

令和元年6月28日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05087

研究課題名(和文) 腸管から全身に移行する免疫細胞の動態と機能分子解析による多臓器連携制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms underlying multi-organ cooperative regulation by analyzing immune cells migrated from gut to whole body and their functional molecules

研究代表者

戸村 道夫 (Michio, Tomura)

大阪大谷大学・薬学部・教授

研究者番号：30314321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：腸管環境は癌、肥満、糖尿病などの全身の疾患に関わっていると考えられるが、そのメカニズムは殆どわかっていない。本研究では、腸管を起点とした多臓器連携のメカニズムを、腸管組織から多臓器に移行する免疫細胞に焦点を当て明らかにすることを目的とした。臓器間細胞移動を追跡できる光変換蛍光タンパク質KikGRマウスを用いた評価系で、通常食摂取、高脂肪食摂取マウス、および抗生物質による腸内共生細菌除去マウスを解析し、腸管関連組織から全身の免疫系に移行する免疫細胞サブセット、フェノタイプを明らかにした。さらに、共生細菌により刺激を受けた腸管関連組織由来細胞が骨髄に移行して機能している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管から移行した細胞を明確に特定できる臓器間細胞動態評価系を用いることで、腸管内環境変化時の多臓器への免疫細胞動態を明らかにしたこと、さらに、腸管から骨髄に移行した細胞の機能的な役割は新しい概念である。これらは、腸管を起点とした移動した免疫細胞による多臓器連携の生体恒常性維持機構の理解に重要な知見であり学術的な意義は大きい。また社会でも、食による共生細菌制御を介した腸管環境制御による全身性の疾患制御への注目が高まっており、食の改善、介入による免疫系を介した全身レベルの健康状態維持の重要性を示せたことの社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The intestinal environment is thought to be involved in systemic diseases such as cancer, obesity and diabetes, however the mechanism is poorly understood. Therefore, in this study, we aimed to clarify the mechanism of multi-organ cooperation starting from the intestinal tract, focusing on immune cells migrated from intestinal tissue to multiple organs. We analyzed cells migrated from gut-related tissues to whole body by KikGR mice that can track cell movement between organs in normal food intake, high fat diet intake mice, and enteric commensal bacteria-free mice with antibiotics. Then, we clarified immune cell subsets and phenotypes that are migrated to the immune system. Furthermore, we found the mechanism that enteric tissue-derived cells stimulated by commensal bacteria migrate to the bone marrow and express function.

研究分野：細胞免疫学

キーワード：腸管 免疫細胞移動 パイエル板 骨髄 光変換蛍光タンパク質発現マウス 腸内共生細菌叢

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管関連組織では、腸内共生細菌の存在により病原性の Th17 や抑制性の制御性 T 細胞 (Treg) が誘導される。そして、腸内共生細菌を除去したマウスでは、自己免疫疾患の病態が緩和される一方、腫瘍浸潤顆粒球からの炎症性サイトカイン誘導による腫瘍退縮作用が抑制される。さらに、腸内細菌バランス変化は、肥満・内臓脂肪蓄積に関わり糖尿病などの生活習慣病の誘引、発がん率の増加に関わる。以上の様に、腸管内環境は全身レベルの恒常性維持に密接に関連し重要な役割を担っている。しかし、腸内環境変化が免疫応答を含む全身的な生体変化をどのように惹き起こしているか、という「腸管から全身への多臓器制御のメカニズム」は殆どわかっていない。腸管から全身への多臓器制御のメカニズムの一つとして、腸管で刺激を受けた細胞の目的臓器への移行と機能発現が考えられるが全く分かっていなかった。

我々は以前より、紫色の光照射で緑から赤に変換する光変換蛍光タンパク質「カエデあるいは KikGR」を全身の細胞に発現するマウスを用いた *in vivo* 細胞動態評価系を確立し、全身レベルの免疫細胞の時間・空間・数量的な制御情報解明に基づく免疫系の理解、というアプローチを進め、*in vivo* での免疫細胞の時間・空間動態に基づいた分画と解析が、免疫応答の理解に重要であることを示してきた。移動した細胞は、前にいた臓器の情報をもった”情報のメッセンジャー”であり、動態情報、移動の分子メカニズム、機能分子の発現の詳細を明らかにすることが大切である。そこで研究開始当初より、腸管から全身に移行する免疫細胞の重要性に着目し解析してきた。そして、予備検討において小腸粘膜固有層 (SI-LP)/パイエル板 (PP) から骨髄に B 細胞が高頻度で移行していることを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、腸管組織から多臓器に移行する免疫細胞に着目し、臓器間の細胞移動を追跡できる KikGR マウスと、細胞の胴体情報に基づいた細胞分画と遺伝子発現解析を組み合わせて用いる。担癌マウスを用い、腸内環境を変化させたときに、腸管から骨髄、腫瘍、脂肪組織を中心に多臓器に移行する 1) 免疫細胞の同定、2) 臓器間動態情報の解明、3) 臓器への移動に用いる分子と機能発現分子の解明、さらに 4) 骨髄に移動した細胞の骨髄造血幹細胞ニッチの維持における役割とその分子機構の解明を行う。そして最終的に、腸内から全身への多臓器連携制御機構を、骨髄造血幹細胞ニッチ環境の維持を中心に、腸管から移動する細胞という視点から理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) KikGR マウスを用いた臓器間細胞動態の解析

全身の細胞で紫色の光で緑色から赤に変色する蛍光タンパク KikGR を発現している KikGR マウスを用いた。通常食飼育、あるいは抗生物質による腸内細菌除去、高脂肪食飼育により腸内環境を変化させた KikGR マウスの小腸粘膜固有層 (SI-LP)、パイエル板、小腸 (SI-LP とパイエル板)、大腸、骨髄、リンパ節などに、405 あるいは 435nm の紫光を照射し、照射組織に存在する細胞を赤色 (KikGR-Red) にマーキングした。一定時間後に臓器を摘出、細胞を分離し抗体染色後フローサイトメーターにより解析した。

(2) Th サブセットの分類、サイトカイン産生細胞の検出

IL-17A、IFN- γ の細胞内染色により Th17 および Th1 を検出した。Foxp3⁺Treg 細胞の検出には、Foxp3⁺細胞が hCD2 を細胞表面に発現し、細胞内染色無しで Foxp3⁺細胞の検出が可能である Foxp3-hCD2/hCD52 マウス (東大 堀昌平博士が確立) を KikGR マウスと掛け合わせて用いた。

(3) 移動情報に基づいて分画した細胞の遺伝子発現解析

通常食飼育、腸内細菌除去、および高脂肪食飼育 KikGR マウスの腸管を光照射して細胞を KikGR-Red にマークし、24 時間後に B 細胞について、骨髄に移動した KikGR-Red 細胞と前から骨髄に存在していた KikGR-Green 細胞を分取した後、創薬等支援技術基盤プラットフォーム解析拠点機能ゲノミクス領域の支援を受け、国立遺伝学研究所の金城先生を中心にしたサポートにより SAGE 解析し、各群間の遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

(1) 腸管部位、各パイエル板に対する所属腸間膜リンパ節の対応マップの作成：

SI-LP あるいはパイエル板を回盲部から十二指腸方向に順次位置を移して照射し 24 時間後に、腸間膜リンパ節 (MLN) を遠位側から 5 部位に分けて解析した。その結果、回盲部を光照射した場合、一番遠位の MLN 部分に樹状細胞は移行した。光照射部位を十二指腸方向に移動していくと、MLN に移行する DC が検出される部位も近位側に移動することをフローサイトメトリ解析で検出した。さらに、樹状細胞特異的に KikGR を発現する CD11c-KikGR マウスを用い、MLN の各対応する節に移動した赤くマーキングされた樹状細胞のイメージング像を取得し明らかにした。以上の結果は、SI-LP あるいはパイエル板の各部位の腸内細菌叢は異なる

ことから、異なる腸管部位から移行した樹状細胞が存在する腸間膜リンパ節の各節は異なる微小環境を形成していることを示している。

(2) 腸内環境変化時に腸管から多臓器に移行する免疫細胞の同定と臓器間動態情報

- ① 通常食飼育の KikGR マウスの SI-LP and/or パイエル板を照射して細胞を KikGR-Red にマークし、骨髄、MLN、脾臓、皮下リンパ節への移行を解析したところ、成熟 B 細胞、および T 細胞の各サブセット (Th1、Th17、Treg) とも SI-LP からはパイエル板の約 1/10 の細胞が移行していることがわかった。そこで、小腸 (SI-LP と パイエル板) を照射して解析したところ、高脂肪食飼育群では腸管から末梢組織に移行する細胞は通常食飼育群に比べてわずかに減少した。腸内共生細菌除去群では、通常食飼育群と比べ、骨髄、脾臓および皮下リンパ節への移行が減少した。乳酸菌含有食飼育マウスについても T 細胞のナイーブ、エフェクターメモリーフェノタイプ、Treg、IgA 陽性 B 細胞、樹状細胞の各サブセットを解析したが、通常食飼育群に比べて、細胞数変化および臓器間移動に大きな変化を認めることが出来なかった (東京医科歯科大学、安達貴弘准教授との共同研究)。抗原特異的な IgA 産生細胞の検出など、より抗原特異的な応答に関わる細胞の解析が必要であると考えられる。
- ② 通常食飼育および高脂肪食飼育マウスの小腸から上行結腸分までを光照射して細胞をマーキングし、腸管組織から腫瘍および脂肪組織への移行を解析した。その結果、通常食飼育群、および高脂肪食飼育群のいずれにおいても両組織へは少数の T 細胞および B 細胞が移行しているのみであった。以上の結果は、腸管から両組織に移動した免疫細胞による、組織内での免疫系細胞による腫瘍内あるいは脂肪内微小環境制御への関与は低い可能性を示唆するが、腸管から移行した細胞の質のより詳細な解析が必要であると考えられた。
- ③ 小腸から骨髄への B 細胞の各分化サブセットの移行を通常食飼育群および高脂肪食飼育群で解析したが、いずれの群においても腸管組織から骨髄へは mature B 細胞のみ移行し、mature B 細胞の中でも IgM^{high} および IgM^{low} 細胞で差は認められなかった。

(3) 腸管組織から骨髄に移行する免疫細胞による骨髄造血ニッチの維持機構の解析

前述のように腸管から骨髄に多数の B 細胞が移行していることから、腸管組織から骨髄に移行する B 細胞が骨髄造血幹細胞ニッチの維持に関わっている可能性について解析した。

- ① 腸内共生細菌除去群では、骨髄細胞とともにパイエル板と末梢のリンパ組織も減少した。
- ② 腸内共生細菌除去マウスでは骨髄の B 細胞移入能が低下しているのかを調べるために、非処置マウスのパイエル板から取得した B 細胞をラベルして、通常食飼育および腸内共生細菌除去マウスに移入したところ、腸内共生細菌除去群では、骨髄およびリンパ節、脾臓で移入した細胞が、通常食飼育群よりもむしろ増加していた。この結果から、腸内共生細菌除去マウスでも骨髄の B 細胞移入能は低下していないと考えられた。
- ③ パイエル板由来 B 細胞の骨髄造血幹細胞ニッチの維持における重要性を調べるために、パイエル板およびリンパ節から分離した B 細胞を抗生物質投与開始後複数回移入し、抗生物質投与終了時に解析した。すると、パイエル板由来 B 細胞移入群では、骨髄造血幹細胞の減少が抑制され、この効果はリンパ節由来 B 細胞移入群では認められなかった。この結果から、パイエル板に存在する B 細胞の方がリンパ節に存在する B 細胞よりも骨髄造血幹細胞ニッチの維持への役割が大きいことが示唆された。
- ④ 通常食飼育群において、腸管組織から骨髄に移行した B 細胞と、骨髄に前から存在していた B 細胞の遺伝子発現を比較した。すると、腸管組織から骨髄に移行した B 細胞の方が骨髄に前からいた B 細胞に比べ、一つのサイトカインとインテグリンの発現が優位に高かった。以上の結果から、腸管組織から骨髄に移行した B 細胞の性質は、骨髄に既に存在している B 細胞とは異なっていることが示された。
- ⑤ しかし、腸管組織から骨髄に移行した B 細胞での前述のサイトカインとインテグリンの高発現は、腸内細菌除去群では認められなかった。さらに、腸管組織から骨髄に移行した B 細胞について、通常食飼育群と腸内細菌除去群を比較すると、前述のサイトカインとインテグリンの発現は通常食飼育群で優位に高かった。以上の結果から、腸管組織から骨髄に移行する B 細胞が造血幹細胞ニッチの維持の役割を果たすためには、移動する細胞数のことも考慮する必要はあるが、腸管組織で腸内共生細菌由来のシグナルを受けている必要があることを示唆していると考えられた。

以上の結果から、腸内共生細菌叢で刺激を受けた B 細胞が骨髄に移行し骨髄造血ニッチの機能維持に働いているメカニズムの存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Rojas OL, Pröbstel AK, Porfilio EA, Wang AA, Charabati M, Sun T, Lee DSW, Galicia G, Ramaglia V, Ward LA, Leung LYT, Najafi G, Khaleghi K, Garcillán B, Li A, Besla R, Naouar I, Cao EY, Chiaranunt P, Burrows K, Robinson HG, Allanach JR, Yam J, Luck H, Campbell DJ, Allman D, Brooks DG, Tomura M, (10名), Gommerman JL. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*. 2019, 176(3), 610-624.
DOI:10.1016/j.cell.2018.11.035.
- ② Calcinotto A, Brevi A, Chesi M, Ferrarese R, Garcia Perez L, Grioni M, Kumar S, Garbitt VM, Sharik ME, Henderson KJ, Tonon G, Tomura M, Miwa Y, Esplugues E, Flavell RA, Huber S, Canducci F, Rajkumar VS, Bergsagel PL, Bellone M. Microbiota-driven interleukin-17-producing cells and eosinophils synergize to accelerate multiple myeloma progression. *Nat Commun*, 2018, 9(1), 4832.
DOI:10.1038/s41467-018-07305-8
- ③ Nakanishi Y, Ikebuchi R, Chtanova T, Kusumoto Y, Okuyama H, Moriya T, Honda T, Kabashima K, Watanabe T, Sakai Y, Tomura M. Regulatory T cells with superior immunosuppressive capacity emigrate from the inflamed colon to draining lymph nodes. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(2), 437-448.
DOI:10.1038/mi.2017.64.

[学会発表] (計6件)

- ① TOMURA Michio、(他5人)、Colonic Tregs migrated from inflamed colon proliferate in draining lymph node. Simultaneous detection of cellular movement and proliferation、第47回日本免疫学会学術集会、2018年。
- ② 戸村道夫、大腸から所属リンパ節に移行した制御性 T 細胞の増殖 —臓器間細胞移動と細胞周期の同時検出—、日本分子生物学会第41回年会、2018年。
- ③ 植田都月、戸村道夫、(他6人)、大腸から所属リンパ節に移行した制御性 T 細胞の増殖 —臓器間細胞移動と細胞周期の同時検出—、日本薬学会近畿支部第68回大会 2018年。
- ④ TOMURA Michio、Regulatory T cell movement and heterogeneity in inflamed skin and colon、第11回寄生虫感染免疫研究会、2017年。
- ⑤ TOMURA Michio、Specific features of Tregs migrated from skin and colon to the draining lymph node in the steady state and under inflammation、ICIS 2017-International Conference on Information Systems、2017年。
- ⑥ 戸村道夫、カエデマウスを用いた、免疫細胞の臓器間移動情報に基づく免疫系の理解、第7回オルソオルガノジェネシス検討会、2017年。

[図書] (計3件)

- ① 戸村道夫、健常時から末梢組織炎症時における制御性 T 細胞の生体内動態と関連した多様性・機能変化、pp1183-1190、制御性 T 細胞研究の現在、医学の歩み 別冊(264頁)、268巻 13号 2019年。
- ② TOMURA Michio、New Tools for Imaging of Immune Systems: Visualization of Cell Cycle, Cell Death, and Cell Movement by Using the Mice Lines Expressing Fucci, SCAT3.1, and Kaede and KikGR. *Methods Mol Biol*, 1763, 165-174, 2018.
DOI:10.1007/978-1-4939-7762-8_16.
- ③ ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A100 戸村道夫/編(312頁)、羊土社、戸村道夫、p1、pp11-17、pp108-123、pp262-263、pp63-65、pp76-77、2017年。

[産業財産権]

無し

[その他]

無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：楠本 豊

ローマ字氏名：KUSUMOTO yutaka

研究協力者氏名：守屋 大樹

ローマ字氏名：MORIYA taiki

研究協力者氏名：安達 貴弘

ローマ字氏名：ADACHI takahiro

研究協力者氏名：植田 都月

ローマ字氏名：Ueda mizuki

研究協力者氏名：西居 亜希子

ローマ字氏名：NISHII akiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。