

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03665

研究課題名(和文) 生体イメージングによる免疫細胞4次元動態解析を利用した腸管内微小環境の統合的理解

研究課題名(英文) Single cell analysis in gut by using multi-photon imaging

研究代表者

筋野 智久 (SUJINO, Tomohisa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40464862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：2光子顕微鏡を使用することで、腸管粘膜内で制御性T細胞(Treg)の局在、動態を解析し、世界に先駆けて報告した(Sujino T. Science 2016)。炎症抑制におけるTregの局在、動態、制御機構については不明であった。2光子顕微鏡を用いた生体内における細胞動態解析技術と単一細胞機能解析技術を組み合わせ、腸管上皮における(Aryl-hydrocarbon receptor) Ahrシグナルが腸管内におけるTregの局在を変化させることで炎症抑制に寄与していることを報告した(Yoshimatsu Y, Sujino T. Cell Rep. 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで炎症性腸疾患の治療薬は炎症惹起細胞の抑制がターゲットであった。近年Ahrリガンドを有する青黛という生薬が副作用の問題が存在するものの炎症性腸疾患に有用であると報告されている。しかしその機序は明らかでなかった。我々の報告で、Ahrリガンドが腸管上皮のAhrシグナルを介することで、腸管内における炎症抑制細胞の位置を変化させることが判明し、その結果炎症を抑制することを見出した。本研究は、Tregに作用することで腸管炎症抑制効果を発揮することのメカニズムを証明し、さらに、その機序が腸管内での局在をかえるというユニークな機序を介していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using two-photon microscopy, we analyzed the localization and dynamics of regulatory T cells (Treg) in the intestinal mucosa (Sujino T. Science 2016). The localization, dynamics, and regulatory mechanism of Tregs in the suppression of inflammation have been unknown; by combining in vivo cell dynamics analysis technology using two-photon microscopy and single-cell functional analysis technology, we have demonstrated that (Aryl-hydrocarbon receptor) Ahr signaling in the intestinal epithelium alters the localization of Tregs within the intestinal tract. We reported that Ahr signaling in intestinal epithelium contributes to the suppression of inflammation by altering the localization of Tregs in the intestinal tract (Yoshimatsu Y, Sujino T. Cell Rep. 2022).

研究分野：内視鏡学

キーワード：炎症性腸疾患 制御性T細胞 腸管免疫

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し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。

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。

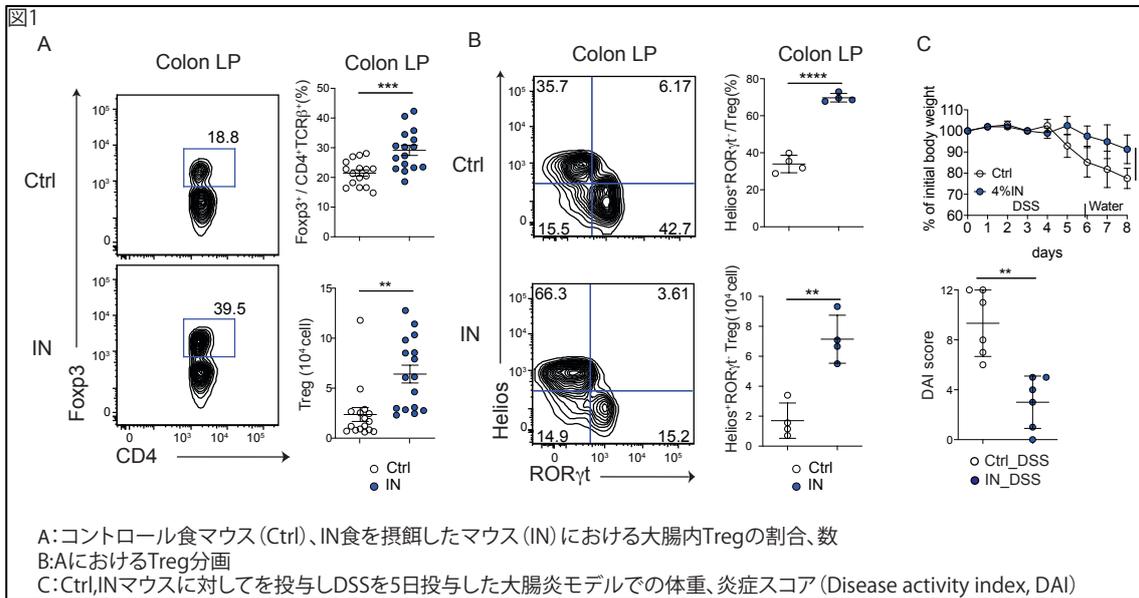
3. 研究の方法

通常食摂餌(control diet)、青黛含有食事(Indigo naturalis diet; IN)を*Foxp3^{creERT2}:Rosa26^{ls1-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。さらに免疫学的な細胞プロファイルを比較し、化学性大腸炎モデルであるDextran Sulfate Sodium(DSS)腸炎モデルを作成した。

4. 研究成果

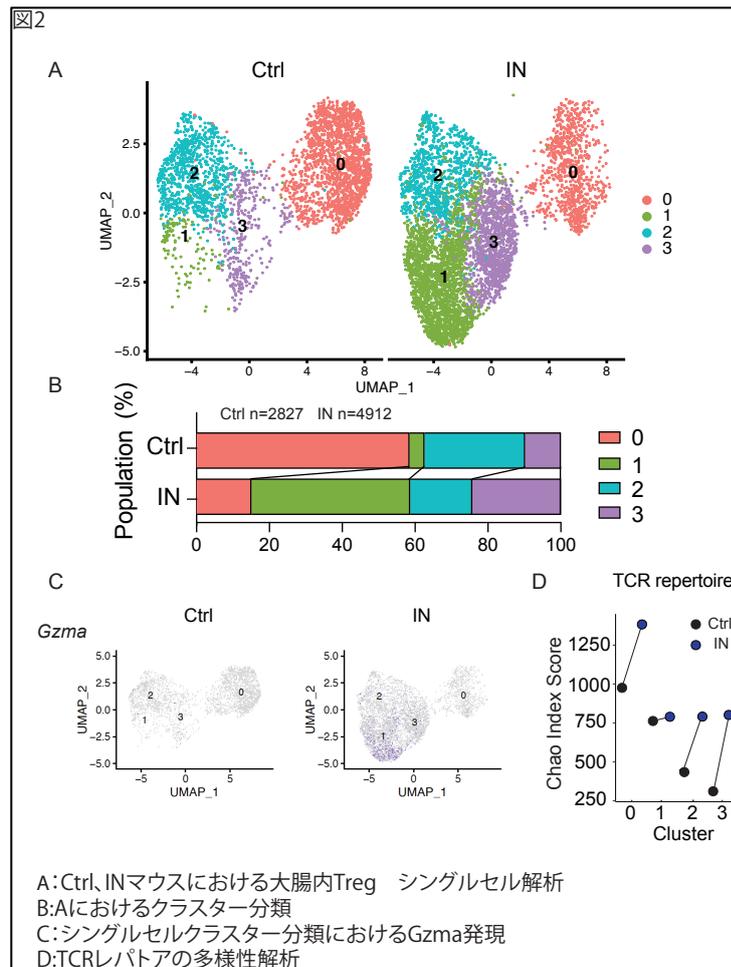
(1) IN投与における大腸内でのTregの解析

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 1 A, 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 1 C)。



(2) IN-Treg の特徴解析と TCR レパトア解析

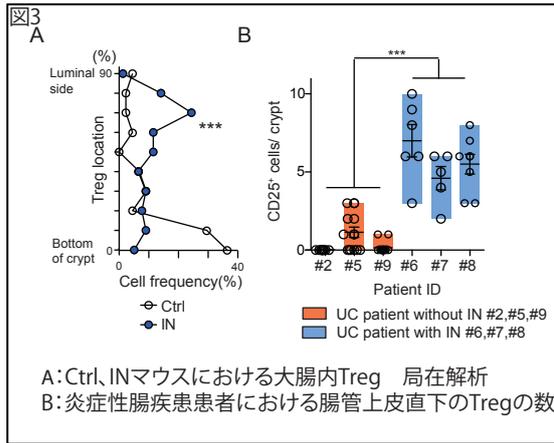
IN-Treg の特徴解析を行う目的でシングルセル RNA-seq を行なった。IN-Treg では 4-1 で記載したように Rorγt 陰性、Helios 陽性の Treg が増加しており、同 Treg では *Cd103*、*Gzma* が高発現していた。(図 2 A-C) さらに TCR レパトアを解析した結果、IN-Treg では特定の TCR が増加しているわけではなく、多様性として増加していることを見出した。本研究からは IN-Treg は特定の抗原によりクローナルに Treg が増加しているわけではなく多様な TCR を有していることが明らかとなった。腸内細菌の関与が疑われたため、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



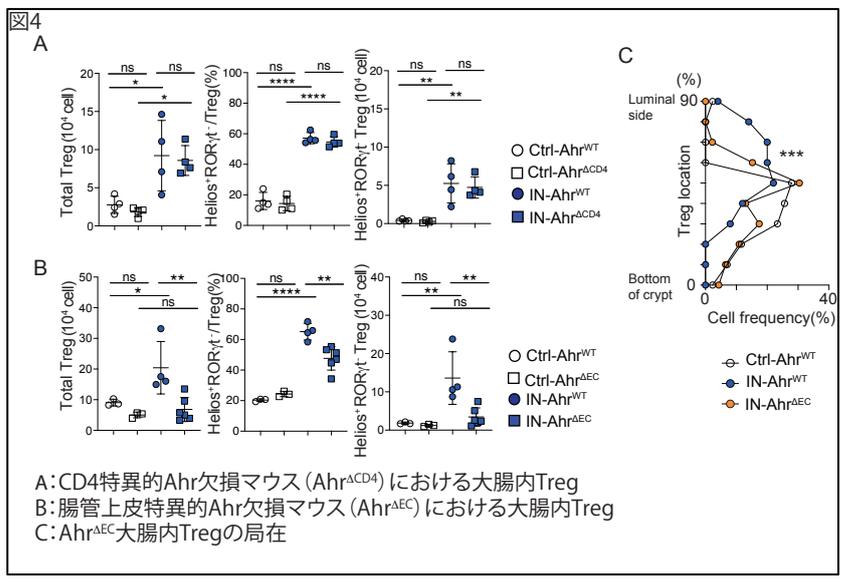
されることから、IN-Treg の誘導には菌の存在が重要であること、菌により誘導されると既報で報告のある Rorγt-Treg ではなくユニークな Helios-Treg であることが見出された。

(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。

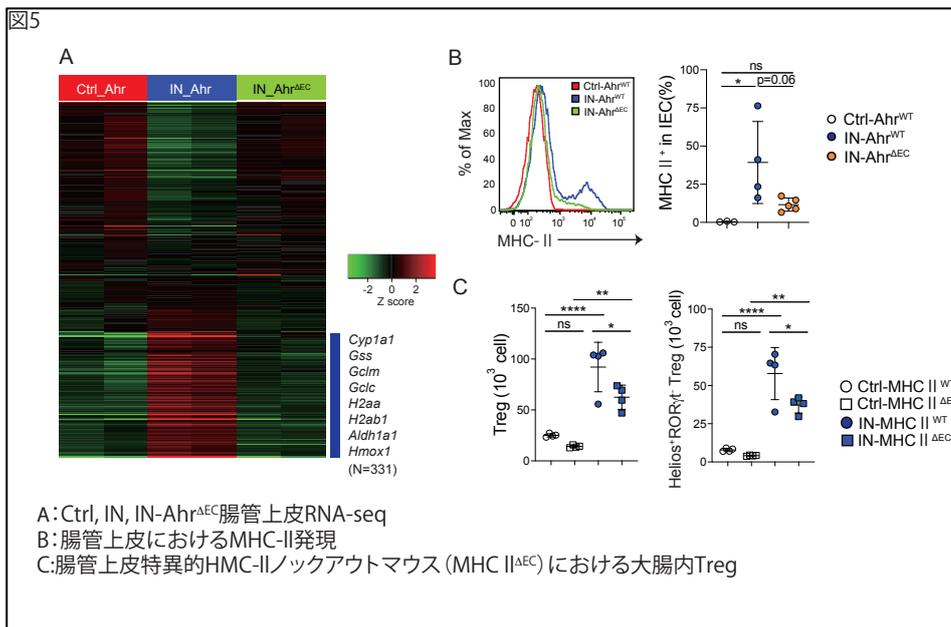


(4) IN-Treg 誘導のメカニズム



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^{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

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^{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



A: Ctrl, IN, IN-Ahr^{ΔEC}腸管上皮RNA-seq
 B: 腸管上皮におけるMHC-II発現
 C: 腸管上皮特異的MHC-IIノックアウトマウス (MHC II^{ΔEC}) における大腸内Treg

ていることが明らかになった(図 4 A-C)。

次に上皮のシグナルを検討する目的で、コントロール、IN マウス、IN-Ahr^{IEC} マウスの上皮細胞をソーティングし RNA-seq を行った(図 5 A)。その結果、MHC class-II (MHC-II) が候補としてあげられた(図 5 B)。実際に *Villin^{creERT2}:H2ab1^{f/f}*(MHC II^{IEC})マウスを作成し、IN を投与すると Treg の誘導が減弱することから、上皮 Ahr シグナルの下流に MHC-II が関わっていることが明らかになった(図 5 C)。

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^{3, 4}。

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. 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.
4. 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23件（うち査読付論文 22件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Aoki Yasuhiro, Sujino Tomohisa, Kawaguchi Takaaki, Sugimoto Shinya, Shimada Fumie, Yoshimatsu Yusuke, Kiyohara Hiroki, Nanki Kosaku, Mikami Yohei, Takabayashi Kaoru, Hosoe Naoki, Ogata Haruhiko, Iwao Yasushi, Kanai Takanori	4. 巻 4
2. 論文標題 Effectiveness and Durability of Ustekinumab Therapy With or Without Immunomodulators for Ulcerative Colitis Patients in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Crohn's & Colitis 360	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) 10.1093/crocol/otac010	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 Tanemoto Shun, Sujino Tomohisa, Kentaro Miyamoto, Moody Jonathan, ..., 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 Harada Yosuke, Miyamoto Kentaro, Sujino Tomohisa	4. 巻 3
2. 論文標題 Protocol to isolate and enrich mouse splenic naive CD4+ T?cells for in?vitro CD4+CD8 + cell induction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101728 ~ 101728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101728	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 Yoshimatsu Yusuke, Sujino Tomohisa, Miyamoto Kentaro, Harada Yosuke, ..., Yoshimura Akihiko, 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 -

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 Sugimoto Shinya, Iwao Yasushi, Shimoda Masayuki, Takabayashi Kaoru, Sato Toshiro, Kanai Takanori, Sujino Tomohisa, Hosoe Naoki, Ogata Haruhiko, Yahagi Naohisa	4. 巻 162
2. 論文標題 Epithelium Replacement Contributes to Field Expansion of Squamous Epithelium and Ulcerative Colitis Associated Neoplasia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 334 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.09.051	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 Nomura Ena, Sujino Tomohisa, Hosoe Naoki, Yoshimatsu Yusuke, Tanemoto Shun, Takabayashi Kaoru, Mutaguchi Makoto, Shimoda Masayuki, Naganuma Makoto, Ogata Haruhiko, Kanai Takanori	4. 巻 66
2. 論文標題 Characteristics of the Mucosal Surface on Scanning Electron Microscopy in Patients with Remitting Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 3141 ~ 3148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-020-06609-4	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 London Mariya, Bilate Angelina M., Castro Tiago B. R., Sujino Tomohisa, Mucida Daniel	4. 巻 22
2. 論文標題 Stepwise chromatin and transcriptional acquisition of an intraepithelial lymphocyte program	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 449 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00883-8	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 Suzuki Masataka, Sujino Tomohisa, Chiba Sayako, Harada Yoichi, Goto Motohito, Takahashi Riichi, Mita Masashi, Hamase Kenji, Kanai Takanori, Ito Mamoru, Waldor Matthew Kaden, Yasui Masato, Sasabe Jumpei	4. 巻 7
2. 論文標題 Host-microbe cross-talk governs amino acid chirality to regulate survival and differentiation of B cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.abd6480	査読の有無 無
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 Aoki Yasuhiro, Sujino Tomohisa, Takabayashi Kaoru, Mutakuchi Makoto, Emoto Katsura, Hosoe Naoki, Ogata Haruhiko, Kanai Takanori	4. 巻 1
2. 論文標題 Various Endoscopic Features in Monomorphic Epitheliotropic Intestinal T-Cell Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 312 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000513902	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 Kayashima Atsuto, Shimozaki Keitaro, Hirata Kenro, Mutaguchi Makoto, Takabayashi Kaoru, Hayashi Yuichiro, Hosoe Naoki, Ogata Haruhiko, Sujino Tomohisa, Kanai Takanori	4. 巻 14
2. 論文標題 Ulcerative colitis exacerbation after the onset of immune checkpoint inhibitor related colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 152 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01261-x	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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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