

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07084

研究課題名（和文）炎症抑制能を有する腸管上皮間リンパ球の分化誘導機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of differentiation of intraepithelial lymphocytes with anti-inflammatory properties.

研究代表者

大野 恵子 (KEIKO, Ono)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：50645611

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）：腸管バリアの最前線である腸管上皮には腸管上皮間リンパ球（Intraepithelial lymphocyte；IEL）が存在し、特にCD4とCD8 を共発現したIELは炎症抑制能を有する細胞集団であることが近年明らかとなっている。潰瘍性大腸炎やクローン病など腸管に慢性炎症を来す炎症性腸疾患では炎症抑制性IELが減少しており、炎症性腸疾患の病態解明および新規治療開発の検討のため、炎症抑制性IELの分化誘導機構の検討を行った。

今回の研究では、炎症抑制性IELが腸管上皮間のみでしか存在しないことに着目し、IELの動態の観点、特にCCR9に着目して分化機序の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患は遺伝的要因、環境因子、免疫学的要因、腸内細菌が関与する多因子疾患であることがわかっているが、根本的な治療法がなく、発症原因の解明と新規治療法開発が急務である。現在存在する治療薬はCD4T細胞活性を抑制する免疫調節薬が主体であり、IELに着目した治療法は存在しない。炎症抑制性IELの分化機構を明らかにすることで、これまでの既存の治療法とは異なるアプローチの創薬開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Intestinal intraepithelial lymphocytes (IELs) reside in the gut epithelial layer, where they help in maintaining intestinal homeostasis. CD4+CD8<sup>+</sup> IELs, a subset of IELs that express CD4 and CD8, exhibit regulatory properties against intestinal inflammation. Their reduced abundance in inflammatory bowel diseases, such as ulcerative colitis and Crohn's disease, has been reported.

We investigated the differentiation mechanisms of anti-inflammatory IELs to elucidate the pathology of inflammatory bowel diseases and to consider the development of new treatments. In this study, we focused on the fact that anti-inflammatory IELs exist only between the intestinal epithelium, and analyzed the differentiation mechanism from the perspective of IEL dynamics, focusing on CCR9.

研究分野：腸管免疫

キーワード：腸管上皮間リンパ球 転写因子 炎症性腸疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease, IBD)の病態として遺伝的要因、環境要因、免疫学的要因、腸内細菌が関与する多因子疾患であることがわかっているが、根本的な治療法が確立されておらず、発症原因の解明と新規治療開発が急務である。腸管上皮間には腸管上皮間リンパ球 (Intraepithelial lymphocyte, IEL) が存在し、腸管恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかしながら、IEL の分化メカニズムは十分に研究が進んでいるとは言いがたく、詳細な研究が求められている。近年の研究において、CD4 と CD8 を両方発現した IEL (DP<sub>IEL</sub>) が存在し、炎症に対し抑制性的作用を有していることが明らかになった。さらに、DP<sub>IEL</sub> への分化にはレチノイン酸(RA)や TGF $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、IL-27 などのサイトカインと腸内細菌の存在が必須であり、それらのシグナルにより誘導される Thpok の減弱と T-bet、Runx3 の上昇などの転写因子の発現変化が必要である(Mucida D. *Nature Immunology*. 2013, Reis BR. *Nature Immunology*. 2013, *Immunity* 2015)。しかしながら、DP<sub>IEL</sub> がなぜ腸管上皮間のみでしか観察されないのか、分化機序については未だに不明な点が多い。本検討では、**細胞の動態と遺伝子発現の変化との関連に着目し、DP<sub>IEL</sub> の分化誘導機序について検討を行うこととした。**

### 2. 研究の目的

本研究の目的は炎症抑制性細胞集団 DP<sub>IEL</sub> の分化に関わる因子の解明である。DP<sub>IEL</sub> は IBD において減少することが示されており、IBD の病態に関与している可能性がある。現在存在する IBD 治療薬は CD4T 細胞活性を抑制する免疫調節薬が主体であり、IEL に着目した治療法は存在しない。**DP<sub>IEL</sub> の分化機構を明らかにすることで、炎症抑制性 DP<sub>IEL</sub> が誘導可能となり、これまでの既存の治療法とは異なるアプローチの創薬開発を目指すことを目的とする。**

### 3. 研究の方法

#### (1) DP<sub>IEL</sub> におけるケモカインレセプターCCR9 発現の解析

DP<sub>IEL</sub> は CD4 single positive IEL (SP<sub>IEL</sub>) と、粘膜固有層に存在する制御性 T 細胞 (Treg) の一部から分化することが示されている。腸管への CD4<sup>+</sup>T 細胞のホーミングには RA により誘導される CCR9 が必要であり、IEL における CCR9 の発現を DP<sub>IEL</sub>、SP<sub>IEL</sub>、Treg で比較検討を行った。また、DP<sub>IEL</sub> 分化に関わる転写因子として Runx3、T-bet、ThPOK (DP<sub>IEL</sub> 関連遺伝子) が存在し、これら転写因子の発現と CCR9 発現との関連性を Runx3<sup>tdTomato</sup>-ThPOK<sup>GFP</sup> レポーターマウスを用いて検討した。

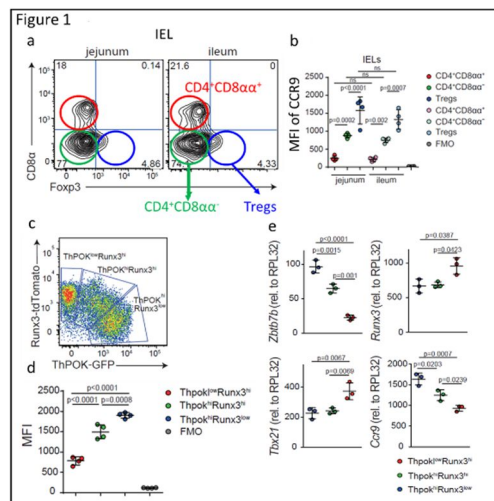
#### (2) CCR9 発現量と DP<sub>IEL</sub> 分化との関連の検討

CCR9 発現量が DP<sub>IEL</sub> 分化に与える影響について解析するため、littermate CCR9 knockout (*Ccr9*<sup>-/-</sup>) マウスを作成し、IEL の解析を行った。また、DP<sub>IEL</sub> の分化には腸内細菌の存在が必須であるため、腸内細菌叢を 16S rRNA で解析した。また、Naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞を anti-CD3/CD28, RA, TGF $\beta$  下で培養することにより CD4 と CD8 を共発現した T 細胞へ分化させることができる。*Ccr9*<sup>+/+</sup> と *Ccr9*<sup>-/-</sup> マウスとで分化に相違があるかを比較検討するため、それぞれのマウスより naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞を分取し、分化実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) DP<sub>IEL</sub> におけるケモカインレセプターCCR9 発現の解析

野生型(WT)マウスにおける CD4<sup>+</sup>IEL は DP<sub>IEL</sub>、SP<sub>IEL</sub>、Treg の 3 分画に分けられることができる (Figure 1a)。WT マウスの DP<sub>IEL</sub>、SP<sub>IEL</sub>、Treg における CCR9 発現を解析すると、DP<sub>IEL</sub> において CCR9 発現が有意に低いことが確認された (Figure 1b)。続いて、DP<sub>IEL</sub> への分化過程における DP<sub>IEL</sub> 関連遺伝子と CCR9 発現との関連性を検討するために、Runx3<sup>tdTomato</sup>-ThPOK<sup>GFP</sup> レポーターマウスを用いて解析を行った。Runx3<sup>tdTomato</sup>-ThPOK<sup>GFP</sup> レポーターマウスの CD4<sup>+</sup>IEL は Thpok<sup>hi</sup>Runx3<sup>low</sup> (less differentiated)、Thpok<sup>hi</sup>Runx3<sup>hi</sup> (transitioning)、Thpok<sup>low</sup>Runx3<sup>hi</sup> (more differentiated) の 3 分画に分けることができ (Figure 1c)、それぞれの分画における CCR9 発現を FACS および qPCR で解析した。その結果、FACS および qPCR 解析いずれにおいても DP<sub>IEL</sub> の分画において CCR9 発現が有意に低いことが確認され (Figure



1d,e) DP<sub>IEL</sub> への分化過程において CCR9 発現が低下することが確認された。

## (2) CCR9 発現量と DP<sub>IEL</sub> 分化との関連の検討

### Ccr9<sup>-/-</sup>マウスにおける DP<sub>IEL</sub> 解析

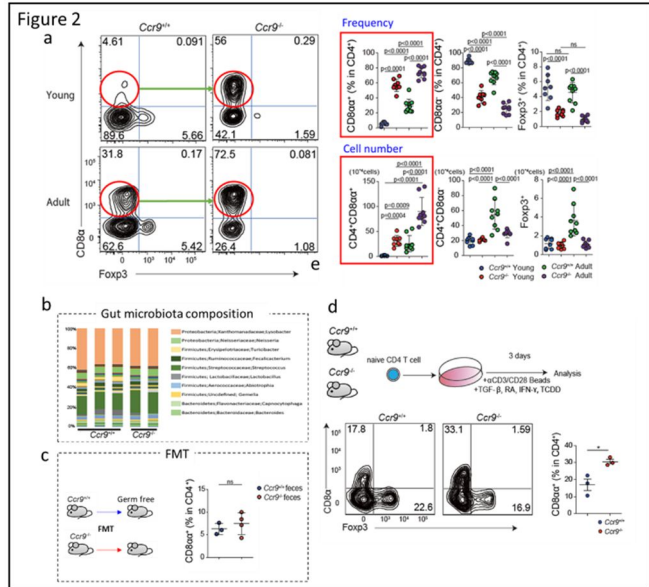
CCR9 発現が DP<sub>IEL</sub> 分化に与える影響について解析するため、*Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスを用いて CD4<sup>+</sup>IEL の解析を行った。結果、*Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスにおいて DP<sub>IEL</sub> は有意に多く分化していることが確認された(Figure 2a)。

### Ccr9<sup>-/-</sup>マウスにおける腸内細菌叢解析

DP<sub>IEL</sub> への分化には腸内細菌の存在が必須であるため、*Ccr9*<sup>+/+</sup>と *Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスとで腸内細菌の比較検討を行った。結果、腸内細菌の構成に相違は無いことが確認された(Figure 2b)。さらに、*Ccr9*<sup>+/+</sup>と *Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスの糞便をそれぞれ無菌マウスへ移植し、DP<sub>IEL</sub> の解析を行ったが、DP<sub>IEL</sub> 分化に相違が無いことが確認され、*Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスにおいて DP<sub>IEL</sub> が多く分化する事象は腸内細菌の相違に依るものではないことが確認された(Figure 2c)。

### in vitro CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell differentiation

Vivo にて *Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスにおいて DP<sub>IEL</sub> が多く分化する事象が確認されたため、*Ccr9*<sup>-/-</sup>マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞がより CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞へ分化していくかを検討するため、*Ccr9*<sup>+/+</sup>と *Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスより naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞を分取し、分化実験を行った。結果、*Ccr9*<sup>-/-</sup>マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞はより CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞へ分化していくことが確認された(Figure 2d)。これらの結果からは、CCR9 陰性の CD4<sup>+</sup>T 細胞はより DP<sub>IEL</sub> へ分化する能力があり、*Ccr9*<sup>+/+</sup>と *Ccr9*<sup>-/-</sup>マウスの IEL を用いてシングルセル解析を行い、分化に関わる遺伝子発現の相違を抽出する方針である。



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 1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, Harada Yosuke, Tojo Anna Okuzawa, Ono Keiko, Hayashi Yukie, Takabayashi Kaoru, Okabayashi Koji, Teratani Toshiaki, Mikami Yohei, Nakamoto Nobuhiro, Hosoe Naoki, 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 977117
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 -

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 Keiko Ono, Tomohisa Sujino, Kentaro Miyamoto, Yosuke Harada, Satoshi Kojo, Yusuke Yoshimatsu, Shun Tanemoto, Yuzo Koda, Jiawen Zheng, Kazutoshi Sayama, Tsuyoshi Koide, Toshiaki Teratani, Yohei Mikami, Kaoru Takabayashi, Nobuhiro Nakamoto, Naoki Hosoe, Mariya London, Haruhiko Ogata, Daniel Mucida, Ichiro Taniuchi, Takanori Kanai	4. 巻 14
2. 論文標題 Downregulation of chemokine receptor 9 facilitates CD4+CD8 + intraepithelial lymphocyte development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 5152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-40950-2	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

〔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)	

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