

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02905

研究課題名（和文）形態学、免疫学的アプローチによる腸管上皮組織修復機構におけるAhrシグナルの理解

研究課題名（英文）Understanding the Ahr signal for the maintainance of intestinal epithelial cells

研究代表者

緒方 晴彦（Ogata, Haruhiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：30177117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性腸疾患は腸管の上皮の破壊が特徴的であり、これまでの研究で、Tregによる免疫制御機構が腸管の上皮保護に重要であることが明らかになってきた。特に分子学的なメカニズムが明らかとなる一方で、Tregの消化管内での局在や動態については長年不明であった。Ahrシグナルが炎症抑制細胞であるTregを介して腸管上皮を再生する機序を明らかとしさらに、炎症性腸疾患に対する内視鏡検査において機械学習を利用することで効率的な内視鏡システムの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかでなかったAhr含有物質が腸管のホメオスタシス維持に重要であるというエビデンスに対して、本研究を通じて炎症性腸疾患モデルを抑制することで、その詳細なメカニズムを明らかとした。さらに1細胞の腸管内における局在解析を確立した。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease is characterized by destruction of the intestinal epithelium, and previous studies have revealed that immune regulatory mechanisms mediated by Tregs are important for intestinal epithelial protection. While the molecular mechanisms have been elucidated, the localization and dynamics of Tregs in the gastrointestinal tract have remained unclear for many years, and the mechanism by which Ahr signaling regenerates the intestinal epithelium via Tregs, which are inflammatory suppressor cells, has been elucidated. We have also developed an efficient endoscopic system by using machine learning in endoscopic examinations for inflammatory bowel disease.

研究分野：内視鏡学

キーワード：潰瘍性大腸炎

1. 研究開始当初の背景

消化管は栄養素の代謝・吸収を行う臓器であるとともに、病原細菌など外来抗原の侵襲に対する防御免疫誘導の場であり、感染防御の第一線を担っている。一方で、腸内細菌叢や食物抗原などの常在抗原に対する過剰な免疫反応は、炎症性腸疾患や食物アレルギーなどの自己免疫様疾患を引き起こす。その為、正常腸管では免疫応答を負に制御する細胞集団が存在しており、常在抗原に対する寛容を誘導している。制御性T細胞(regulatory T cells; Tregs)は消化管における免疫制御の中心を担う細胞として知られており、その欠損や機能不全は炎症性腸疾患などの発症につながる。これまでの研究で、Tregによる免疫制御機構やTregの分化・機能維持に重要な分子の同定などは次第に明らかになってきた。一方で、Tregの消化管内での局在や動態については長年不明であった。申請者は2光子顕微鏡を使用することで、腸管粘膜内でTregの局在、動態を解析し、世界に先駆けて報告した^{1,2}。近年、単一細胞レベルでの免疫細胞の機能解析技術の飛躍的な進歩により、消化管内での多様な細胞の機能的相互作用が解析可能になり、これまで報告されていなかった免疫細胞集団の同定や細胞同士のネットワークが可視化される様になった。本研究では、消化管局所におけるTregの機能・局在を単一細胞レベルで解析することを目的とする。さらに炎症性腸疾患に対して使用される青黛の大腸炎症抑制メカニズムを解明する。また、炎症性腸疾患に対する内視鏡検査において機械学習を利用することで効率的な内視鏡システムの開発を行う。

2. 研究の目的

消化管ではTregは表面抗原の発現パターンから、胸腺由来のHelios⁺GATA3⁺Treg、および消化管局所で誘導されるHelios⁻RORγt⁺Treg、Helios⁻RORγt⁻double negative (DN) Tregの3種類のサブセットに分類できる。近年の研究で、RORγt⁺Tregは腸内細菌依存的に、DN Tregは食物抗原依存的に分化誘導されることが明らかになった(Kim Y, et al. *Science* 2017)。興味深いことに、消化管におけるこれらのTregサブセットの分布割合は部位により大きく異なる。Helios⁺、RORγt⁺、DN Tregの細胞集団が、小腸では30-30-40%と分布するのに対し、大腸では30-50-20%となっている。これは腸管の部位に存在する常在抗原の量と比例しており、これらのTregサブセットはそれぞれ特定の抗原に対する免疫反応を抑制していることで、効率よく部位特異的な免疫寛容を誘導していると考えられる。本研究では、マウスモデルおよび腸管ヒト炎症性腸疾患由来腸管粘膜を用い、2光子顕微鏡と単一細胞機能解析を用いた革新的方法により、各Tregサブセットの単一細胞レベルでの細胞動態および機能解析を4次元的に行う。特に炎症性腸疾患に対して使用される青黛を使用し抑制メカニズムを解明する。さらに炎症性腸疾患に対する内視鏡検査において機械学習を利用することで効率的な内視鏡システムの開発を行う。

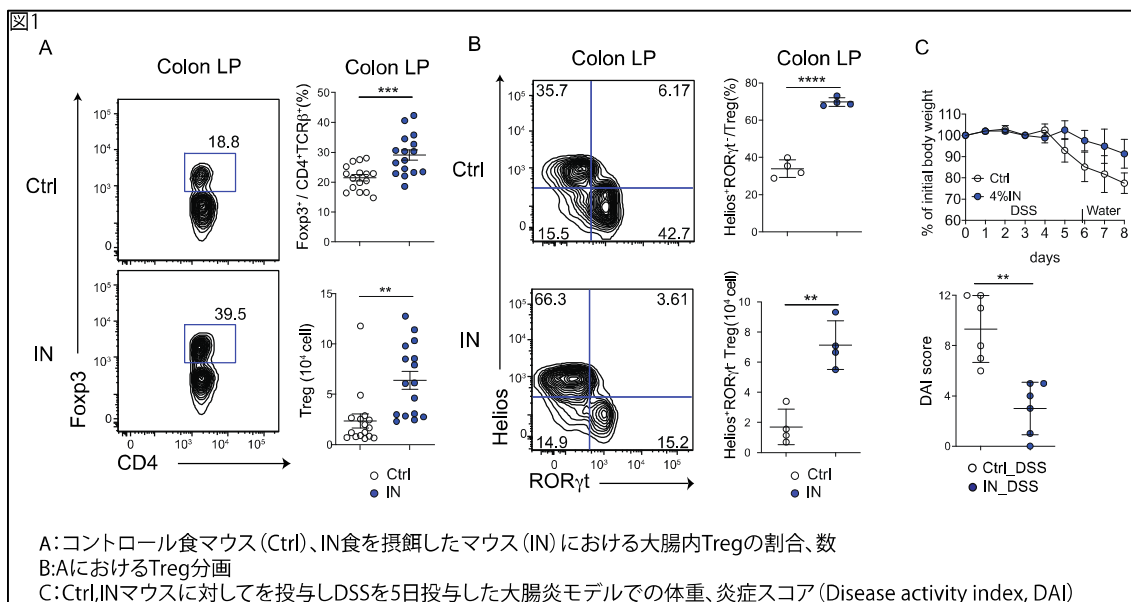
3. 研究の方法

炎症性大腸炎患者においてTregの局在を解析した。また通常食摂餌(control diet)、青黛含有食事(Indigo naturalis diet; IN)をFoxp3^{creERT2}:Rosa26^{LSI-tdTomato}(iFoxp3^{Tomato})マウスを作成し2光子顕微鏡を使用して生体イメージングを行った。

4. 研究成果

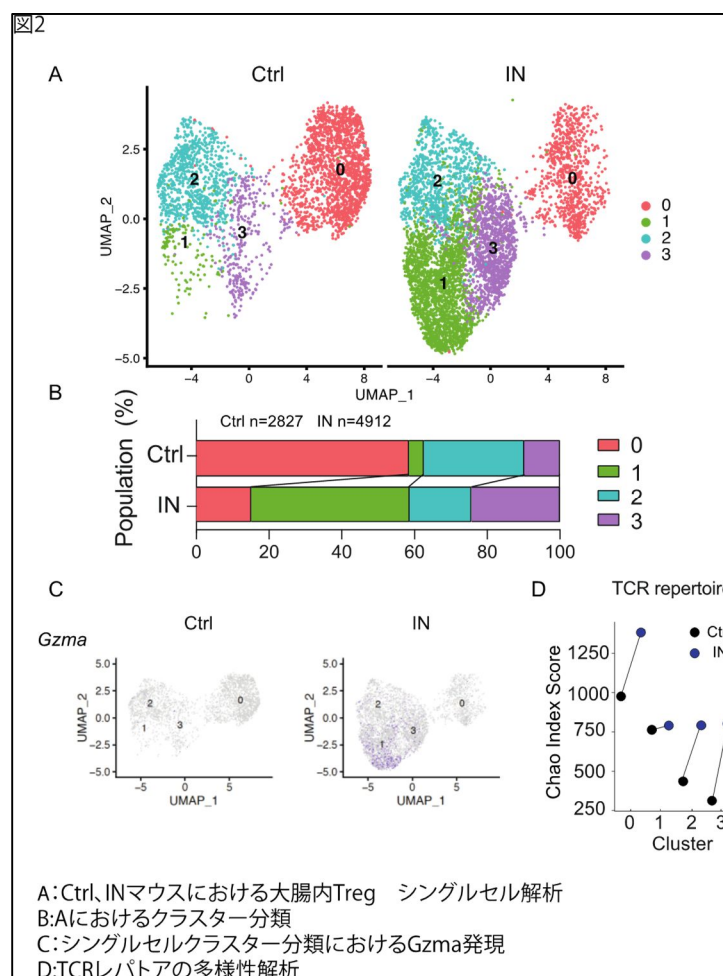
(1) IN投与における大腸内でのTregの解析

IN を 3 週間摂餌させたマウスにおける大腸内の免疫プロファイルを検証した。大腸粘膜固有層内における Treg は IN マウスにおいて増加していた (IN-Treg と命名)。とくに Treg の中でも Helios が陽性である Treg が増加しており、胸腺誘導型の Treg と考えられた (図 1A、B)。さらに DSS 大腸炎モデルを作成すると、IN マウスにおいて体重減少は軽微で、炎症が軽減されることが判明した (図 1C)。



(2) IN-Treg の特徴解析と TCR レパトア解析

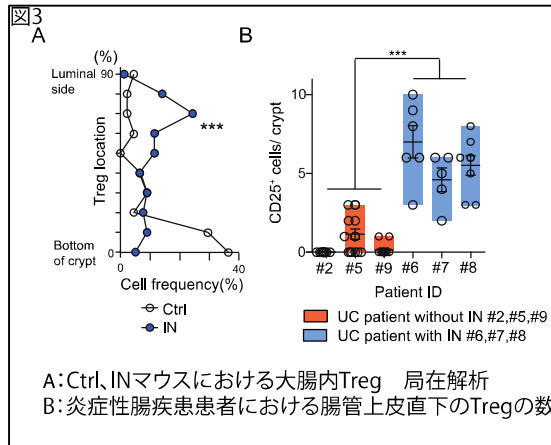
IN-Treg の特徴解析を行う目的でシングルセル RNA-seq を行なった。IN-Treg では4-1で記載したように Rorγt 陰性、Helios 陽性の Treg が増加しており、同 Treg では *Cd103*, *Gzma* が高発現していた。(図 2A-C) さらに TCR レパトアを解析した結果、IN-Treg では特定の TCR が増加しているだけでなく、多様性として増加していることを見出した。本研究からは IN-Treg は特定の抗原によりクローナルに Treg が増加しているわけではなく多様な TCR を有していることが明らかとなった。腸内細菌の関与が疑われたため、無菌 IN を投与し検討した。無菌 IN では Treg の増加がキャンセルされることから、IN-Treg の誘導には菌の存在が重要であること、菌により誘導されると既報で報告のある Rorγt-Treg ではなくユニークな Helios-Treg であることが見出された。



腸内細菌の関与が疑われたため、無菌 IN を投与し検討した。無菌 IN では Treg の増加がキャンセルされることから、IN-Treg の誘導には菌の存在が重要であること、菌により誘導されると既報で報告のある Rorγt-Treg ではなくユニークな Helios-Treg であることが見出された。

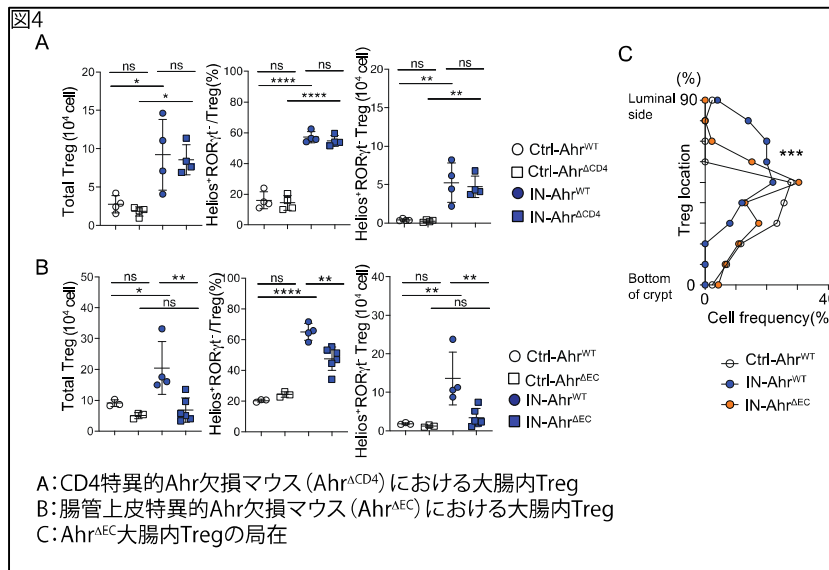
(3) IN-Treg の腸管内での局在について

IN-マウスにおける大腸内 Treg の腸管内局在、3次元構造解析を行った。通常マウス



で大腸 Treg はクリプト近傍、基底層近傍に多く存在することが明らかとなった。一方で IN-マウスにおいて、Treg はクリプト近傍から Villi 頂部に局在を変化させることを発見した (図 3A) さらに炎症性腸疾患患者における大腸生検検体を解析した。通常治療における炎症性腸疾患患者と IN を内服している炎症性腸疾患患者における腸管上皮直下の CD25 陽性 T 細胞は IN 内服患者で有意に増加していることを確認した (図 3B)。この結果より IN は腸管上皮直下に Treg を誘導すると考えられる。

(4) IN-Treg 誘導のメカニズム



IN-Treg が大腸上皮内に誘導されるメカニズムについて検討した。Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) は核内受容体として作用し炎症抑制効果を有することが知られており IN にも含まれている。この Ahr シグナルの関与を検討する目的で、T 細胞特異的に Ahr を欠失したマウス ($Cd4^{creERT2};$

$Ahr^{f/f}$) では Treg ($CD4^+CD25^+$ T cells) の局在変化はキャンセルされず、上皮特異的に Ahr を欠失したマウス ($Villin^{creERT2}; Ahr^{f/f}; Ahr^{\Delta IEC}$) では Treg の局在をキャンセルされた。以上の結果より大腸上皮からの Ahr シグナルが腸管内の Treg の局在変化を規定していることが明らかになった (図 4 A-C)。

(5) 炎症性腸疾患における機械学習を利用した内視鏡写真の解析及び実践

炎症性腸疾患の内視鏡画像を利用し、炎症の程度の評価はエキスパート以外には難しい³⁻⁶。そこで内視鏡画像を機械学習させることで炎症の程度を客観的に評価できるモデルを開発した。IBD 専門内視鏡医が作成した 13,826 組の内視鏡画像の UC 重症度比較情報を用いて、ランキング-畳み込みニューラルネットワーク (ranking-CNN) を学習した。学習した ranking-CNN を用いて、UC Endoscopic Gradation Scale (UCEGS) を用いて重症度を表現した。AI が診断した UCEGS と Mayo Endoscopic Subscore を用いた重症度評価に矛盾がないことを確認するために相関係数を算出し、4 名の IBD 専門内視鏡医と AI が UCEGS を用いて評価したテスト画像の平均値の相関係数を算出した。AI が診断した UCEGS と Mayo Endoscopic Subscore の Spearman の相関係数は約 0.89, IBD 専門内視鏡医と AI による評価結果の相関係数はいずれも 0.95 以上であり有用な機械学習システムの開発に成功した⁷。

結論

本研究を通じて、IN は腸管上皮の Ahr シグナルを介して大腸内の Helios-Treg を増加させ、その局在を変化させることで炎症を抑制することが明らかとなった^{8,9}。さらに炎症を評価する機械学習モデルを作成することに成功した。

1. Sujino T, London M, Hoytema van Konijnenburg DP, et al. Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4(+) T cells controls gut inflammation. *Science* 2016;352:1581-6.
2. London M, Bilate AM, Castro TBR, et al. Stepwise chromatin and transcriptional acquisition of an intraepithelial lymphocyte program. *Nat Immunol* 2021;22:449-459.
3. Matsuura M, Matsumoto T, Naito Y, et al. Advanced endoscopy for the management of inflammatory digestive diseases: Review of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society core session. *Dig Endosc* 2022;34:729-735.
4. Kim ES, Tae CH, Jung SA, et al. Perspectives of East Asian patients and physicians on complementary and alternative medicine use for inflammatory bowel disease: results of a cross-sectional, multinational study. *Intest Res* 2022;20:192-202.
5. Limpas Kamiya KJL, Hosoe N, Hayashi Y, et al. Video capsule endoscopy in inflammatory bowel disease. *DEN Open* 2022;2:e26.
6. Aoki Y, Kiyohara H, Mikami Y, et al. Risk of venous thromboembolism with a central venous catheter in hospitalized Japanese patients with inflammatory bowel disease: a propensity score-matched cohort study. *Intest Res* 2023;21:318-327.
7. Takabayashi K, Kobayashi T, Matsuoka K, et al. Artificial intelligence quantifying endoscopic severity of ulcerative colitis in gradation scale. *Dig Endosc* 2023.
8. Yoshimatsu Y, Sujino T, Kanai T. Reviewing not Homer's Iliad, but "Kai Bao Ben Cao": indigo dye-the past, present, and future. *Intest Res* 2022.
9. Yoshimatsu Y, Sujino T, Miyamoto K, et al. Aryl hydrocarbon receptor signals in epithelial cells govern the recruitment and location of Helios(+) Tregs in the gut. *Cell Rep* 2022;39:110773.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Tanemoto Shun, Sujino Tomohisa, Miyamoto Kentaro, Moody Jonathan, Yoshimatsu Yusuke, Ando Yoshinari, Koya Ikuko, Ogata Haruhiko, Hon Chung-Chau, Shin Jay W., Kanai Takanori | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Single-cell transcriptomics of human gut T cells identifies cytotoxic CD4+CD8A+ T cells related to mouse CD4 cytotoxic T cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 1-10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.977117 | 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 Yoshimatsu Yusuke, Sujino Tomohisa, Ogata Haruhiko, Kanai Takanori | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Aryl hydrocarbon receptor signals in epithelial cells govern the recruitment and location of Helios+ Tregs in the gut | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 110773 ~ 110773 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110773 | 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 Harada Yosuke, Sujino Tomohisa, Miyamoto Kentaro, Nomura Ena, Yoshimatsu Yusuke, Tanemoto Shun, Umeda Satoko, Ono Keiko, Mikami Yohei, Nakamoto Nobuhiro, Takabayashi Kaoru, Hosoe Naoki, Ogata Haruhiko, Ikenoue Tuneo, Hirao Atsushi, Kubota Yoshiaki, Kanai Takanori | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Intracellular metabolic adaptation of intraepithelial CD4+CD8 + T lymphocytes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 104021 ~ 104021 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104021 | 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 Limpas Kamiya Kenji J. L., Hosoe Naoki, Takabayashi Kaoru, Okuzawa Anna, Sakurai Hinako, Hayashi Yukie, Miyanaga Ryoichi, Sujino Tomohisa, Ogata Haruhiko, Kanai Takanori | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Feasibility and Safety of Endoscopic Ischemic Polypectomy and Clinical Outcomes in Patients with Peutz Jeghers Syndrome (with Video) | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-022-07477-w | 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 Limpas Kamiya Kenji J.L., Hosoe Naoki, Hayashi Yukie, Kawaguchi Takaaki, Takabayashi Kaoru, Ogata Haruhiko, Kanai Takanori | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Video capsule endoscopy in inflammatory bowel disease | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 DEN Open | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/deo2.26 | 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 Ariake Chizuru, Hosoe Naoki, Sakurai Hinako, Tojo Anna, Hayashi Yukie, JL Limpas Kamiya Kenji, Sujino Tomohisa, Takabayashi Kaoru, Kosaki Kenjiro, Seki Satowa, Hisamatsu Tadakazu, Ogata Haruhiko, Kanai Takanori | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 A Case of Chronic Enteropathy Associated with SLC02A1 with Positive Immunohistochemistry for SLC02A1 Protein | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Internal Medicine | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8939-21 | 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 Matsuura Minoru, Matsumoto Takayuki, Naito Yuji, Saitoh Yusuke, Kanai Takanori, Suzuki Yasuo, Tanaka Shinji, Ogata Haruhiko, Hisamatsu Tadakazu | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Advanced endoscopy for the management of inflammatory digestive diseases: Review of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society core session | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Digestive Endoscopy | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.14234 | 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 Naganuma Makoto, Watanabe Kenji, Motoya Satoshi, Ogata Haruhiko, Matsui Toshiyuki, Suzuki Yasuo, Ursos Lyann, Sakamoto Shigeru, Shikamura Mitsuhiro, Horii Tetsuharu, Fernandez Jovelle, Watanabe Mamoru, Hibi Toshifumi, Kanai Takanori | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Potential benefits of immunomodulator use with vedolizumab for maintenance of remission in ulcerative colitis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology | 6. 最初と最後の頁 81 ~ 88 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15667 | 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 Takabayashi Kaoru, Kato Motohiko, Sasaki Motoki, Iwao Yasushi, Ogata Haruhiko, Kanai Takanori, Yahagi Naohisa | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 Underwater endoscopic mucosal resection for a sporadic adenoma located at severe longitudinal ulcer scars in ulcerative colitis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Endoscopy | 6. 最初と最後の頁 E30 ~ E31 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1368-3796 | 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0件

〔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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 筋野 智久 (Sujino Tomohisa) (40464862) | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612) | |
| 研究分担者 | 細江 直樹 (Hosoe Naoki) (90317131) | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612) | |

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 |
|---------|---------|