

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17615

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における自然リンパ球を介した自己免疫寛容とその破綻機構の解明

研究課題名(英文)Functional elucidation of innate lymphoid cells in inflammatory bowel disease

研究代表者

荻野 崇之(Ogino, Takayuki)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：50597458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は自然リンパ球(ILC)に着目し、IBD病態における免疫機構の解明を目的とした。大腸粘膜にどのようなILCが存在するのか解析した。flow cytometry解析したところ、ILC1とILC3が存在し、いずれもリンパ球の形態であった。次にIBDである潰瘍性大腸炎(UC)検体を用いて解析を行った。UC非炎症部と正常大腸では、ILC分布に差はないが、炎症部ではILC1が増加、ILC3が減少していた。ILC3はRORCやIL23Rを高発現し、ILC3中NKp44+分画はIL22を発現していた。炎症部のNKp44- ILC3は、ILC1とILC3の両者の特徴を有する遺伝子発現を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBD患者は本邦だけでなく世界的にも増加傾向にあるが、病因については未だに不明である。IBD病因と考えられる免疫寛容の破綻およびこれに関与する免疫細胞の解析について、これまではマウスレベルでは試みられてきたが、ヒト腸管から生きた免疫細胞を採取し、詳細に解析された報告はほとんどなかった。本研究では、ヒト腸管組織を使用し、これまで明らかになっていなかったIBDにおけるILC分画の分布およびその特徴を明らかにした。これらの結果によりIBDの病因・病態の解明および新規治療の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study focused on innate lymphoid cells (ILC) and aimed to elucidate the mechanism in IBD pathology. We analyzed what kind of ILCs exist in normal colonic mucosa. Flow cytometry analysis revealed the presence of ILC1 and ILC3, and both had the form of lymphocytes. Next analysis was performed using ulcerative colitis (UC) specimens. There was no difference in ILC distribution between non-inflamed UC and normal colon, but ILC1 increased and ILC3 decreased in the inflamed UC. ILC3 highly expressed RORC and IL23R, and the NKp44+ fraction in ILC3 expressed IL22. NKp44-ILC3 in inflamed UC showed characteristic gene expression of both ILC1 and ILC3.

研究分野：消化器病

キーワード：炎症性腸疾患 自然リンパ球 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

* IBD の現状および病因

潰瘍性大腸炎(UC)、クローン病に代表される IBD の患者数は全世界および我が国においても増加の一途をたどっており、我が国における潰瘍性大腸炎患者数は 17 万人、クローン病患者数は 4 万人を超えている(厚生労働省平成 26 年度報告、難病情報センター特定疾患医療受給者証交付件数)。現時点では根本治療がなく、病因解明および新規治療開発が急務である。

IBD の病因として、遺伝的素因を有する宿主において腸内細菌などの環境因子が作用し、免疫細胞による過剰免疫応答が惹起され腸管炎症が生じると考えられている(Xavier RJ, et al. Nature, 2007)。正常腸管において免疫細胞は細菌やウイルスといった異物を認識し攻撃・排除するが、自己に有益な腸内細菌や食餌には反応せず、免疫寛容の状態を保つことで腸管の恒常性が維持されている。この免疫寛容の破綻機構こそが IBD の病因と考えられる。

* IBD に対する免疫学的研究

これまでの IBD 病因解明への取り組みは T 細胞を主体とする獲得免疫系を中心とした研究であった。自己免疫応答を調整する制御性 T 細胞は、腸管炎症に抑制的に働く細胞として IBD との関連が示唆された(Sakaguchi S, et al. Int Immunol, 2009)。また IL-17 産生ヘルパー T 細胞(Th17)が IBD 病態の増悪因子であることが我々のグループや他グループからも報告されてきた(Kamada N, et al. J Clin Invest, 2008, Ogino T, et al. Gastroenterology, 2013)。一方で自然免疫細胞が獲得免疫系の活性化に深く関わっていることが明らかとなり、IBD の過剰免疫活性における自然免疫細胞の役割に注目が集まっている。

また IBD における大規模なゲノムワイド関連研究(GWAS)が報告され、ヒト MHCII (human leukocyte antigen DR, 以下 HLA-DR) および IL-23R が疾患感受性に関与していることが示された(Jimmy ZL, Nat genetics, 2015)。

* 自然リンパ球と免疫寛容

胸腺において自己抗原反応性 T 細胞の免疫活性は胸腺上皮細胞の MHCII を介した自己抗原提示により負の選択を受けることが明らかとなっていたが、2015 年に ILC3 が胸腺上皮細胞と多くの類似性を持っており、ILC3 は MHCII を介して自己腸内細菌抗原に反応する T 細胞の免疫活性を制御していることが報告された(図 1, Hepworth MR et al. Science, 2015)。

ILC3 は近年同定された自然リンパ球で種々のサイトカインにより活性化され自然免疫を担当している(Spits H, et al. Nat Rev Immunol, 2013)。腸管粘膜固有層に豊富に存在し、IL-23R を高発現しサイトカイン産生を介し腸管上皮バリアの増強や腸管上皮修復に貢献している(Zheng Y, et al. Nat Med, 2008)。ヒトにおいて、IBD 腸管の ILC3 分画に変化が生じることが報告されたが(Cella M, et al. Nature, 2009, Bernink JH, et al. Nat Immunol, 2013)。詳細な関連については未だ不明である。

2. 研究の目的

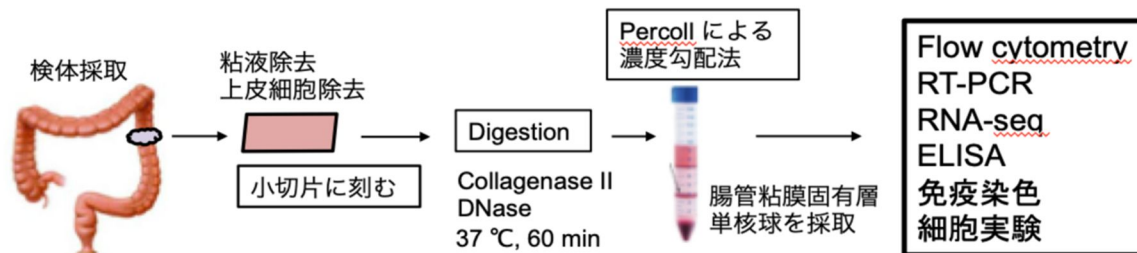
IBD の病因とされる免疫寛容の破綻機構は未だ明らかになっていない。本研究では ILC に着目し、ヒ

ト腸管においてこのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常腸管粘膜に存在する ILC の検討

手術検体より腸管粘膜免疫担当細胞を単離した(図)。各種表面抗原マーカーを利用し flow cytometry を行った。正常大腸粘膜は大腸癌手術症例の非癌部より採取し、ILC について細胞数・割合を比較した。ILC の sorting を行い、RNA-Seq 及び RT-PCR で遺伝子発現を比較した。凍結切片を用いて蛍光免疫染色を行い ILC の局在を確認した。



(2) UC に存在する ILC の検討

UC 手術検体より ILC を単離し、UC 粘膜に存在する ILC について細胞数・割合を比較した。ILC の sorting を行い、RNA-Seq 及び RT-PCR で遺伝子発現を確認した。

(3) 大腸癌に存在する ILC および間質細胞の検討

大腸癌検体より ILC を単離し、大腸癌に存在する ILC について細胞数・割合を比較した。ILC の sorting を行い、RNA-Seq 及び RT-PCR で遺伝子発現を確認した。ILC が発現する遺伝子と相互作用を持つことが判明した間質細胞を採取し解析した。凍結切片を用いて大腸癌の蛍光免疫染色を行い、局在を確認した。

4. 研究成果

ヒト正常大腸粘膜に存在する ILC について解析を行った。大腸癌患者の手術検体を用いて、正常粘膜部の粘膜固有層より細胞を採取し flow cytometry にて ILC 分画を展開した。正常大腸には、ILC1、NKp44⁺/NKp44⁻ ILC3 が存在しており、ILC2 はこれらと比較し非常に少ない分画であった。この中で、NKp44⁺ ILC3 が正常大腸に最も多く存在する ILC 分画であり、リンパ組織誘導に關与する遺伝子 (*LTA*, *LTB*, *TNF*, *NRP1*) を高発現していた。

UC 非炎症部と正常大腸では、ILC 分画の分布に差はなかったが、炎症部では、ILC1 (37.8%) が増加し、NKp44⁺ ILC3 (11.1%) が減少していた。UC 非炎症部および正常大腸に存在する NKp44^{-/+} ILC3 はいずれも *RORC* や *IL23R* を高発現し、正常大腸 NKp44⁺ ILC3 は *IL22* を高く発現していた。ILC1 は、いずれの組織においても *TBX21* や *IFNG* を高発現し、類似した遺伝子発現パターンを示した。UC 炎症部に存在する NKp44⁻ ILC3 は、ILC1 と ILC3 の両者の特徴を有する遺伝子発現パターンを示した。

次に、大腸癌組織より細胞を採取して ILC 分画を解析した結果、癌部にも正常粘膜と同様の 3 分画 (ILC1、NKp44⁺/NKp44⁻ ILC3) が存在していた。これらの分画の分布は、腫瘍深達度の進行に伴い変化し、NKp44⁺ ILC3 は T1/T2 腫瘍においては豊富に存在するが、T3/T4 腫瘍では減少していることが分

かった。正常部および T1/T2 腫瘍、T3/T4 腫瘍に存在する NKp44⁺ ILC3 の機能に変化がないか検討したところ、T3/T4 腫瘍に浸潤する NKp44⁺ ILC3 では、*RORC*, *IL22*, *IL17A* といった ILC3 の主要転写因子や一部のサイトカイン発現に変化は見られないものの、*LTA*, *LTB*, *TNF* といったリンパ組織誘導に關与する遺伝子の発現が低下していた。

LTA や *LTB* にコードされる lymphotoxin は、間質細胞に作用して接着分子やケモカインの発現を亢進させることで、異所性リンパ組織を誘導することが知られているため、大腸癌組織中の間質細胞を採取し解析した。T4 腫瘍の間質細胞では、T2 腫瘍の間質細胞と比較し、接着分子 (ICAM-1, VCAM-1) およびケモカイン (*CXCL13*, *CCL21*) の発現も低下していた。正常大腸の NKp44⁺ ILC3 と T4 腫瘍の間質細胞を共培養すると、間質細胞における *ICAM-1*, *CXCL13*, *CCL21* の発現亢進が見られ、以上より、NKp44⁺ ILC3 が間質細胞への作用を介してリンパ組織誘導に關与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mori R, Ogino T, Sekido Y, Hata T, Takahashi H, Miyoshi N, Uemura M, Doki Y, Eguchi H, Mizushima T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Long Distance Between the Superior Mesenteric Artery Root and Bottom of the External Anal Sphincter Is a Risk Factor for Stoma Outlet Obstruction After Total Proctocolectomy and Ileal-Pouch Anal Anastomosis for Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 249-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12512	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 Ikeda A, Ogino T, Kayama H, Okuzaki D, Nishimura J, Fujino S, Miyoshi N, Takahashi H, Uemura M, Matsuda C, Yamamoto H, Takeda K, Mizushima T, Mori M, Doki Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Human Nkp44+ Group 3 Innate Lymphoid Cells Associate with Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures in Colorectal Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 724-731
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 有
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 -

1. 著者名 Ogino T, Takeda K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Immunoregulation by antigen-presenting cells in human intestinal lamina propria.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1138971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1138971.	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻野崇之
2. 発表標題 自然免疫細胞に着目した炎症性腸疾患の病態と治療戦略
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------