

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07895

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における免疫細胞の分化可塑性の機序と病態の解明

研究課題名(英文)Unveiling the plasticity of immune cells in inflammatory bowel disease

研究代表者

村上 真理 (Murakami, Mari)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10801293

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)：T細胞の過剰な免疫応答は炎症性腸疾患の主たる誘因であるが、炎症性腸疾患特異的T細胞サブセットは報告されていなかった。本研究では、ヒト腸粘膜の包括的T細胞プロファイリングによって、クローン病患者腸管の炎症局所において特異的に発現するCD4陽性組織常在性記憶T細胞を同定し、さらにそれを誘導する転写因子を見出した。この疾患特異的T細胞は炎症性腸疾患の微小環境下において活性化され、炎症性サイトカインや細胞傷害性顆粒を高く発現する。これにより、周囲の免疫細胞がさらに活性化され炎症を増悪させるとともに、隣接する腸上皮細胞に対する傷害活性が増強され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

クローン病に対する治療選択肢は、生物学的製剤や低分子化合物の導入により拡大し、寛解導入率が飛躍的に改善してきた。したがって、治療抵抗性の患者に対する治療法の開発に加えて寛解状態をいかに維持するかという点がこれからのクローン病の治療戦略において最重要事項の一つである。そのような観点から、長期にわたって粘膜にとどまる病原性組織常在性T細胞はクローン病の慢性炎症の治療に対する格好の標的であると考えられる。本研究による疾患特異的なT細胞とその誘導機構の一端の解明は、新たなクローン病の治療戦略の構築につながると思われる。従来の治療法との併用によりクローン病治療がより充実することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies on inflammatory bowel diseases (IBD) have highlighted the importance of memory T cells in disease progression. Yet, several relevant issues remained unexplored; identification of a disease-specific T-cell subset, and how these cells undergo functional specialization under pathological conditions. By the comprehensive analyses of human gut samples, we identified a CD4+ tissue-resident memory T cell (Trm)-subset showing unique properties that is prevalent in Crohn's disease, as well as the transcription factors involved in its induction. A CD-specific Trm subset displays pleiotropic signatures of innate and effector activities that are activated by cytokines abundant in the gut of IBD patients. These inflammatory features are further enhanced by their spatial proximity to gut epithelial cells. Our results shed light on the functional heterogeneity of Trm and its importance in the pathogenesis of CD, which can be applicable to the development of T cell-directed strategies.

研究分野：免疫学・消化器病学・代謝学

キーワード：炎症性腸疾患 組織常在性記憶T細胞 獲得免疫 単一細胞解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(IBD)の治療法は、生物学的製剤の登場によって飛躍的な発展を遂げてきた。近年ではさらに低分子化合物も加わり、寛解導入療法の選択肢はますます充実、拡大してきている。しかしながら、クローン病(CD)においては腸管の狭窄や瘻孔、潰瘍性大腸炎(UC)では炎症性発癌など長期的予後に関する多くの課題が残されており、長期予後の改善が新たな治療目標となっておりつつある。

T細胞の過剰な免疫応答はIBD発症の主たる誘因であり、Th1/Th2のバランス仮説が古くから提唱されているが、これはIBDの2つの病型であるCDとUCにおけるサイトカインの病態関与を示すものである。しかしながらIBDに対する抗サイトカイン療法については抗TNF- $\alpha$ 抗体や抗IL-12/23抗体以外の成功例が乏しいことから、今後の治療標的の発見に向けては病原性となりうる免疫細胞のサイトカインプロファイルのみにとどまらない詳細なプロファイリングが必要である。T細胞は環境に応じた可塑性を持つが、これまでのところ、IBDの病態に寄与する疾患特異的T細胞サブセットは同定されていなかった。

さらに、IBDの慢性化のメカニズムや再発時の過剰な免疫応答発動の端緒となる因子については明らかではない。組織常在性記憶T細胞(TRM)は、末梢のバリア組織に動員された後、長期間にわたって炎症局所に滞留する細胞である。TRMのリコール能と局所免疫活性化能がIBDの慢性の病態に関与していると考えるのは妥当であるが、IBDとTRMと関わりについてはいくつかの報告があるものの、一定の見解は得られていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、IBDの新たな治療標的を探索するために、IBDの各病型に特異的な病原性のT細胞を同定するとともに、細胞の詳細なプロファイリングを行い、疾患特異的T細胞のマーカーや制御因子を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト腸管検体を用いた解析

CD、UCおよび大腸癌患者の切除腸管検体より、単核球を単離した後、フローサイトメーター(FACS)にてCD3陽性細胞あるいはCD4陽性細胞を単離し、解析に用いた。解析はマスマイトメトリー、単一細胞(sc)RNA-seq解析、CITE-seqおよびscMultiome解析(単一核(sn)RNA-seq + scATAC-seq)を施行した。いずれの解析も大腸癌患者の切除検体の正常粘膜部をコントロールとした。

### (2) in vitroでのCD特異的T細胞の解析

CD腸管より単核球を単離し、FACSにてCD3+ CD4+ CD103+ CCR5+ CD161+ CCR7- CD27-細胞を単離した。CD特異的T細胞を精密に単離するマーカーは同定できていないため、in vitro実験では上記のマーカーで代用した。刺激に対する応答をマスマイトメトリー、FACSにて評価した。また、ヒト腸管よりオルガノイドを作成し、これをCD患者腸管より単離したT細胞と共培養し、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18で刺激を行った後、培養上清中のLDHアッセイにて表現型を調べた。

### (3) 臨床所見との相関の評価

CDの手術切除腸管および生検サンプルを用いてFACSにてCD特異的T細胞の割合を算出し、それぞれ血清CRP値、IOIBDスコアとの関連を評価した。

### (4) ヒト初代T細胞への転写因子発現誘導および抑制実験

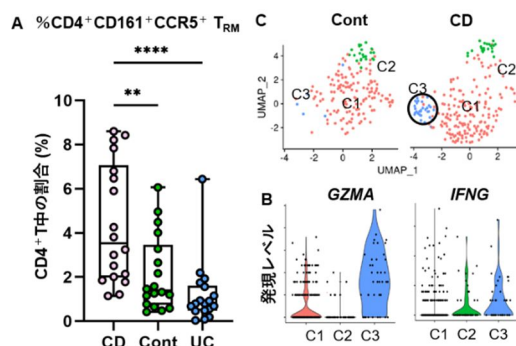
ヒト血液あるいは腸管由来の初代T細胞にレンチウイルスベクターを用いて標的遺伝子をそれぞれ過剰発現あるいはノックダウンし、表現型の解析をRNA-seqおよびフローサイトメトリーにて行った。

## 4. 研究成果

### (1) CD特異的CD4陽性TRMの同定

単一細胞レベルでの蛋白質および遺伝子発現解析より、クローン病患者の腸粘膜では、CD161とCCR5を高発現するCD4陽性の組織常在性記憶T細胞(TRM)がコントロールおよびUC患者と比較し、有意に増加していることを明らかにした(図1A)。

図 1

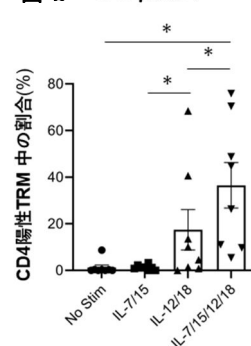


scRNA-seq 解析の結果より、クローン病患者において特異的に発現する CD4 陽性 TRM が存在することが明らかになった。また CD 特異的 TRM は炎症性・組織傷害性の性質を有していた (図 1B,C)。

## (2) CD 特異的 CD4 陽性 TRM の特性評価

CD 特異的 CD4 陽性 TRM は IL-12/18 刺激により外因性の TCR 刺激なしで IFN- $\gamma$  を分泌することが明らかになった。この反応は IL-7/15 の添加により、さらに増幅された (図 2)。これらのサイトカインはいずれも IBD の腸粘膜に豊富に存在することから、IBD 腸管微小環境が疾患特異的 T 細胞を活性化することを示唆するものである。さらに、他の CD4 陽性 T 細胞サブセットとの比較を行ったところ、CD 特異的 CD4 陽性 TRM は他の CD4 陽性 T 細胞と比較して有意に IFN- $\gamma$  を分泌することが明らかになった。

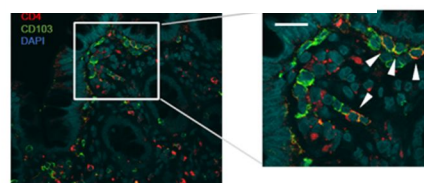
図 2 IFN- $\gamma$  分泌率



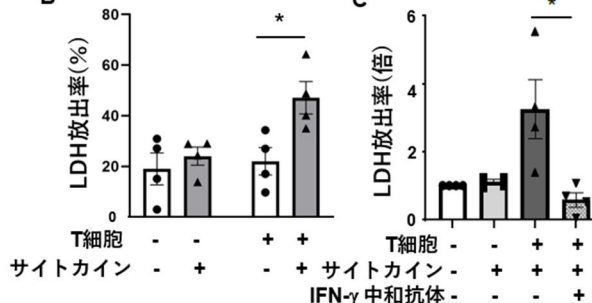
CD 腸管の免疫組織染色より、CD4 陽性 TRM は腸管上皮細胞の近傍に局在することが明らかになった (図 3A 矢印)。ヒト腸管オルガノイドと CD 患腸管由来の CD4 陽性 TRM との共培養実験において、上述のサイトカインカクテル刺激により、培養上清中の LDH の上昇が認められ、腸管オルガノイドが傷害されていることが示された (図 3B)。さらにこの反応は IFN- $\gamma$  の中和抗体によって阻害されたことから (図 3C)、CD 特異的 CD4 陽性 TRM は IFN- $\gamma$  を介し、他の免疫細胞を活性化すのみならず、隣接する腸管上皮を直接傷害する可能性が示唆された。

A

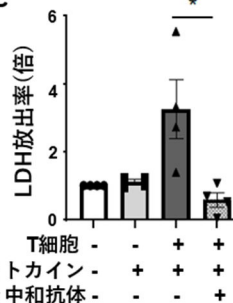
図 3



B



C



## (3) CD 特異的 CD4 陽性 TRM と臨床スコアとの関連の評価

CD 特異的 CD4 陽性 TRM の CD4 陽性細胞中の割合と、臨床スコア (IOIBD スコア) は正の相関を示した。また、CD 特異的 CD4 陽性 TRM の CD4 陽性細胞中の割合を全体の平均値をカットオフ値とし、高い群と低い群に分類したところ、高い群では術前の血清 CRP 値が有意に高いことが明らかになったことから、CD 特異的 CD4 陽性 TRM の腸粘膜内における蓄積は CD の病理学的特徴であることが示唆された。

## (4) CD 特異的 CD4 陽性 TRM の制御する転写因子の探索

scRNA-seq、CITE-seq を組み合わせて上記の CD 特異的 T 細胞を再度検出し、これに scMultiome 解析を組み合わせることにより、クローン病特異的 TRM を制御する転写因子の候補がいくつか絞り込まれた。これらの転写因子の発現をヒト初代 T 細胞に発現させると、IFN- $\gamma$  および組織局在マーカーの発現が有意に誘導された。さらに CRISPR-Cas9 を用いた CD 腸管でのノックダウンの実験によって、IFN- $\gamma$  の分泌が抑制された。

以上の結果から、CD では腸管 T 細胞における特定の転写因子の発現によって CD 特異的 CD4 陽性 T 細胞が誘導されることが明らかになった。この細胞は IBD の腸管微小環境下において新たな抗原刺激なしで強く活性化され IFN- $\gamma$  や細胞傷害性顆粒を分泌する。これにより、周囲の免疫細胞を活性化して炎症を悪化させるとともに、近接する上皮細胞を直接傷害する可能性も示唆された。さらに組織常在性の表現型の誘導は、この細胞が炎症の慢性化に関与することを示唆するものである。したがって、TRM 全般ではなく、特に「CD 特異的 TRM」を軸としたこれらの一連の力スケードを治療標的とすることにより、CD の腸管炎症の慢性炎症を抑制できる可能性がある。

## 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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokoi Takehito, Murakami Mari. et al.	4. 巻 120
2. 論文標題 Identification of a unique subset of tissue-resident memory CD4+ T cells in Crohn's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of 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） 10.1073/pnas.2204269120	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 Nii Takuro, Maeda Yuichi, Motooka Daisuke, Naito Mariko, Matsumoto Yuki, Ogawa Takao, Oguro-Igashira Eri, Kishikawa Toshihiro, Yamashita Makoto, Koizumi Satoshi, Kurakawa Takashi, Okumura Ryu, Kayama Hisako, Murakami Mari, Sakaguchi Taiki, Das Bhabatosh, Nakamura Shota, Okada Yukinori, Kumanogoh Atsushi, Takeda Kiyoshi	4. 巻 82
2. 論文標題 Genomic repertoires linked with pathogenic potency of arthritogenic Prevotella copri isolated from the gut of patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 621 ~ 629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/ard-2022-222881	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 Murakami Mari, Tognini Paola	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular Mechanisms Underlying the Bioactive Properties of a Ketogenic Diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 782 ~ 782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14040782	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 Pareek Siddhika, Sanchenkova Xenia, Sakaguchi Taiki, Murakami Mari, Okumura Ryu, Kayama Hisako, Kawauchi Saya, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Okuzaki Daisuke, Kishimoto Tadimitsu, Takeda Kiyoshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Epithelial miR 215 negatively modulates Th17 dominant inflammation by inhibiting CXCL12 production in the small intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 243 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12922	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13件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mari Murakami, Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Functional heterogeneity of tissue-resident memory T cells and its relevance to the pathogenesis of inflammatory bowel disease.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Eri Igashira, Mari Murakami, Atsushi Kumanogoh, Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 The pyruvate-GPR31 axis promotes transepithelial dendrite formation in human intestinal cDC1.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 村上真理、横井健人、荒瀬充、竹田潔
2. 発表標題 包括的解析によりクローン病で同定された組織局在性T細胞サブセットの病態形成への役割
3. 学会等名 第33回日本サイトメトリー学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上真理、横井健人、竹田潔
2. 発表標題 クローン病で同定された組織常在性記憶T細胞サブセットの病態形成への役割
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 猪頭 英里、村上 真理、熊ノ郷 淳、竹田 潔
2. 発表標題 ヒト腸管ミエロイド細胞における細胞種特異的G蛋白共役型受容体の機能探索
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mari Murakami, Takehito Yokoi, Kyoshi Takeda
2. 発表標題 Deep profiling identifies a unique subset of tissue-resident memory CD4+ T cells involved in the pathogenesis of Crohn ' s disease.
3. 学会等名 GI Research academy 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mari Murakami, Takehito Yokoi, Kyoshi Takeda
2. 発表標題 Deep profiling identifies a unique subset of tissue-resident memory CD4+ T cells involved in the pathogenesis of Crohn ' s disease.
3. 学会等名 Bonn Conference on Mathematical Life Sciences 2023 ( 国際学会 )
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mari Murakami
2. 発表標題 Unveiling the functional heterogeneity of tissue-resident memory T cells in inflammatory bowel disease.
3. 学会等名 Immunosensation2 seminar ( 招待講演 )
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上真理、横井健人、竹田潔
2. 発表標題 包括的解析によりクローン病で同定された組織局在性T細胞サブセットの病態形成への役割
3. 学会等名 第59回日本消化器免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上真理
2. 発表標題 包括的解析によるヒト腸疾患の免疫プロファイリング
3. 学会等名 第1回NGSエキスポ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takehito Yokoi, Mari Murakami, Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Deep profiling identifies a unique tissue resident CD4+ T-cell subset enriched in Crohn's disease.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上真理
2. 発表標題 ヒト腸管免疫担当細胞のシングルセル解析
3. 学会等名 Single-cell 2021 OSAKAセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猪頭英里、村上真理、熊ノ郷淳、竹田潔
2. 発表標題 部位特異的ヒト腸管ミエロイド細胞サブセットの機能および免疫ネットワークの解明
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
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
---------	---------