

令和元年6月12日現在

機関番号：82654

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15717

研究課題名(和文) 腸管上皮幹細胞ニッチとしての樹状細胞の役割

研究課題名(英文) The Role of Dendritic Cells on the Intestinal Stem Cell Niche

研究代表者

井原 聡三郎 (IHARA, SOZABURO)

公益財団法人朝日生命成人病研究所・その他部局等・教授(移行)

研究者番号：60770039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)は難治の腸炎で、その病態解明が急務である。本研究はIBDにおける樹状細胞と腸上皮の相互作用を解析するため、樹状細胞と腸オルガノイドを共培養する系を確立した。この系により、樹状細胞がIBDに類似した腸上皮分化異常(杯細胞減少)を腸幹細胞レベルから引き起こす事が分かった。この系は薬剤スクリーニングにも利用でき、抗E-cadherin抗体が腸上皮分化異常を改善しうる事が新規に判明し、今後のIBD治療への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、炎症性腸疾患の病態の一つに、樹状細胞を介した腸上皮の分化異常がある可能性を示した。この知見は、腸管において樹状細胞が単に免疫応答を司っているだけではなく、腸上皮細胞に作用しうることを意味しており、腸管粘膜免疫学において重要な学術的意義がある。また、本研究で確立した樹状細胞-腸オルガノイド共培養系は炎症性腸疾患の治療薬探索として有用なツールであり、炎症性腸疾患を対象とした研究への活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD) is chronic inflammation of the gastrointestinal tract, however the pathogenesis of IBD is largely unknown. In this study, we established a co-culture system of dendritic cells (DCs) and intestinal organoids to study the role of interactions between DCs and intestinal epithelium on the pathogenesis of IBD. This co-culture system showed that DCs caused IBD-like abnormal differentiation (goblet cell depletion) from the level of intestinal stem cells. Moreover, this system was useful for IBD drug screening, and we newly found that anti-E-cadherin antibodies ameliorated DC-caused abnormal intestinal differentiation, which suggests the potential of IBD treatment.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 樹状細胞 腸オルガノイド 幹細胞 腸上皮分化異常

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は遺伝的要因、環境要因、腸内細菌などの複雑な要因が発症に関与する。樹状細胞は免疫細胞の一つで、病原体の検知や免疫応答を担うことは良く知られているが、近年の研究で樹状細胞が腸上皮の杯細胞を介して病原体を認識するなど、樹状細胞と腸上皮間の相互作用が議論されている。腸上皮は腸管腔側の病原体に面するため、腸上皮細胞の分化・機能の制御は宿主免疫において重要である。腸上皮細胞は幹細胞から分化するとされ、最終的には吸収細胞、杯細胞、分泌細胞など様々な特徴を有する細胞へと分化する。また、幹細胞の分化は幹細胞ニッチと呼ばれる周囲の細胞らによって維持されている。しかし、樹状細胞などの免疫細胞が幹細胞ニッチとして機能するかは明らかではない。特に IBD では腸上皮細胞の付近に免疫細胞が集まっており、樹状細胞と腸上皮細胞・幹細胞との相互作用がより活発であると想定される。しかしながら、従来のマウスモデルによる研究では生体内で様々な免疫細胞やサイトカインが複雑に炎症に関与しているため、樹状細胞と腸上皮細胞の直接的な相互作用の検討は困難である。そこで、生体外で腸上皮細胞の三次元培養体（腸オルガノイド）と樹状細胞を共培養することで、樹状細胞と腸上皮細胞の相互作用をより詳細に検討できると考えた。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患における樹状細胞と腸管上皮細胞の相互作用の役割を明らかにするため、以下の課題を検討した。

- (1) 樹状細胞と腸オルガノイドの3次元共培養系の確立
- (2) 共培養系を用いた樹状細胞—腸上皮間のシグナル伝達制御の解析
- (3) 樹状細胞が腸管幹細胞ニッチとして機能しているかの検討
- (4) 炎症性腸疾患の病態解明ツールとしての共培養系の有用性

3. 研究の方法

(1) 樹状細胞と腸オルガノイドの3次元共培養系の確立

C57BL/6 の野生型マウスから小腸と骨髄を分離し、腸オルガノイドおよび骨髄由来樹状細胞 (BMDC) をそれぞれ培養した。培養6日目にマトリゲル内で腸オルガノイドと BMDC を共培養し、共培養4日目 (培養10日目) にオルガノイドの形態や直径などの表現型と、遺伝子発現の変化を、非共培養オルガノイド (Control オルガノイド) と比較検討した (図1)。

(2) 共培養系を用いた樹状細胞—腸上皮間のシグナル伝達制御の解析

共培養4日目に腸オルガノイドを回収し、RNA抽出やPFA固定組織切片の作成を行った。Lgr5, Muc2, Lzyl, ChgA, Ki67 など腸上皮細胞の分化・増殖に関連した遺伝子や Hes1, Jagged1, Jagged2 など NOTCH シグナルに関連した遺伝子について、PCR と免疫染色を用いて解析した。

(3) 樹状細胞が腸管幹細胞ニッチとして機能しているかの検討

Lgr5-EGFP-CreERT2 ノックインマウスと Rosa-LSL-tdTomato レポーターマウスを交配して Lgr5 陽性腸管幹細胞から分化した細胞を系譜追跡ができるマウス (Lgr5-Tomato マウス) を作成し、Lgr5-Tomato マウス由来の小腸オルガノイドを共培養実験に用いた。共培養開始時に 4H-Tamoxifen を投与し Cre 遺伝子の発現を誘導した。誘導後にオルガノイドの PFA 固定組織切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いて Tomato 陽性の子孫細胞を観察した。

(4) 炎症性腸疾患の病態解明ツールとしての共培養系の有用性

共培養オルガノイドのメディアムに各種試薬 (NOTCH 阻害剤 DAPT, WNT 阻害剤 C59, 抗 E-cadherin 抗体など) を投与し、共培養オルガノイドの表現型の変化 (治療効果) を顕微鏡を用いて観察した。

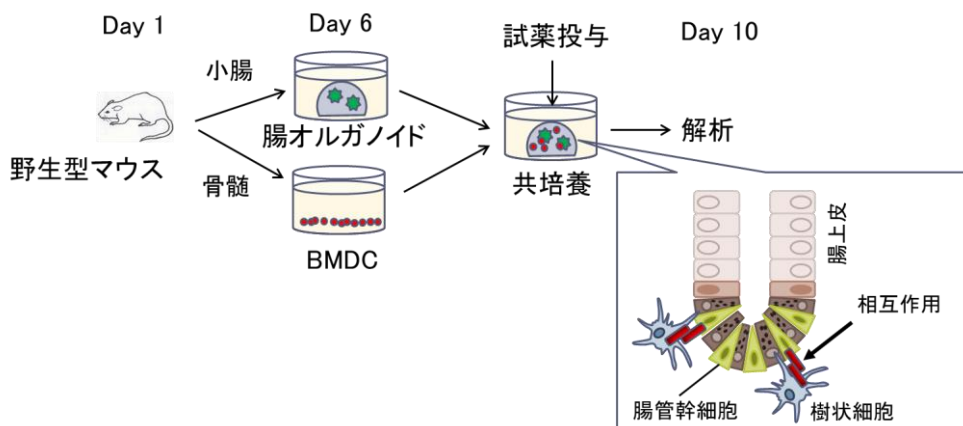


図1. 樹状細胞—腸オルガノイド共培養法の概略図

4. 研究成果

(1) 樹状細胞と腸オルガノイドの3次元共培養系の確立

BMDC と共培養していない小腸オルガノイド (Control) では通常の Budding がみられたが、BMDC と共培養した小腸オルガノイドでは Budding が消失し、嚢胞状に増大した (図2)。共培養4日目の時点で、Control オルガノイドに比して、共培養オルガノイドの直径は5倍以上に増大した。この結果から、樹状細胞が何らかの作用で腸上皮の分化や増殖に変化を生じさせることが分かった。また、BMDC と大腸オルガノイドとの共培養、あるいは腸炎モデルマウス (CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl マウス) 由来の腸管樹状細胞と小腸オルガノイドとの共培養においても、同様の形態異常 (嚢胞状増大) が見られたことから、樹状細胞は小腸だけでなく、大腸の腸上皮の分化にも影響を及ぼすことや、BMDC だけでなく、腸管に存在する樹状細胞でも惹起しうる現象であることが確認された。

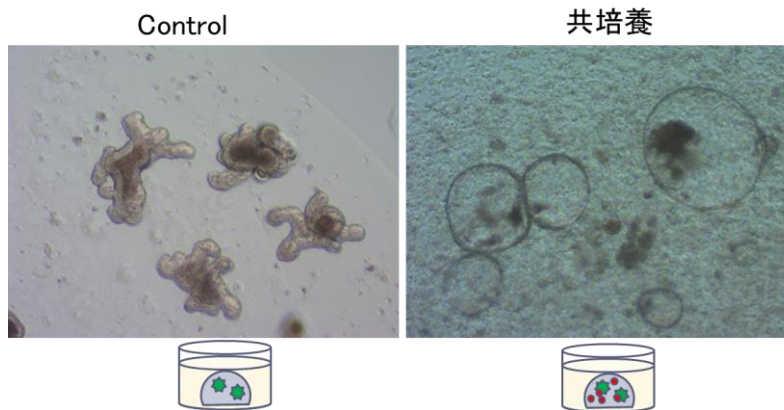


図2. 樹状細胞と腸オルガノイドの3次元共培養の顕微鏡所見

次に、この異常な形態変化 (嚢胞状増大) が樹状細胞と腸管上皮の直接接触による作用かどうかを検討するため、Transwell システムを用いて BMDC と小腸オルガノイドを仕切って共培養した。その結果、Transwell システムによる共培養オルガノイドでは嚢胞状増大は見られず、Budding を伴う通常形態を示した。このことより、樹状細胞と腸管上皮細胞の直接的な接触が腸管上皮細胞の分化異常を引き起こす事が分かった。

(2) 共培養系を用いた樹状細胞-腸上皮間のシグナル伝達制御の解析

樹状細胞-腸管上皮間相互作用と、炎症性腸疾患の病態との関連を調べるため、研究成果(1)で確立した本共培養系を用いて樹状細胞による腸上皮のシグナル伝達制御の変化を解析した。qPCR 法を用いて Notch や WNT など腸上皮分化と関連のあるシグナルの遺伝子発現を解析したところ、BMDC と共培養した腸オルガノイドは、Control オルガノイドに比して、Notch シグナルの亢進 (Hes1 の発現上昇) がみられた。さらに Muc2 の発現低下や、IAP の発現上昇がみられる (図3)、Notch シグナルの亢進により杯細胞への分化が減少し、吸収上皮への分化が亢進している事が示唆された。

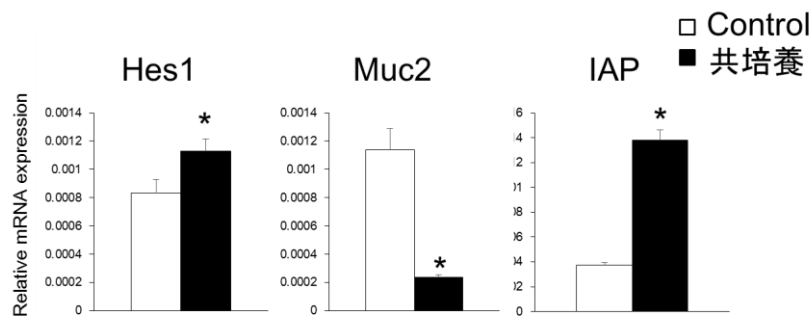


図3. qPCR による Control と共培養オルガノイドの遺伝子発現の比較 (*, $p < 0.05$)

また、免疫染色でも Control オルガノイドに比して、共培養した腸オルガノイドにおいて Hes1 を発現している細胞が多く見られた (図4)。さらに、嚢胞状増大を示す共培養オルガノイドにおいて、Muc2 陽性の杯細胞が顕著に減少していた。これらの結果より、樹状細胞によって引き起こされる腸管上皮細胞の分化異常 (杯細胞減少) は Notch シグナルの亢進を特徴としていることが分かった。Notch シグナルの亢進や杯細胞減少は炎症性腸疾患の腸管上皮細胞でも見られる所見であり、本共培養系で起きている現象が炎症性腸疾患の病態に類似していることが示唆された。

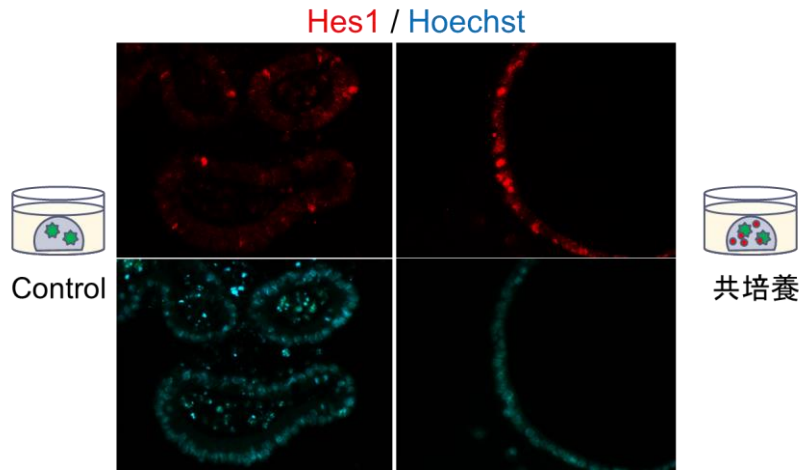


図4. 免疫染色による共培養オルガノイドと Control オルガノイドの Hes1 発現 (赤) の比較。対比染色として Hoechst (青) を用いた。

そこで、NOTCH シグナルの亢進が異常な形態変化 (嚢胞状増大) へ及ぼす影響を検討するため、共培養系に阻害剤を投与する実験を施行した。WNT 阻害剤 C59 を投与した共培養オルガノイドでは嚢胞状増大を抑制できなかったが、NOTCH 阻害剤 DAPT を投与した共培養オルガノイドでは嚢胞状増大は顕著に抑制され、Budding を伴う通常形態のオルガノイドが観察された (図5)。

また、DAPT 投与オルガノイドの切片を用いた免疫染色では Muc2 陽性の杯細胞が通常通り見られた。これらの結果から、樹状細胞を介した腸上皮細胞の NOTCH シグナル亢進が腸オルガノイドの杯細胞減少や異常な形態変化を引き起こしていることが分かった。

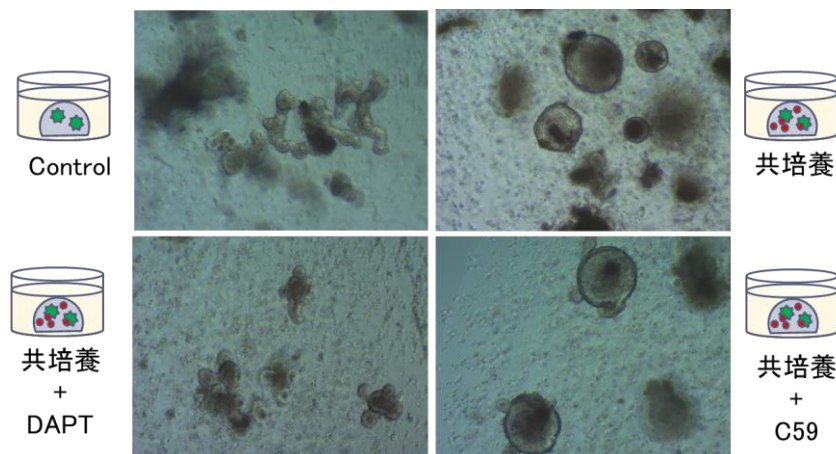


図5. NOTCH 阻害剤 DAPT あるいは WNT 阻害剤 C59 投与による共培養オルガノイドの形態変化

(3) 樹状細胞が腸管幹細胞ニッチとして機能しているかの検討

まず、Cre 遺伝子を誘導しない条件下では、野生型マウス由来の共培養系と同様に、Lgr5-tomato マウス由来の共培養オルガノイドも嚢胞状増大を示した。次に、共培養開始時にタモキシフェンを投与し Cre 遺伝子誘導を行った。しかしながら、タモキシフェン投与あるいはタモキシフェンの溶媒 (100%エタノール) によりオルガノイドが死滅あるいは増殖が抑制されたため、タモキシフェンの最適な投与量の検討に時間を要した。

予備実験の範囲では、少なくともタモキシフェン 50nM を投与下においては、Lgr5-tomato マウス由来の Control および共培養オルガノイドは死滅することなく、一部のオルガノイドでタモキシフェンにより誘導された tomato 陽性子孫細胞を観察することができた。また、Control オルガノイドに比して、共培養オルガノイドの tomato 陽性子孫細胞では杯細胞が減少していた。この結果は樹状細胞が腸管幹細胞の分化に直接的に影響を与えていることを示唆するが、より安定したタモキシフェン誘導が必要であり、今後さらなる検討を予定している。

(4) 炎症性腸疾患の病態解明ツールとしての共培養系の有用性

以前に我々は CD11c-Cre Tgfbr2 f1/f1 マウスが炎症性腸疾患様の大腸炎を自然発症する (図8) ことを報告したが、Cre 陰性マウスに比して CD11c-Cre Tgfbr2 f1/f1 マウスの腸管樹状細胞において E-cadherin の発現が顕著に上昇していることを新たに見出した。そこで、本研究では樹状細胞の E-cadherin が腸炎に及ぼす影響と、E-cadherin を標的とした治療の可能性について、共培養系を活用して検討した。

抗 E-cadherin 抗体を本共培養系に投与したところ、共培養オルガノイドにおける嚢胞状増大が抑制された (図 6)。特に、E-cadherin の外部ドメインを標的とした抗 E-cadherin 抗体 (DECMA-1, SHE78-7) では嚢胞状増大が抑制されたが、E-cadherin の内部ドメインを標的とした抗 E-cadherin 抗体 (24E10, 34) では嚢胞状増大が抑制されなかった。これらの結果から E-cadherin が樹状細胞による腸上皮の分化異常に関与していることが示唆され、E-cadherin の外部ドメインを標的とした治療戦略が考えられる。

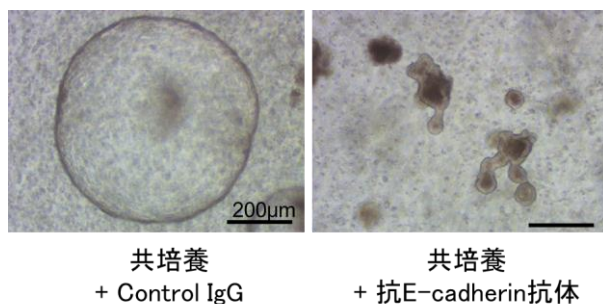


図 6. 抗 E-cadherin 抗体あるいは Control IgG 投与下の共培養オルガノイドの顕微鏡所見

そこで、DECMA-1 を CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl マウスに投与したところ、Control IgG を投与した CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl マウスに比して、大腸炎が抑制された (図 7)。また、他の腸炎モデルである T 細胞移入マウスモデルにおいても、DECMA-1 による腸炎抑制効果が確認された。

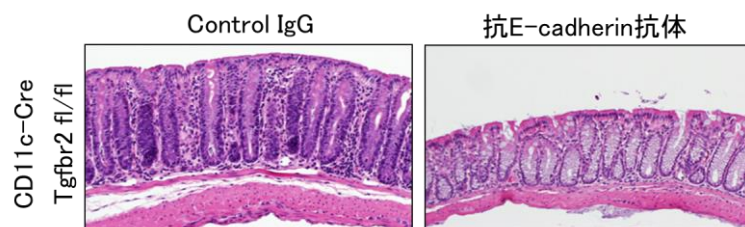


図 7. 抗 E-cadherin 抗体あるいは Control IgG 投与後の CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl マウスの大腸組織 (HE 染色)

次に、CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl マウスと Cdh1 fl/fl マウスを交配させ、CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl Cdh1 fl/fl マウスを作成した。CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl Cdh1 fl/fl マウスでは腸炎が抑制された (図 8)。また、CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl Cdh1 fl/fl マウス由来の BMDC を共培養実験に用いたところ、異常な形態変化 (嚢胞状増大) が抑制された。これらの結果から樹状細胞の E-cadherin が腸上皮の分化異常や腸炎発症に関与することが示唆された。

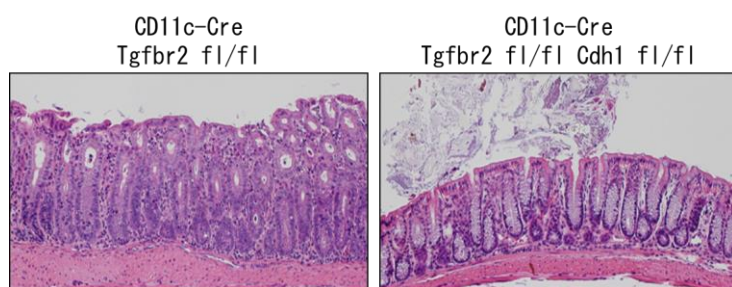


図 8. CD11c-Cre Tgfbr2 fl/fl Cdh1 fl/fl マウスの大腸組織 (HE 染色)

最後に、炎症性腸疾患患者の大腸生検検体から樹状細胞を分離しフローサイトメトリーを用いて樹状細胞の E-cadherin の発現を解析した。その結果、炎症性腸疾患患者は健常者に比して腸管樹状細胞の E-cadherin 発現が亢進していることが分かった。樹状細胞の E-cadherin が炎症性腸疾患の発症に関与し、また治療標的となりうることが本研究から示唆された。

以上より、本研究で確立した樹状細胞-腸オルガノイドの共培養系が、炎症性腸疾患の病態解明や治療薬の探索に有用であることが分かった。本共培養系は国内外問わず、今後の炎症性腸疾患の研究への利用が大いに期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① [Ihara Sozaburo](#), Hirata Yoshihiro, Hikiba Yohko, Yamashita Aya, Tsuboi Mayo, Hata Masahiro, Konishi Mitsuru, Suzuki Nobumi, Sakitani Kosuke, Kinoshita Hiroto, Hayakawa

Yoku, Nakagawa Hayato, Ijichi Hideaki, Tateishi Keisuke, Koike Kazuhiko, Adhesive Interactions between Mononuclear Phagocytes and Intestinal Epithelium Perturb Normal Epithelial Differentiation and Serve as a Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease, Journal of Crohn's and Colitis, 2018 Nov 9;12(10):1219-1231, DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjy088 (査読有).

[学会発表] (計 2件)

- ① Sozaburo Ihara, Yoshihiro Hirata, Kazuhiko Koike, Abrogation of TGF-beta Signaling in Dendritic Cells Leads to E-cadherin-mediated Adhesion between Dendritic Cells and Epithelium which Contribute to the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease, Experimental Biology 2018年4月25日、サンディエゴ、アメリカ
- ② 井原聡三郎、平田喜裕、小池和彦、炎症性腸疾患における樹状細胞・腸上皮間の Notch シグナルを介した相互作用、第55回日本臨床分子医学会学術集会、2018年4月13日、京都

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：