

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19075

研究課題名(和文)パイエル板に常在する新規記憶CD8T細胞群の機能解析

研究課題名(英文)The role of Opn-expressing CD8 T cells in the intestine

研究代表者

伊藤 甲雄(Ito, Koyu)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90609497

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)：本研究では正常状態のマウス腸管においてCD8T細胞がオステオポンチン(Opn)を持続的に発現していることを見出した。腸管組織の中で腸管上皮内リンパ球(IEL)CD8T細胞が最もOpnの発現が高く、ほとんどがTCR $\alpha\beta$ であることが分かった。腸管内TCR $\alpha\beta$ 細胞は抗菌ペプチドを産生することによって、腸内細菌叢の恒常性維持に寄与していることが報告されている。Opn遺伝子欠損マウスでは糞便中の細菌叢が野生型マウスと比較して大きく変化しており、IEL TCR $\alpha\beta$ 細胞数が低下していることが分かった。野生型マウスのIELを単離してOpn抗体存在下で培養すると細胞の生存が低下することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, using Opn-EGFP knock-in (KI) mice we found that CD8⁺ T cells in the intestinal tissues, including Peyer's patch, lamina propria and epithelium, express Opn under steady state conditions. Among these cell, intraepithelial lymphocyte (IEL) CD8 T cells shows highest expression of Opn, and majority of these cells are TCR $\alpha\beta$ cells. Opn knockout (KO) mice had altered fecal microflora concordant with a reduction of TCR $\alpha\beta$ + IELs. Consistent with this result, both treatment with anti-Opn blocking antibody and deficiency of Opn resulted in decreased survival of TCR $\alpha\beta$ + and TCR $\alpha\beta$ + IELs. This data suggests that a possibility that Opn may function as a survival factor for IELs in the intestinal tissue.

研究分野：免疫学

キーワード：オステオポンチン 腸内細菌叢 腸管上皮内リンパ球

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス(ECM)タンパク質であるオステオポンチン(Opn)は、炎症性サイトカインとして機能するとともに、その発現が炎症性疾患、癌、組織リモデリング等病理的条件下において著明に増強されることから、Opnの炎症性病態における重要性が示唆されている。事実、Opn 遺伝子欠損(KO)マウスや中和抗体の投与により自己免疫性関節炎や肝炎が改善されることが報告されている。これらの抑制効果は、Opn がインテグリン等細胞表面受容体に結合することにより活性化 T 細胞の生存や Th1 分化の促進といった免疫調節に関与することによるものと考えられている。こうした機能を持つ Opn の生体における役割をより詳しく検討するために、当研究室では Opn 遺伝子に EGFP を組み込んだレポーターマウスを作製した。これにより Opn 発現細胞を GFP の蛍光で観察することが可能になり、Opn 発現細胞の局在やソーティングによる単離後の解析を行うためのツールを得た。その解析において申請者はパイエル板の CD8 陽性 T 細胞の一部が正常状態において、GFP 陽性即ち Opn を産生していることを発見した。Opn と CD8T 細胞の関係については、これまでにインフルエンザウイルス感染時におけるメモリーCD8T 細胞形成を制御することが報告されているだけであり、CD8T 細胞による Opn 産生に関しては全く報告されておらず、その意義は不明である。パイエル板は常在細菌叢や食物由来の抗原に常にさらされていることから、他のリンパ器官とは T 細胞の活性化状態が異なることが予測された。そこで、この GFP 陽性 CD8T 細胞をフローサイトメトリー法により様々な活性化・メモリー細胞マーカーを用いて解析した結果、パイエル板に存在する GFP 陽性 CD8T 細胞はほとんどが CD103⁺CD69⁺CD62L^{low} に分画されることが分かった。これまでに、こ

れらのマーカーを示す細胞群は細菌またはウイルス感染時に現れ、上皮等非リンパ組織に留まる常在型メモリー細胞 (resident memory T cell: Trm)であることが報告されているが、正常個体における存在、特にパイエル板等のリンパ組織における局在については報告されていない。

2. 研究の目的

Opn レポーターマウスを用いた腸管における Opn 発現細胞の局在と生理的意義の解析

3. 研究の方法

腸管における Opn 発現細胞の局在及びその役割について、in vivo, in vitro の実験手法を用いて包括的に解析する。本研究の開始当初、パイエル板 CD8 T 細胞で生理状態における持続的な Opn の発現が認められたが、他の腸管組織における発現をフローサイトメトリー及び組織学的解析を行った結果、腸管上皮内リンパ球(IEL)の CD8T 細胞が最も Opn の発現が高いことが分かった。そこで、この IEL CD8 T 細胞に重点をおいて解析を行った。初めにこの CD8 T 細胞の性状を調べるために CD69 等の活性化マーカー及び TCR $\alpha\beta$ 、 $\gamma\delta$ の発現をフローサイトメトリーによって解析した。その後、この細胞の機能における Opn の生理的意義を明らかにするために、Opn 遺伝子欠損マウスと野生型マウスから糞便を採取し、次世代シーケンサーを用いて細菌叢の解析を行った。また、Opn 遺伝子欠損による IEL CD8 T 細胞の数を解析した。さらに IEL CD8 T 細胞を FACS ソーティングにより単離し、抗 Opn 阻害抗体存在下で培養した後に Cell Titer Glo を用いて、IEL CD8 T 細胞の生存における Opn の役割を調べた。

4. 研究成果

(1)初めに正常状態のマウス腸管における Opn の発現をフローサイトメトリーで解析し

た結果、パイエル板(PP)、粘膜固有層(LP)、腸管上皮内リンパ球(IEL)の CD8 T 細胞で発現が認められ、その中で IEL CD8 T 細胞で最も発現が高かった(図 1)。この IEL CD8 T 細胞の性状を解析するために、細胞表面マーカーを解析した結果、この持続的に Opn を発現する IEL CD8 T 細胞は主に TCR $\gamma\delta$ を発現しており、活性化の表現型を示していた(CD103+CD62LloCD44hiCD69+)。

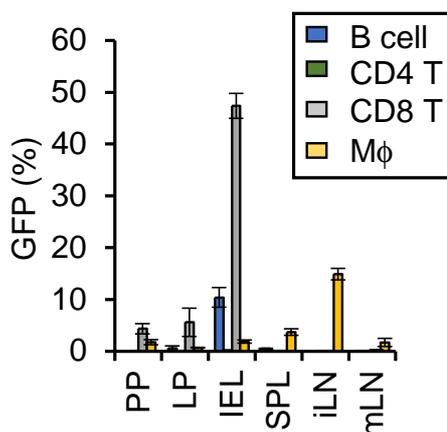


図 1. 各組織における Opn 発現細胞群の割合
PP: パイエル板、LP: 粘膜固有層、IEL 腸管上皮内リンパ球、SPL: 脾臓、iLN: 鼠径リンパ節、mLN 腸間膜リンパ節

(2)過去の報告において、 $\gamma\delta$ IEL は抗菌ペプチドを産生することによって、腸内細菌叢の恒常性維持、及びサルモネラ感染制御に機能していることが明らかになっている。そこで、これらの機能における Opn の寄与を検討するために、Opn 欠損マウス及び野生型マウスから糞便を採取し、ゲノム DNA を精製した後に、次世代シーケンサーによって糞便中の細菌叢を解析した。その結果、Opn 遺伝子欠損マウスの細菌叢は野生型と比較して大きく変化していることが明らかになった(図 2)。

(3)Opn 遺伝子欠損による腸内細菌叢の変化の要因を探るために Opn 遺伝子欠損マウスから単離した IEL $\gamma\delta$ T 細胞の抗菌因子の発現パターンをマイクロアレイ及びリアルタイム

PCR によって解析したが、野生型と比較してほとんど違いは認められなかった。そこで、

Opn 遺伝子欠損による $\gamma\delta$ IEL の数について解析を行った。その結果、野生型マウスと比較して、Opn 遺伝子欠損マウスにおいて $\gamma\delta$ IEL の数が有意に減少していた。この細胞数減少の分子機序を明らかにするために、野生型マウスから $\gamma\delta$ IEL を単離して、抗 Opn 阻害抗体存在下で培養し、その後の細胞の生存を Cell titer Glo により測定した。その結果、対照抗体添加群と比較して、抗 Opn 抗体添加群において細胞の生存が有意に低下していた。以上の結果より、Opn は腸管において、 $\gamma\delta$ IEL の生存を維持することによって抗菌因子の総量を保ち、腸内細菌叢の恒常性維持に貢献している可能性が示された。以上の結果は、Plos One (2017) e0173629 にて発表した

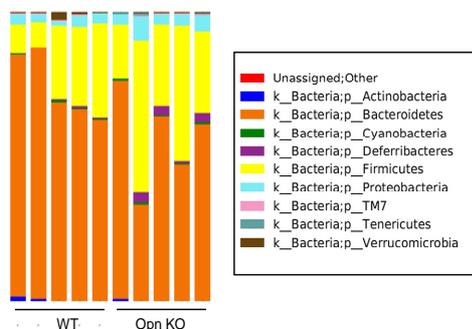


図 2. Opn 欠損マウスと野生型マウスの細菌叢の比較

それぞれのマウスから糞便を採取し、ゲノム DNA を抽出した後に、次世代シーケンサーにより細菌叢の割合を比較した。

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 3 件)

Ito K., Nakajima A., Fukushima Y., Suzuki

K., Sakamoto K., Hamazaki Y., Ogasawara K., Minatao N., Hattori M., The potential role of Osteopontin in the maintenance of commensal bacteria homeostasis in the intestine. Plos One (2017) Mar 15; 12 (3): e0173629 doi: 10.1371/journal.pone.0173629 査読有

Kawakami T., **Ito K.**, Matsuda Y., Noda M., Sakurada A., Hoshikawa Y., Okada Y., Ogasawara K., Cytotoxicity of Natural Killer Cells Activated Through NKG2D Contributes to the Development of Bronchiolitis Obliterans in a Murine Heterotopic Tracheal Transplant Model. Am J. Transplant. (2017) Mar 1 in press doi: 10.1111/ajt.14257 査読有

Sakamoto K., Fukushima Y., **Ito K.**, Matsuda M., Nagata S., Minato N., Hattori M., Osteopontin in Spontaneous Germinal Centers Inhibits Apoptotic Cell Engulfment and Promotes Anti-Nuclear Antibody Production in Lupus-Prone Mice. J. Immunol., (2016) Sep 15; 197(6): 2177-86 doi: 10.4049/jimmunol.1600987. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Ito K., Iguchi N., Natsumi A., Higuchi S., Sato N., Ogasawara K., Abrogation of histamine regulates T cell activation in palladium allergy 第 11 回研究所ネットワーク国際シンポジウム 2017 年 1 月 26 日~27 日 (徳島)

伊藤甲雄、井口直彦、秋山なつみ、樋口繁仁、佐藤直毅、小笠原康悦 パラジウムによる金属アレルギーにおけるヒスタミンの役割 第 70 回細菌学会東北支部会 2016 年 8 月 18 日~19 日 (十和田)

Ito K., Fukushima Y., Sakamoto K., Hattori

M., Osteopontin-secreting TCR $\gamma\delta^+$ CD8 $^+$ intraepithelial lymphocyte maintains homeostasis of commensal bacteria in the intestine 第 44 回日本免疫学会 2015 年 11 月 18 日~20 日 (札幌)

伊藤甲雄、福島祐二、坂本恵子、服部雅一 腸管に常在する Opn 発現 T 細胞群の機能解析 第 3 回マトリセルフォーラム 2015 年 9 月 12 日~13 日 (三重)

〔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 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
伊藤 甲雄 (ITO, KOYU)
東北大学加齢医学研究所
生体防御学分野 助教
研究者番号 : 90609497

(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 ()