

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06589

研究課題名(和文)腸上皮と上皮間リンパ球の相互作用に基づく粘膜上皮層免疫システムの成立機構の解析

研究課題名(英文) Study of IEC-IEL interaction in the development of gut epithelial immune system.

研究代表者

高橋 大輔 (TAKAHASHI, DAISUKE)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：40612130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞に選択的に発現する膜タンパク質輸送因子AP-1Bに着目し、膜タンパク質輸送を介した腸上皮細胞による上皮細胞間Tリンパ球(IEL)への影響を解析した。タモキシフェン投与により上皮細胞特異的に後天的にAP-1Bを欠損させるマウスを作成し、IELの数と性状を解析したところ、CD8aa陽性のIEL数が1/10程度まで減少していた。また細胞の生存に関わることで知られるBclファミリー分子の発現が増強は増強していた。さらにAP-1Bを欠損マウスから腸上皮細胞のオルガノイドを作成し、単層培養法を確立した。将来的にIELとの共培養による上皮細胞の性質解析に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ap1m2 is predominantly expressed by intestinal epithelial cells (IECs) and functions in the polarized transport of membrane proteins to the basolateral membrane of IECs. We have found the lack of CD8aa expressing intestinal intraepithelial lymphocytes (IELs) in Villin-creERT2 Ap1m2 flox/flox mice when treated with tamoxifen. CD8aa IELs of the IEC specific Ap1m2-deficient mice showed higher levels of Bcl-2 and Bcl-xL expression compared to control littermate mice. These cells also exhibited higher proliferations. These data suggest that protein localization of basolateral membrane on IEC is indispensable for CD8aa IELs numbers and phenotypes. We have established a monolayer culture method with crypts isolated from Villin-creERT2 Ap1m2 flox/flox mice. This monolayer formed tight junctions, and contains both apical and basolateral membrane domains, which is the important characteristic of polarized epithelial cells.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：上皮細胞 上皮細胞間Tリンパ球

1. 研究開始当初の背景

腸管内には共生微生物が多数存在している。加えて多種の病原性微生物が腸管経路で感染することが知られる。そのため腸管粘膜は生体内でも感染リスクの高い部位の一つである。腸管粘膜の最前線に位置する腸上皮細胞は栄養素の吸収に加え、抗菌活性を持つタンパク質の産生や、ムチン層形成などにより粘膜面のバリア機能にも重要な役割を果たす。腸上皮細胞層には、ユニークな上皮細胞間 T リンパ球 (Intra epithelial T Lymphocytes; IEL) が多数存在し、IEL と腸上皮細胞は互いに協調して恒常性を維持している。IEL の中でも CD8 $\alpha\alpha$ ホモダイマー陽性の IEL は CD160 分子を発現し、腸上皮細胞に発現する Herpesvirus entry mediator (HVEM) 分子を介して抗菌活性を持つタンパク質の産生を誘導することで、粘膜面におけるバリア機能を形成する。

腸上皮細胞からの抗菌タンパク質の産生は、このような IEL との協調に加えて粘膜固有層に存在する自然リンパ球が主に産生するインターロイキン (IL)-22 や IL-17 などのサイトカインの刺激によっても誘導される。腸上皮細胞の細胞膜は腸管腔に面した頂端面と、粘膜固有層に面した側基底面に分かれており、これら二つのドメインには異なる種類の膜タンパク質が局在する。この特性は、輸送因子による膜タンパク質の極性輸送によって形成・維持されている。上皮細胞はその側基底面細胞膜を介して IEL と接している為に、側基底面細胞膜へ輸送される膜タンパク質は、IEL との相互作用に重要であると考えられる。さらに、側基底面細胞膜には IL-22 や IL-17 のレセプター膜タンパク質が局在し、そのシグナルを受容するにはレセプターが側基底面細胞膜へ正常に輸送される必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、腸上皮細胞に選択的に発現し、側基底面細胞膜への膜タンパク質輸送を担うアダプタータンパク質である AP-1B に着目する。腸上皮細胞が AP-1B による膜タンパク質輸送を介して IEL の恒常性を維持する機構を解析し、腸上皮細胞と IEL の協調による粘膜バリア形成機構を解明する。

3. 研究の方法

AP-1B 欠損マウスでは CD8aa 陽性 IEL が著明に減少している。原因として腸上皮細胞層での CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 IEL の分化・増殖、または生存の異常が考えられる。しかし、AP-1B 欠損は生後 8 週までの生存率が 20% であり、解析に用い難い。そこで生後にタモキシフェンを投与することで腸上皮細胞特異的に AP-1B 遺伝子を欠損させることができる villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスを作成する。

villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスにタモキシフェンを投与後、CD8aa 陽性 IEL を詳細に解析し分化・増殖、または生存能について解析する。

次にこのマウスの腸上皮細胞オルガノイドを用いて単層培養法を確立する。側基底面細胞膜を単離し、野生型のものとは比べることで CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 IEL の細胞数維持に重要と考えられる膜タンパク質候補を探索する。AP-1B 欠損腸上皮細胞ではサイトカインの受容体が側基底面細胞膜に正常に輸送されず、粘膜固有層からのサイトカインに正常に応答できず抗菌タンパク質などの発現低下をきたしていると考えられる。また CD8aa 陽性 IEL 減少が、腸上皮細胞抗菌タンパク質の発現低下を引き起こす可能性も考えられる。AP-1B 欠損マウス由来の腸上皮細胞を用いて単層培養を行い、側基底面細胞膜側からサイトカインや CD8aa 陽性 IEL による刺激実験を行い抗菌タンパク質の発現低下の原因を解明する。

4. 研究成果

villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスにタモキシフェンを投与後 1 週間で IEL を単離し、免疫染色法とフローサイトメトリーで解析した。その結果、villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスでは対照となる AP-1B Flox/Flox マウス (同様にタモキシフェン処理 1 週間後) と比較して CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 TCR β 陽性 IEL の細胞数が 1/10 程度まで減少していた。また CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 TCR $\gamma\delta$ 陽性 IELs 数は、1/5 程度に減少していた。しかしながら、CD8 $\alpha\beta$ 陽性 TCR $\alpha\beta$ 陽性、CD4 陽性 TCR $\alpha\beta$ 陽性の IEL 数にはほとんど変化がなかった。このことから、上皮細胞における側基底面細胞膜への膜タンパク質の輸送は CD8 $\alpha\alpha$ 陽性の「unconventional」IEL 細胞の維持や生存に重要であるが、CD8 $\alpha\beta$ 陽性、CD4 陽性の「conventional」IEL の維持や生存には重要でないことが明らかとなった。これらの「unconventional」IEL と「conventional」IEL の分化過程は、前者が胸腺から直接腸上皮細胞層に遊走して来るのに対して、後者はリンパ節で抗原に应答した後に遊走してくる点で、全く異なる。従って、このような分化の過程で獲得する何らかの特徴が、腸上皮細胞において AP-1B 欠損した際の二つの細胞群の影響の違いとして現れることが示唆される。

さらに驚くことに、villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスにタモキシフェンを投与後 1 週間で、CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 IEL の生存に重要な役割を果たす Bcl-2 や Bcl-xL といった抗アポトーシス Bcl ファミリーに分類される分子の発現を解析したところ、その発現が顕著に増加していた。さらに、細胞死に関わるような Bcl ファミリーのタンパク質である Bax や Bim の発現を解析したところ、それらは減少していた。また細胞増殖のマーカー

である Ki-67 の発現も増加していた。これらのことから、villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスでは、Bcl-2 や Bcl-xL を高発現する CD8 α 陽性 IEL 群が選択的に生存し、相対的に Bcl-2 や Bcl-xL の発現が低い細胞群は細胞死した為に CD8 α 陽性 IEL 細胞数が顕著に減少したものと考えられた。また細胞数の著しい減少の結果、その不足を補う為に盛んに増殖している可能性が示唆されたが、現在のところそれらの詳細については未解明である。上述のように、CD8 α 陽性の IEL は、CD160 分子を発現し、腸上皮細胞をその受容体である HVEM を介して刺激する。HVEM によって刺激された腸上皮細胞は Reg3 などの抗菌活性を持つタンパク質を産生する。villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスにタモキシフェンを投与後 1 週間で CD8 α ホモダイマー陽性の IEL を解析したところ CD160 分子の発現が顕著に減少していた。さらに腸上皮細胞の Reg3 の発現を解析すると、その発現が顕著に減少していることを見出した。これらのことから、Ap1m2 の欠損により、CD160 分子を発現する CD8 α 陽性の IEL の細胞数の減少と、それらの CD160 分子の発現の減少が、腸上皮細胞の抗菌活性タンパク質の発現を減少されることが示唆された。

villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスから腸上皮細胞オルガノイドを作成した。この腸上皮細胞オルガノイドをヒドロキシタモキシフェン処理したところ、その細胞増殖や細胞の生存率について、特に異常は観察されなかった。次に、腸上皮細胞オルガノイドをトランスウェル上で単層培養を行う為に、増殖因子や MAPK 阻害剤などの諸条件を詳細に検討した。その結果、villin-creERT2 AP-1B Flox/Flox マウスオルガノイド由来の腸上皮細胞単層培養システムを確立した。この単層培養腸上皮細胞は、タイトジャンクションを形成し、正常な極性上皮細胞の特徴を持つ。この単層培養腸上皮細胞ではその細胞膜が頂端面と、側基底面にコンパートメント化されており、上皮細胞と IEL の相互作用を研究するツールとして非常に有用なものであると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

- 1) Goo-Young Seo, Jr-Wen Shui, Daisuke Takahashi, Christina Song, Zbigniew Mikulski1, Pyeung-Hyeun Kim, Hilde Cheroutre, Marco Colonna, and Mitchell Kronenberg. HVEM expression by innate lymphoid cells protects against

enteric bacterial infection. IMMUNOLOGY 2017 (American association for immunologist, annual meeting) May 14, 2017 Walter E. Washington Convention Center, Washington, D.C. USA

- 2) Daisuke Takahashi, Goo-Young Seo, Jr-Wen Shui, Gisen Kim, Mitch Kronenberg and Koji Hase. Epithelial-lymphocyte crosstalk: Constitutive HVEM Signals Regulate Intraepithelial Lymphocyte Homeostasis. The 44th annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, December 20, 2015, Sapporo Convention Center, Sapporo, Hokkaido, Japan

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 大輔 (DAISUKE TAKAHASHI)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号： 40612130

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

Mitch Kronenberg

La Jolla Institute for Allergy &
Immunology · Division of Developmental
Immunology · President & Chief Scientific
Officer

Goo-young Seo

La Jolla Institute for Allergy &
Immunology · Division of Developmental
Immunology · Postdoctoral fellow