

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17452

研究課題名(和文) 間葉系細胞によるパネート細胞機能制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanism for Paneth cell function by mesenchymal cells

研究代表者

神岡 真理子 (Kamioka, Mariko)

東京大学・医科学研究所・特別研究員

研究者番号：00835796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小腸上皮細胞の一種であるパネート細胞は、抗菌ペプチドを分泌し宿主防御に寄与する。また間葉系細胞と共に隣接する上皮幹細胞のニッチを形成し、小腸全体の恒常性維持にも寄与する。腸炎発症時の病態形成は小腸部位ごとに異なることから、本研究においては小腸部位ごとのパネート細胞および間葉系細胞を比較解析を試みた。その結果、十二指腸・回腸それぞれで多く存在するパネート細胞サブセットに特異的な遺伝子を同定し、特に回腸特異的なパネート細胞において発現する糖鎖を特定、その機能を明らかにした。また回腸パネート細胞サブセットの制御に重要な免疫細胞シグナルカスケードを同定し、それらの結果をまとめた論文を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで単一の細胞集団とされていたパネート細胞に、糖鎖を指標としたサブセットが存在することを明らかにした。またサブセット特異的な糖鎖の機能を示し、さらにパネート細胞サブセットの制御に関与する免疫細胞シグナルを同定した。以上より、免疫・非免疫細胞およびそれらを修飾する糖鎖の粘膜免疫システムとの関連の一端が本研究において示された。本研究で着目した糖鎖は腸管関連疾患と関わることから、同定されたパネート細胞サブセットの腸管恒常性への貢献やその破綻による病態形成が予想される。よってパネート細胞サブセットの更なる解析により、腸管関連疾患の治療法・予防法の確立への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Paneth cells, a type of small intestinal epithelial cells, secrete antimicrobial peptides to contribute to host defense. Together with mesenchymal cells, they form a niche for intestinal epithelial stem cells for the homeostasis of the entire small intestine. It has been reported that each region of the small intestine shows the different intestinal pathogenesis. In this study, we tried to compare Paneth cells and mesenchymal cells in each region of the small intestine. As a result, we identified genes specific to duodenal and ileal Paneth cell subsets respectively. Especially, some glycans expressed on ileum-specific Paneth cells and contributed to the function of Paneth cells. We also identified an immune cell signaling cascade that regulates the ileal Paneth cell subset.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：パネート細胞 Paneth cell 糖鎖 粘膜免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管は上皮細胞層を介して膨大な数の食餌成分や細菌、ウイルスといった外来抗原に常に暴露されており、消化機能を担うだけでなく病原微生物や有害物質に対する第一線の生体バリアとして機能する。小腸では内腔表面に細長い絨毛構造が連なっており、その底の部分にあたる陰窩基底部には上皮細胞の一種であるパネート細胞と上皮幹細胞が局在する。パネート細胞の主な役割は自然免疫による宿主防御であり、細胞質内に有する抗菌ペプチド ディフェンシン等を含む多数の分泌顆粒を刺激に応じて腸管管腔内に放出する。また、パネート細胞は EGF, Dll4, Wnt3 などの幹細胞増殖因子を分泌し上皮幹細胞ニッチを形成することで、隣接する上皮幹細胞を維持する。上皮幹細胞はすべての小腸上皮細胞に分化するため、パネート細胞は小腸全体の恒常性維持にも寄与すると考えられている。実際、パネート細胞の機能不全は炎症性腸疾患を始めとする病態形成の起点となることが報告されており、その制御メカニズムおよび病態におけるパネート細胞の更なる解析が求められている。パネート細胞の直下には支持組織の間葉系細胞が隣接する。間葉系細胞も上皮幹細胞ニッチを形成することにより、腸管恒常性に貢献する。

腸管恒常性維持に欠かせない要素として、腸内細菌との共生が挙げられる。腸内細菌との共生環境構築や感染防御バリアは様々な環境・宿主因子により制御されるが、特に腸管上皮細胞を覆う糖鎖は重要な要素とされる。その中でも糖鎖の一種であるフコースは2型フコース糖転移酵素遺伝子 (*Fut2*) により制御され、消化管粘膜バリアの構築や腸管関連疾患との関与が報告されている。小腸は胃側から十二指腸、空腸、回腸に分けられるが、*Fut2* は腸管上皮細胞において十二指腸と比較して回腸で強く発現が認められる。*Fut2* と、もう一つのフコース糖転移酵素遺伝子 *Fut1* をそれぞれ欠損するマウスの小腸上皮細胞をサンプルとして用いて、糖鎖を指標とした組織学的解析およびフローサイトメトリー解析を行った。さらに、遺伝子レポーターマウス *Fut2-LacZ/+* マウスの小腸組織切片を LacZ 染色することでその遺伝子発現について解析した。その結果、パネート細胞における *Fut2* の発現を確認し、さらに *Fut2* 発現パネート細胞 (*Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞)・非発現パネート細胞の2つのパネート細胞サブセットが存在することを明らかにした。続いて小腸における *Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞の局在を調べたところ、その多くが十二指腸ではなく回腸に局在していた。回腸においては十二指腸と比較して腸内細菌が多く存在することから、腸内細菌刺激が *Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞の分化に必要である可能性を考えた。そこで腸内細菌を消失させるため、マウスに抗生物質を経口投与したところ、*Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞は消失した。続いて3型自然リンパ球 ILC3 から腸内細菌刺激依存的に産生されるサイトカイン IL-22 の関与を検討する為 IL-22 欠損マウスを解析したところ、*Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞の消失が認められた。これらの結果から *Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞の分化には腸内細菌刺激および IL-22 刺激が必要であることが判明した。一方、獲得免疫に関わる T 細胞および B 細胞を欠損する *Rag1* 欠損マウスにおいては *Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞の消失は認められなかった。以上の先行データにより、部位特異的なパネート細胞サブセットである *Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞は小腸の中でも回腸に局在し、腸内細菌および IL-22 依存的に分化することが明らかとなった。

近年、腸管上皮細胞についての遺伝子発現解析が進み、パネート細胞をはじめとする腸管上皮細胞は小腸の部位ごとで異なる遺伝子発現パターンを示すことが報告された。一方、腸炎発症時においては、炎症などの病態形成や程度も部位ごとに異なることが報告されている。回腸では十二指腸と比較して、クローン病を始め、多くの病態形成が確認されている。申請者の先行研究では、上記の通り腸内細菌および IL-22 依存的な *Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞の回腸での局在が明らかとなっている。しかしながら、*Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞の機能制御メカニズムの詳細や、隣接する間葉系細胞の *Fut2<sup>+</sup>* パネート細胞および上皮幹細胞ニッチ形成への関与については、未だ不明点が多くある。さらに、申請者自身の先行研究において腸管上皮細胞の機能で十二指腸側と回腸側で強弱が見られた。特に、回腸側のパネート細胞は幹細胞ニッチ形成能が著しく低い可能性が示唆されたが、もう一つの幹細胞ニッチ形成細胞である間葉系細胞については不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、回腸側のパネート細胞は幹細胞ニッチ形成能が著しく低い可能性に着目し、「回腸でのパネート細胞の上皮幹細胞ニッチ形成能の低下を、間葉系細胞が補完する」という仮

説を立てた。仮説の検証を中心に間葉系細胞によるパネート細胞制御メカニズムを解析することにより、腸炎などの病態形成や組織修復メカニズムを解き明かし、新たな治療法の提案を目指した。

### 3. 研究の方法

- 1) マウスの小腸および大腸の各部位における間葉系細胞の単離を試みた。
- 2) パネート細胞内顆粒に結合する蛍光プローブ Zinpyr-1 とフコース特異的に結合するレクチン UEA-1 を用いたフローサイトメトリー法を駆使して、Fut2 発現パネート細胞 (Fut2<sup>+</sup>パネート細胞)・非発現パネート細胞の細胞内密度から細胞内顆粒を評価した。
- 3) フコースのパネート細胞における役割を検討する為、Fut2 欠損マウスのパネート細胞内構造について顕微鏡観察を行った。また、Fut2 欠損マウスと野生型マウスの糞便中のパネート細胞特異的抗菌ペプチドである ディフェンシン量を、ELISA 法を用いて比較解析した。
- 4) マウス小腸から上皮細胞を単離し、3D 培養を可能とするマトリゲルを用いて試験管内の臓器であるオルガノイドを作製した。そしてオルガノイド中のパネート細胞の顆粒分泌を、共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて観察、測定した。
- 5) サイトカイン IL-17a のパネート細胞から分泌される ディフェンシン量制御への関与を検討するため、IL-17a 欠損マウスの糞便も ELISA 法で解析した。

### 4. 研究成果

まず、小腸各部位における間葉系細胞の単離技術の獲得を試みた。しかしながら、大腸解析で既に確立されていた間葉系細胞の単離法の小腸解析への応用は、その構造の大きな違いから、非常に困難であることが判明した。よって上皮細胞側であるパネート細胞について、より深く解析することとした。その際、病態発生の多い回腸側に分布が偏る Fut2<sup>+</sup>パネート細胞の解析を進めることにより、腸管部位により違いのある病態形成メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。

パネート細胞内顆粒に結合する蛍光プローブ Zinpyr-1 とフコース特異的に結合するレクチン UEA-1 を用いたフローサイトメトリー法を駆使して Fut2<sup>+</sup>パネート細胞を評価したところ、Fut2<sup>+</sup>パネート細胞は感染防御に重要な抗菌ペプチドを内包する細胞内顆粒を豊富に有した。よって、Fut2<sup>+</sup>パネート細胞は感染防御に深く関わることが示唆された。

Fut2 のパネート細胞における機能を検討するため、Fut2 欠損マウスのパネート細胞を組織学的に解析した。その結果、Fut2 欠損マウスのパネート細胞内顆粒は異常形態を示した。また糞便 ディフェンシンを測定したところ、野生型マウスと比較して有意に減少していた。さらに小腸上皮細胞由来のオルガノイドを作製し、オルガノイド内のパネート細胞の顆粒放出について野生型マウスと Fut2 欠損マウスを共焦点レーザー顕微鏡システムで比較した。その結果、Fut2 欠損マウス由来では顆粒放出の割合が減少していた。さらに、Fut2 の発現を誘導するサイトカイン IL-22 を培地に添加した場合は、非添加コントロールのオルガノイドと比較してパネート細胞の顆粒放出が促進された。以上の結果から、Fut2 により誘導されるフコースはパネート細胞の顆粒分泌を制御することが示された。

獲得系免疫シグナルの一つである IL-17a のパネート細胞制御への関与も検討するため、IL-17a 欠損マウスの糞便 ディフェンシンの測定も行った。その結果、IL-17a 欠損マウスの糞便 ディフェンシンの濃度が野生型マウスと比較して減少していた。以上から、パネート細胞は IL-17a の制御も受けることが明らかとなった。

以上の研究結果は2022年1月13日、米国科学アカデミー紀要「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America」(PNAS、オンライン版)に掲載された。パネート細胞は腸管関連疾患と感染症の制御に関与する事が知られており、今回見出したパネート細胞サブセットの Fut2<sup>+</sup>パネート細胞と、その誘導・機能制御機構の理解は、さらなる病態形成メカニズムの解明とそれを標的とした新規予防・治療法の開発に繋がることが期待される。

本研究課題では引き続き、マウスを用いて腸炎発症時における Fut2<sup>+</sup>パネート細胞および間葉系細胞について解析、コントロールマウスとの比較を進めている。今後は周辺に存在する免疫細胞の関与を含め、さらに詳細に腸管組織を解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamioka Mariko, Goto Yoshiyuki, Nakamura Kiminori, Yokoi Yuki, Sugimoto Rina, Ohira Shuya, Kurashima Yosuke, Umemoto Shingo, Sato Shintaro, Kunisawa Jun, Takahashi Yu, Domino Steven E., Renauld Jean-Christophe, Nakae Susumu, Iwakura Yoichiro, Ernst Peter B., Ayabe Tokiyoshi, Kiyono Hiroshi	4. 巻 119
2. 論文標題 Intestinal commensal microbiota and cytokines regulate Fut2+ Paneth cells for gut defense	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2115230119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2115230119	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 神岡真理子、清野宏	4. 巻 6
2. 論文標題 腸内細菌および免疫シグナル依存的腸管バリア担当Fut2+パネート細胞の発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 消化器病学サイエンス	6. 最初と最後の頁 190-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神岡真理子
2. 発表標題 Analysis of Paneth cell glycosylation and function throughout the small intestine
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mariko Kamioka
2. 発表標題 Elucidation of induction mechanism for Paneth cell subset
3. 学会等名 Young Investigator Symposium（東京大学医科学研究所）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神岡真理子
2. 発表標題 Plasmodium infection causes the dysfunction of gastrointestinal system
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

腸管バリアに重要なバネート細胞サブセットの発見 <a href="https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/page_00064.html">https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/page_00064.html</a> 腸管バリアに重要なバネート細胞サブセットの発見 <a href="https://www.chiba-u.ac.jp/others/topics/info/post_1048.html">https://www.chiba-u.ac.jp/others/topics/info/post_1048.html</a> 腸管バリアに重要なバネート細胞サブセットの発見 <a href="https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220119_pr.pdf">https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220119_pr.pdf</a>
--

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		
米国	University of California, San Diego	University of Michigan Medical Center	
ベルギー	Catholic University of Louvain		