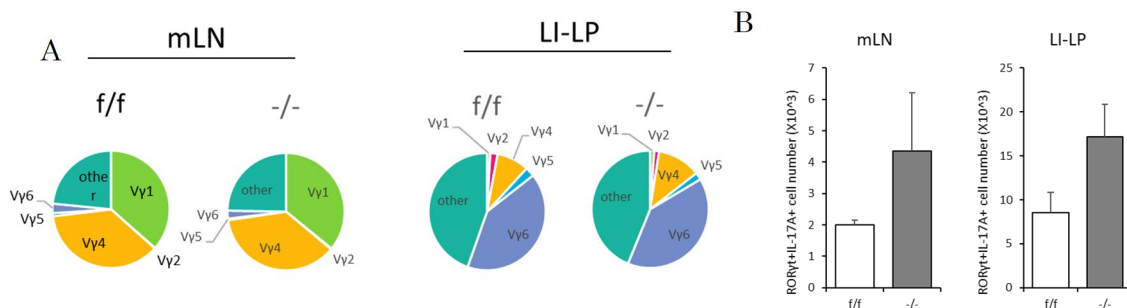


図 2. 大腸炎発症初期のマウスで ROR $\gamma$ t+IL-17A+ $\gamma$  $\delta$ T 細胞数が増加している

(A) 発症初期における V $\gamma$ 1,2,4,5,6 陽性細胞の割合。(B) 発症初期における ROR $\gamma$ t 陽性 IL-17A 産生  $\gamma$  $\delta$ T 細胞細胞数。

IL-17A を産生するサブセットとしては、V $\gamma$ 4 と V $\gamma$ 6 が知られている。特に V $\gamma$ 4 は実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) や関節炎 (CIA) モデルなどの自己免疫疾患マウスモデルにおいて、IL-17A を産生することで症状を悪化させているという報告がある (Christina L. Roark et al. J Immunol. 2007)。今回 Rap1 KO マウスの IL-17A 産生  $\gamma$  $\delta$ T 細胞数が増加していたことから、大腸炎の発症初期に  $\gamma$  $\delta$ T 細胞が IL-17A を産生して好中球・マクロファージを誘引することによって炎症を促進し、T 細胞と相互作用することでさらに大腸炎を悪化させている可能性が考えられた。

(2) 野生型及び Rap1 KO マウスの腸管リンパ節、大腸粘膜固有層における CD4+ILC3 の細胞数を、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、大腸炎発症後には腸管リンパ節において細胞数が減少していたが、発症前の 4 週齢においては野生型とほとんど差は認められなかった (図 3-A)。また、MHC class の発現についても検討したが、Rap1 欠損による影響は認められなかった (図 3-B)。さらに回腸末端におけるクリプトパッチの構造を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したが、両者の構造に大きな違いはなかった (図 3-C)。また、ILC3 は IL-22 を産生することで腸管上皮細胞からの抗菌タンパクの発現を高めることで粘膜感染菌の排除に重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで、Rap1 の欠損により大腸粘膜固有層に存在する CD4+ILC3 の IL-22 の産生量を検討したが、野生型との間に差は認められなかった。

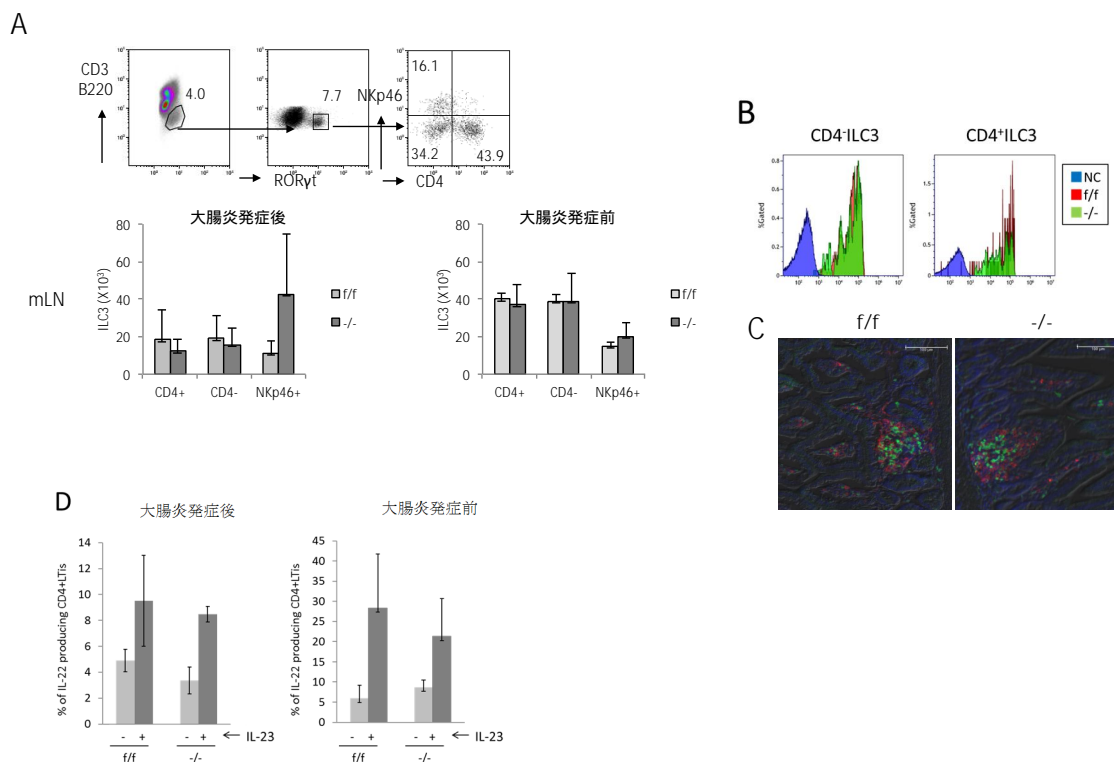


図3. Rap1欠損によるCD4<sup>+</sup>ILC3の細胞数や局在への影響はなかった  
 (A) 腸管リンパ節のILC3サブセットの細胞数を示す。(B)CD4<sup>+</sup>またはCD4<sup>-</sup> ILC3のMHC class の発現を比較した。(C)ROR $\gamma$ t-GFP陽性野生型またはRap1KOマウスの回腸末端の凍結切片を作製しCD11cを染色した。赤色がCD11c、緑色がROR $\gamma$ t陽性細胞を示す。(D)大腸粘膜固有層内のCD4<sup>+</sup>ILC3をIL-23で刺激した際のIL-22産生細胞の割合を示す。

以上の結果より、Rap1はILC3のトラフィックングやIL-22産性能に関与しない可能性が示唆され、大腸炎発症前における有意な差は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nishiyama K, Sugiyama M, Yamada H, Makino K, Ishihara S, Takaki T, Mukai T, Okada N. A new approach for analyzing an adhesive bacterial protein in the mouse gastrointestinal tract using optical tissue clearing. Scientific reports. 9(1) 4731 (2019) doi: 10.1038/s41598-019-41151-y. 査読有.

Nishikimi A, Koyama Y, Ishihara S, Kobayashi S, Tometsuka C, Kusubata M, Kuwaba K, Hayashida O, Hattori S, Katagiri K. Collagen-derived peptides modulate CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation and suppress allergic responses in mice. Immun Inflamm Dis. 6(2): 245–255 (2018) doi: 10.1002/iid3.213. 査読有.

### 〔学会発表〕(計 10 件)

Miwa R, Sugioka R, Ishihara S, Katagiri K, Rap1 plays critical roles in B cell recirculation and differentiation. (第47回日本免疫学会学術集会、2018年)

Sato T, Ishihara S, Marui R, Nishikimi A, Takagi J, Katagiri K, Rap1 regulates active conformation of  $\alpha 4 \beta 7$  and affinity for MadCAM-1. (第47回日本免疫学会学術集会、2018年)

Ishihara S, Mamiyoda M, Sato T, Nishikimi A, Saegusa M, Katagiri K. Dual functions of Rap1 are crucial for T-cell homeostasis and prevention of spontaneous colitis. 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, October 29-November 2, 2017, in Kanazawa, Japan

Saito H, Ishihara S, Nishikimi A, Sato T, Saegusa M, Katagiri K. Rab13 prevents development of B cell lymphoma. (第46回日本免疫学会学術集会、2017年)

Kikuchi N, Ishihara S, Sato T, Sawa S, Shibata K, Yoshikai Y and Katagiri K. The roles of ILC3 and  $\gamma\delta$  T cells in the development of colitis of the model-mice. (第46回日本免疫学会学術集会、2017年)

Hama N, Ishihara S, Katagiri K. Rap1 is critical for DC migration. (第46回日本免疫学

会学術集会、2017 年)

Sato T, Ishihara S, Takagi J, Katagiri K. T cell specific Rap1-deficient mice develop spontaneous colitis. (第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年)

Ishihara S, Nishikimi A, Umemoto E, Miyasaka M, Saegusa M, Katagiri K. Regulation of adhesion cascade of naïve and effector T cells by Rap1 is critical for mucosal homeostasis. (第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年)

Nishikimi A, Ishihara S, Katagiri K. Clathrin-dependent internalization of LFA-1 plays an important role in rear detachment of migrating lymphocytes. (第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年)

Momoi Y, Ishihara S, Nishikimi A, Katagiri K. Identification of guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rap1 crucial for lymphocyte trafficking. (第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：大腸炎又は大腸癌モデル非ヒト動物及びその利用

発明者：片桐晃子、石原沙耶花、錦見昭彦、三枝信

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：特許第 6273653 号

取得年：平成 30 年

国内外の別：国内

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。