

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02915

研究課題名(和文) 2型自然免疫における小腸刷子細胞受容体の機能解明と食品への応用展開

研究課題名(英文) Elucidation of intestinal tuft cell-expressed receptor function in type 2 innate immunity and its application to food science

研究代表者

石丸 喜朗 (Ishimaru, Yoshiro)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：10451840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：寄生虫を感知する小腸刷子細胞が蛍光標識され生体イメージング解析が可能なマウスを作出して、コハク酸、サリシンや線虫培養上清に対する刷子細胞やその周囲における応答が検出できた。刷子細胞頂端部に局在するGprc5c受容体欠損マウスは、コハク酸投与下では小腸粘膜固有層に存在する2型自然リンパ球の細胞数が野生型マウスより多かった。つまり、炎症時においてGprc5c受容体は2型自然免疫応答を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、刷子細胞頂端部に局在するオーファン受容体Gprc5cが、炎症時において2型自然免疫応答を抑制すると示唆されたことから、今後、Gprc5cのリガンドやその活性を調節する化合物を同定することによって、アレルギー性疾患や肥満・糖尿病の予防や治療に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Using transgenic mice for in vivo live imaging in which intestinal tuft cells detecting helminths are fluorescent-labeled, we detected responses to succinic acid, salicin, and nematode excretory/secretory product in tuft cells or their surrounding cells. When succinic acid was administered, the number of type 2 innate lymphoid cells present in intestinal lamina propria was larger in tuft cell-localized Gprc5c knockout mice than in wild-type mice, suggesting that Gprc5c may suppress type 2 innate immune response during inflammation.

研究分野：食品科学

キーワード：受容体 消化管 代謝 免疫 遺伝子破壊マウス 刷子細胞 生体イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、アレルギー性疾患や寄生虫感染に対する 2 型免疫応答では、抗原特異的な獲得免疫によって誘導される Th2 細胞と Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13 など) が重要な役割を果たしていると考えられてきた。2010 年、マウスやヒト腸間膜の脂肪組織内から、IL-33 や IL-25 の刺激によって多量の IL-13 や IL-5 を産生する新たなリンパ球として、2 型自然リンパ球 (ILC2) が同定された (Moro et al., *Nature*, 2010; Neil et al., *Nature*, 2010; Price et al., *PNAS*, 2010)。さらに、ILC2 は様々な組織 (肺、皮膚、脳、心臓、筋肉、腸管、肝臓など) に存在していることが明らかとなった (Nussbaum et al., *Nature*, 2013)。現在では、2 型免疫応答において獲得免疫だけでなく自然免疫も重要な役割を担うと考えられている。

小腸上皮細胞の約 0.4% を占める刷子細胞は 60 年以上前に発見されたが、どのような機能を持つか長い間不明であった。2016 年、IL-25 の分泌源として刷子細胞が同定され、寄生虫感染に対して刷子細胞はセンサーとして 2 型免疫応答の始動において重要な働きをすることが報告された (von Moltke et al., *Nature*, 2016; Gerbe et al., *Nature*, 2016; Howitt et al., *Science*, 2016)。寄生虫に感染すると刷子細胞から分泌される IL-25 を介して ILC2 が活性化され、IL-5 による好酸球の誘導や、IL-13 による刷子細胞と杯細胞の過形成が生じる。刷子細胞過形成は IL-25 発現をさらに亢進するという正のフィードバックループによって寄生虫の駆除が促進されることが明らかとなった。刷子細胞内では、Gnat3 と Trpm5 が下流シグナル伝達因子として働くことも示された。

さらに、刷子細胞に発現するコハク酸受容体 GPR91 が、原虫の産生するコハク酸を検知することによって 2 型免疫が始動することが示された (Lei et al., *PNAS*, 2018; Schneider et al., *Cell*, 2018; Nadjsonbati et al., *Immunity*, 2018)。しかし、線虫感染に対しては、GPR91 欠損マウスでは正常な 2 型免疫応答が起き、野生型マウスと同様に線虫が駆除されたため、刷子細胞がどのようにして線虫を検知するかは未解明である。感染性胃腸炎を引き起こすヒトノロウイルスの代替モデルとしてマウスノロウイルス (MNoV) が用いられている。MNoV は、その受容体 CD3001f を発現する刷子細胞を標的として感染することが示された (Wilén et al., *Science*, 2018)。一方、研究代表者は、刷子細胞に発現する受容体を新たに同定する目的で、野生型マウスと刷子細胞が消失している転写制御因子 Skn-1 欠損マウス間で、小腸上皮における遺伝子発現プロファイルを RNA-Seq 法を用いて比較して候補遺伝子を抽出し、免疫組織学的解析を行った。その結果、刷子細胞の頂端部に局在するオーファン受容体 Gprc5c を発見した。

免疫と代謝の関係に着目すると、ILC2 が肥満を抑制する働きがあることが報告されている。ILC2 を刺激する IL-33 の欠損マウスは、高脂肪食を給餌すると野生型マウスより体重が増加した。この機構として、ILC2 から分泌されるエンケファリンが白色脂肪細胞に作用してベージュ脂肪細胞へ変化させ、熱産生を亢進すること (Brestoff et al., *Nature*, 2015) や、ILC2 と好酸球から分泌される IL-4 や IL-13 が、脂肪前駆細胞の分化を白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞へ変化させること (Lee et al., *Cell*, 2015) が示された。一方、研究代表者は、Skn-1 欠損マウスでは摂餌量は不変だったが、カテコールアミンの過分泌によって消費エネルギーが増加したために、低体脂肪率を伴う顕著な低体重を示すことを明らかにした (Ushiyama et al., *EBioMedicine*, 2016)。しかし、腸間膜リンパ節と粘膜固有層における ILC2 の数は、野生型と Skn-1 欠損マウスで差がなかった (Gerbe et al., 2016) ため、刷子細胞が無くなると低体重となる理由はこれまでの知見からは説明できていなかった。

2. 研究の目的

小腸刷子細胞は、アレルギー性疾患や寄生虫感染に対する 2 型免疫応答の始動において、センサーとして重要な働きをする。本研究では、小腸刷子細胞の頂端部に局在することを研究代表者自らが発見したオーファン受容体 Gprc5c の生理機能を解明し、アレルギー性疾患や肥満・糖尿病の予防や治療に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

1) オーファン受容体 Gprc5c 欠損マウスの表現型解析

ゲノム編集法 (TALEN 法と CRISPER/Cas9 法) により作出したフレームシフト変異を持つ Gprc5c 受容体欠損マウスを用いて、Skn-1 欠損マウスで行ったエネルギー代謝に関する表現型解析法 (Ushiyama et al., 2016) を含む様々な手法で、代謝や 2 型自然免疫に関する表現型を解析した。

エネルギー代謝に関する表現型解析

エネルギー代謝に関する表現型を解析し、Skn-1 欠損マウスと同様の表現型を示すかを調べた。具体的には、1) 普通食・高脂肪食摂取条件下における継時的な体重変化の測定 2) 白色脂肪組織や肝臓など各組織の重量測定 3) 摂餌量・摂水量の測定 4) 代謝測定システムを用いたエネルギー消費量、呼吸商、自発運動量の測定 5) 経口糖負荷試験などを行った。

2 型自然免疫に関する表現型解析

通常飼育下あるいは 100 mM コハク酸を 4 日間投与した条件下で、小腸上皮や小腸粘膜固有層から単一細胞の懸濁液を調製し、刷子細胞、杯細胞や ILC2 の細胞数の割合を FACS を用いて解析した。また、免疫染色法や qPCR 法によって、刷子細胞や杯細胞の過形成と IL-25 や 2 型サイトカイン量を調べた。

2) Gprc5c 受容体およびコハク酸受容体の活性化・阻害物質の探索

培養細胞発現系を用いて Gprc5c 受容体とコハク酸受容体の評価系を構築し、抗アレルギー作用や抗肥満効果が期待される受容体の活性化・阻害物質を食品由来因子等から探索した。

Gprc5c 受容体評価系の構築

Gprc5c 受容体のリガンドを同定するために、培養細胞を用いた評価系の構築を試みた。Gprc5c 受容体をキメラ G タンパク質 G16/gust44 (G α 16 の C 末端 44 残基を刷子細胞に発現する Gnat3 の対応する残基に置換) やカルシウム結合型発光タンパク質 Clytin-II と共に HEK293T 細胞に一過的に発現させ、発光基質 Coelenterazine を負荷し、マイクロプレートリーダー Flexstation 3 を用いた発光イメージング法 (Toda et al., J Biol Chem, 2013) でリガンド探索を行った。糖、アミノ酸、脂肪酸など栄養素やその消化産物、寄生虫、乳酸菌ライブラリーやその代謝産物、小腸内容物などをリガンド候補として投与した。

コハク酸受容体 GPR91 評価系の構築と阻害物質の探索

抗アレルギー作用が期待される GPR91 を阻害する物質を同定するために、培養細胞を用いた評価系を構築した。培養細胞内で G α i 系と共役する GPR91 がコハク酸を受容すると、PLC β を介した PI ターンオーバーを経て細胞内カルシウム濃度が上昇した (Sundström et al., FEBS Lett, 2013)。Gnat3 は刷子細胞に発現し、寄生虫検知後の下流シグナル伝達因子として働く (Howitt et al., 2016)。そこで、発光イメージング法によりコハク酸に対する GPR91 の応答を調べた。さらに、乳酸菌やその代謝産物を含む食品由来因子などから、抗アレルギー作用が期待される GPR91 の阻害物質の同定を試みた。

3) 生体イメージング法を用いた刷子細胞の機能解析

培養細胞発現系より生体に近い条件で刷子細胞の機能解析を行うために、カルシウムバイオセンサー YC3.60 を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを用いた生体イメージングを実施した。まず、低頻度の刷子細胞を容易に識別できるようにする目的で、刷子細胞特異的に発現する Trpm5 遺伝子のプロモーター領域制御下に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現誘導させる Trpm5-tTomato Tg マウスを作出した。次に、両系統を交配させたマウスの小腸を用いて、様々な物質に対する刷子細胞の応答を調べた。

4. 研究成果

1) Gprc5c 受容体欠損マウスを用いて、高脂肪食投与条件下で、体重や臓器重量変化を野生型マウスと比較した。その結果、有意な差は認められなかった。さらに、様々な方法でエネルギー代謝に関する表現型解析を行ったが、明確な表現型を示さなかった。

次に、野生型および Gprc5c 受容体欠損マウスにおいて、小腸粘膜固有層に存在する ILC2 (PI-, Lineage-, CD45+, PE+, Sca-1+) の細胞数を FACS を用いて測定した。その結果、通常飼育下では、野生型と欠損マウス間で ILC2 の細胞数に有意差はなかった。一方で、コハク酸を投与し 2 型自然免疫応答が亢進した状態では、欠損マウスは野生型マウスより ILC2 の細胞数が多かった。以上より、炎症時において Gprc5c 受容体は 2 型自然免疫応答を抑制することが示唆された。

2) 化合物ライブラリーを用いて、Gprc5c 受容体のリガンド探索を行ったが、リガンド同定には至らなかった。一方、培養細胞を用いてコハク酸受容体の機能解析系の構築を試みたところ、濃度依存的な細胞応答が観察された。しかし、Gprc5c 受容体やコハク酸受容体の阻害物質は同定できなかった。

3) まず、刷子細胞特異的に発現する Trpm5 遺伝子のプロモーター領域制御下に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現誘導させる Trpm5-tTomato Tg マウスを作出した。その結果、複数系統の Trpm5-tTomato Tg マウスが得られ、刷子細胞特異的に赤色蛍光が観察された。次に、YC3.60 Tg マウスと交配させて、刷子細胞を特異的に標識した YC3.60 マウスを作出することに成功した。このマウスを用いて、まず、ATP 投与時の小腸上皮細胞の応答を観察したところ、応答をリアルタイムに可視化することができた。次に、刷子細胞のリガンドとして知られているコハク酸とサリシンに対する応答を調べたところ、刷子細胞の周囲において蛍光比の上昇が観察された。さらに、マウスの寄生虫感染モデルとして広く利用される線虫 *N. brasiliensis* (Nb) に対する刷子細胞の応答を可視化することを目的として、調整方法が異なる 2 種類の Nb 代謝産物を含む試料に対する応答を解析した。線虫サンプルは、RPMI-1640 培地中に Nb を生育させて得られた上清 (NES) と、Nb を PBS 中でホモジナイズしたもの (Nb 破砕サンプル) を作製した。生体イメージング法による解析では、NES の投与によって刷子細胞とその周囲においてカルシウム濃度が上昇する様子が観察された。一方、Nb 破砕サンプルに対する応答は検出されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Toda Y, Ko MC, Liang Q, Miller ET, Rico-Guevara A, Nakagita T, Sakakibara A, Uemura K, Sackton T, Hayakawa T, Sin SYW, Ishimaru Y, Misaka T, Oteiza P, Crall J, Edwards SV, Buttemer W, Matsumura S, Baldwin MW.	4. 巻 373
2. 論文標題 Early origin of sweet perception in the songbird radiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 226-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abf6505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Toda Y, Hayakawa T, Itoigawa A, Kurihara Y, Nakagita T, Hayashi M, Ashino R, Melin AD, Ishimaru Y, Kawamura S, Imai H, Misaka T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Evolution of the primate glutamate taste sensor from a nucleotide sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Biol	6. 最初と最後の頁 4641-4649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu T, Kubozono T, Asaoka R, Toda Y, Ishimaru Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Expression profiles and functional characterization of common carp (Cyprinus carpio) T2Rs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 101123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasahara Y, Narukawa M, Ishimaru Y, Kanda S, Umatani C, Takayama Y, Tominaga M, Oka Y, Kondo K, Kondo T, Takeuchi A, Misaka T, Abe K, Asakura T.	4. 巻 71
2. 論文標題 TMC4 is a novel chloride channel involved in high-concentration salt taste sensation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-021-00807-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 遼、中北 智哉、戸田 安香、石丸 喜朗
2. 発表標題 小腸刷子細胞に発現するGprc5c受容体欠損マウスの免疫系における表現型解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅岡 亮太、清水 駿希、中北 智哉、戸田 安香、石丸 喜朗
2. 発表標題 コイ苦味受容体T2Rの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田 安香、早川 卓志、糸井川 壮大、栗原 洋介、中北 智哉、Amanda Melin、河村 正二、今井 啓雄、石丸 喜朗、三坂 巧
2. 発表標題 霊長類における旨味受容体のヌクレオチド感受性と食性の関わり
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田 安香、石丸 喜朗、三坂 巧
2. 発表標題 霊長類におけるグルタミン酸の旨味受容と食物の関わり
3. 学会等名 第75回日本人類学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成川 真隆、笠原 洋一、石丸 喜朗、三坂 巧、阿部 啓子、朝倉 富子
2. 発表標題 塩味受容に關与する新規分子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝比奈 瞭、楠 真友子、戸田 安香、安達 貴弘、石丸 喜朗
2. 発表標題 小腸刷子細胞におけるイメージング法の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田 安香、石丸 喜朗、三坂 巧
2. 発表標題 霊長類におけるグルタミン酸の味受容の進化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田 安香、早川 卓志、栗原 洋介、中北 智哉、河村 正二、今井 啓雄、石丸 喜朗、三坂 巧
2. 発表標題 霊長類旨味受容体の機能と食性の関わり の 解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保園 峻、戸田 安香、石丸 喜朗
2. 発表標題 コイ味覚受容体の発現解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田 安香、早川 卓志、中北 智哉、河村 正二、今井 啓雄、石丸 喜朗、三坂 巧
2. 発表標題 霊長類旨味受容体における高いグルタミン酸感受性獲得の分子機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

明治大学農学部農芸化学科食品機能化学研究室 https://meiji-agrichem.jp/professor/p_ishimaru/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------