

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06243

研究課題名(和文) 間葉系細胞間コミュニケーションによる粘膜治癒機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mesenchymal network for the mucosal healing

研究代表者

倉島 洋介 (Yosuke, Kurashima)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：30729372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患の治療には炎症反応の軽減のみならず、粘膜上皮の適切な修復・再生の誘導が必須である。治癒には、細胞外マトリックスの産生を介した組織の修復と上皮細胞の適正な分化・増殖が必須であり、腸管間葉系細胞群が主体となって働く。しかしながら、粘膜修復に寄与する間葉系細胞の特性や機能的分類や解析は進んでおらず、詳細は不明であった。

本研究では、マウスの組織中の間葉系細胞群の網羅的解析によって、腸管粘膜修復に寄与する線維芽細胞亜群を新たに同定した。この細胞亜群の特徴化を行うと同時に、機能的な制御によって粘膜治癒が顕著に遅延することが示された。本研究から間葉系細胞による粘膜修復機序の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患をはじめとした慢性疾患の治療では、炎症反応の抑制のみならず、組織環境の適正化を導くことが重要である。組織微小環境を構築する細胞群として、線維芽細胞や筋線維芽細胞等の間葉系細胞が知られている。しかしながら、これらの詳細な解析が慢性炎症の新規治療法の確立に大きく貢献することは予想されつつも、その機能的制御法や組織修復に特化した細胞亜群については未だ不明な点が多く残されていた。今後は、本研究によって明らかになった腸炎特異的に産生される粘膜修復因子や新規間葉系細胞亜群ならびに、そこから見出された新たな修復機序に立脚した、炎症性腸疾患の新たな治療戦略の確立が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Control of inflammatory responses as well as promotion of mucosal repair are required for the adequate treatment and cure of intestinal bowel diseases, such as Crohn's diseases and Ulcerative colitis. Mucosal mesenchymal cell populations function as a central source of extra cellular matrix and are required for the development and maintenance of stem cell niches in the colon. However, the precise mechanisms and subsets within the mucosal mesenchymal cells, involved in the process of mucosal repair, have not been well elucidated.

In this project, we first comprehensively analyzed the functional characteristics of those mesenchymal cells and found the unique and novel subsets are increased upon inflammatory responses. We further regulated the mesenchymal cellular population and found the disruption of its function resulted in the delay of mucosal repair. These results indicated the novel target of mesenchymal cells for promotion of mucosal repair was elucidated.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：炎症性腸疾患 間葉系細胞 粘膜修復 細胞外マトリックス 創傷治癒

若手研究(A) 2016年度-2018年度 2016-04-01-2019-03-31
「間葉系細胞間コミュニケーションによる粘膜治癒機構の解明」

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、難治性多因子疾患である炎症性腸疾患の発症において、障害を受けた上皮細胞から細胞外へと放出されるアデノシン3リン酸(ATP)とその受容体である P2X7 受容体が炎症性細胞の一つであるマスト細胞を活性化し、炎症を増悪化させることを明らかにしている(Kurashima Y et al., Nat. Commun., 2012, Tsai SH et al., Immunity, 2015)。Eser らによって、P2X7 受容体阻害剤 (AZD9056) が薬剤第 2 相試験において、炎症性腸疾患症状の改善に寄与したことも報告されており、細胞外 ATP-P2X7 受容体の経路が新たな治療の標的となる機運が高まっている (Eser A et al., Inflamm. Bowel. Dis., 2015)。その一方で、腸内細菌に絶えず暴露されている腸管組織においては、粘膜組織の修復・再生が適切に行われなことが致命傷となるため、炎症反応の阻害のみならず粘膜上皮の保護や再生の亢進が効果的な炎症性腸疾患の治療につながる (Krishnan K et al., Inflamm. Bowel. Dis., 2011)。近年、培養腸上皮幹細胞や骨髄由来間葉系幹細胞の移植 (Yui S et al., Nat. Med., 2012、Liew A et al., Dig. Dis., 2014) が新規治療法として期待されており、炎症性腸疾患は抗炎症研究から粘膜再生研究へと発展している。組織修復・再生には線維芽細胞と活性化型線維芽細胞である筋線維芽細胞の働きが不可欠であることが知られているものの、その詳細なメカニズムはいまだ不明である (Chivukula RR et al., Cell, 2014)。

申請者らはこれまでに、線維芽細胞の性質が皮膚や肺、小腸、大腸など組織間で異なることを報告しており、この組織特異性は、免疫細胞の過剰な活性化を未然に防ぐために必須であることを世界に先駆けて明らかにしている (Kurashima Y et al., Immunity, 2014)。ヒト組織での解析でも、線維芽細胞に発現している分子が粘膜局所でも異なることが示されており (Higuchi Y et al., PLoS One, 2015)、線維芽細胞にも複数の細胞亜群が存在することが示唆される。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患の治療には炎症反応の軽減のみならず、粘膜上皮の適切な修復・再生の誘導が必須である。これらの過程、すなわち粘膜における細胞外マトリックスによる修復と上皮細胞の適正な分化・増殖においては、線維芽細胞や筋線維芽細胞をはじめとした腸管間葉系細胞が主体となり粘膜が治癒する。本研究では、粘膜治癒の各過程に働く間葉系細胞群の網羅的機能解析を行い、粘膜治癒機構の全容解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究は、「粘膜修復」と「粘膜再生」の各過程に働く間葉系細胞群の同定と機能を明らかにし、腸管組織の修復・再生に関わる新たな因子の探索と間葉系細胞間の連携による効果的な粘膜治癒機構の解明を目指した。最初に、腸管慢性炎症の治癒に寄与する間葉系細胞の分類や特徴化を行うため、マウスの各臓器に分布する間葉系細胞を単離し、発現遺伝子の比較解析を行った。網羅的解析から得られた遺伝子発現パターンに基づき数種類の細胞群に細分化し、炎症レベルと相関し増加してくる細胞群について解析を行った。さらに、これら細胞をフローサイトメトリーによって単離し、炎症の急性期慢性期における遺伝子プロファイリングから、新規粘膜修復候補因子を探索した。CRISPRCas9 を用いた候補遺伝子の欠損マウスを作製し、腸炎

を誘導することで機能的解析を行うと同時に、粘膜修復プロセスへの関与について in vitro、in vivo 解析を行った。

4. 研究成果

小腸、大腸、腎臓、肝臓、皮膚等のマウスの各臓器に分布する間葉系細胞を単離し、発現遺伝子の比較解析を行ったところ、各臓器に特異的に発現する遺伝子群が存在していることが示された。さらに、各臓器を標的とした疾患モデルと用いて、炎症時に発現レベルが増加する遺伝子を抽出し、組織・臓器間で特徴的な分子群を探索した。その結果、Wnt5などの幹細胞ニッチの維持に関わるサイトカインを産生する細胞亜群や腸炎発症時においてICAM1やVCAM1といった免疫細胞との接着に関わる接着因子の発現を増加させる細胞亜群が存在していることを見出した。これらの細胞集団を含む間葉系細胞亜群を単離し、腸炎発症時に急性から治癒（慢性期）にかけて発現が増強する遺伝子群を新たに同定した。さらに、候補分子・細胞集団に対する機能阻害抗体を作製するとともにCRISPRCas9を用いた候補遺伝子の欠損マウスを作製した。腸炎発症時の阻害抗体投与実験を行うとともに、遺伝子欠損マウスに対してデキストラン硫酸ナトリウムによる腸炎を誘導し、機能的な制御による粘膜治癒への影響について解析を進めた。その結果、腸炎増悪化ならびに上皮再生が有意に遅延する個体が得られ、粘膜修復の詳細な解析を行った結果、腸管粘膜修復に寄与する線維芽細胞亜群を新たに同定した。本研究によって明らかになった腸炎特異的に産生される粘膜修復因子や新規間葉系細胞亜群ならびに、そこから見出された新たな修復機序に立脚した、炎症性腸疾患の新たな治療戦略の確立が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 21 件）

国際誌

1. Kurashima Y, Tokuhara D, Kamioka M, Inagaki Y, Kiyono U. "Intrinsic control of surface immune and epithelial homeostasis by tissue-resident gut stromal cells", doi: 10.3389/fimmu.2019.01281, *Frontiers in immunology*, 査読有, 2019 in press
2. Hashizume-Takizawa T, Shibata N, Kurashima Y, Kiyono H, Kurita-Ochiai T, Fujihashi K, Distinct Roles for Peyer's Patch B Cells for Induction of Antigen-specific IgA Antibody Responses in Mice Administered Oral Recombinant, *International Immunology*, 査読有, 2019, doi: 10.1093/intimm/dxz029
3. Tokuhara D, Kurashima Y, Kamioka M, Nakayama T, Ernst P, Kiyono H, A comprehensive understanding of the gut mucosal immune system in allergic inflammation, *Allergol Int*, 査読有, 68(1), 2019, 17-25 doi:10.1016/j.alit.2018.09.004
4. Inami A, Kiyono H, Kurashima Y, ATP as a Pathophysiologic Mediator of Bacteria-Host Crosstalk in the Gastrointestinal Tract, *International journal of molecular sciences*, 査読有, 19(8), 2018, doi:10.3390/ijms19082371
5. Takemura N, Kurashima Y, Mori Y, Okada K, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, Aayam L, Kaneto S, Park EJ, Sato S, Matsunaga K, Tamura Y, Ouchi Y, Kumagai Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Yoshioka Y, Nishimura J, Mori M, Ishii KJ, Rothenberg ME, Kiyono H, Akira S, Uematsu S, Eosinophil depletion suppresses radiation-induced small intestinal fibrosis, *Science translational medicine*, 査読有, 10(429), 2018, doi:10.1126/scitranslmed.aan0333
6. Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, Yamamoto T, Kurokawa S, Yuki Y, Takemura N, Uematsu S, Lai CY, Otsu M, Matsuno H, Osawa H, Mizushima T, Nishimura J, Hayashi M, Yamaguchi T, Kiyono H, A Refined Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Organoids, *Stem cell reports*, 査読有, 10(1), 2018, 314-328 doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.004
7. Kurashima Y, Yamamoto D, Nelson S, Uematsu S, Ernst PB, Nakayama T, Kiyono H, Mucosal Mesenchymal Cells: Secondary Barrier and Peripheral Educator for the Gut Immune System, *Frontiers in immunology*, 査読有, 8, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01787
8. Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, Lai CY, Otsu M, Hayashi M, Yamaguchi T, Kiyono H, Reciprocal Inflammatory Signaling Between Intestinal Epithelial Cells and Adipocytes in

- the Absence of Immune Cells, *EBioMedicine*, 査読有, 23, 2017, 34-45 doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.027
9. Shimokawa C, Kanaya T, Hachisuka M, Ishiwata K, Hisaeda H, Kurashima Y, Kiyono H, Yoshimoto T, Kaisho T, Ohno H, Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections, *Immunity*, 査読有, 46(5), 2017, 863-874 doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.017
 10. Kurashima Y, Kiyono H, Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing, *Annual review of immunology*, 査読有, 35, 2017, 119-147 doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052424
 11. Furuta Y, Tsai SH, Kinoshita M, Fujimoto K, Okumura R, Umemoto E, Kurashima Y, Kiyono H, Kayama H, Takeda K, E-NPP3 controls plasmacytoid dendritic cell numbers in the small intestine, *PloS one*, 査読有, 12(2), doi: 10.1371/journal.pone.0172509
 12. Toyoshima S, Wakamatsu E, Ishida Y, Obata Y, Kurashima Y, Kiyono H, Abe R, The spleen is the site where mast cells are induced in the development of food allergy, *International immunology*, 査読有, 29(1), 2017, 31-45 doi: 10.1093/intimm/dxx005
 13. Joo S, Fukuyama Y, Park EJ, Yuki Y, Kurashima Y, Ouchida R, Ziegler SF, Kiyono H, Critical role of TSLP-responsive mucosal dendritic cells in the induction of nasal antigen-specific IgA response, *Mucosal Immunology*, 査読有, 10(4), 2016, 901-911 doi: 10.1038/mi.2016.103
 14. Nelson S, Kiyono H, Kurashima Y, Epithelial extracellular ATP: an initiator of immunity to parasitic infections, *Immunology and cell biology*, 95(2), 2017, 117-118 doi: 10.1038/icb.2016.106
 15. Wakita D, Kurashima Y, Crother TR, Noval Rivas M, Lee Y, Chen S, Fury W, Bai Y, Wagner S, Li D, Lehman T, Fishbein MC, Hoffman HM, Shah PK, Shimada K, Arditi M, Role of Interleukin-1 Signaling in a Mouse Model of Kawasaki Disease-Associated Abdominal Aortic Aneurysm, Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 査読有, 36(5), 2016, 886-897 doi: 10.1161/ATVBAHA.115.307072

国内誌

1. 名切 真里奈, 清野 宏, 倉島 洋介, 腸管粘膜免疫・保護の中軸を担う粘膜間葉系細胞, *リンパ学*, 査読無, 41(2), 2018, 96-101
2. 山本 智久, 清野 宏, 倉島 洋介, in vitro 腸管マルチエコシステム解析から見てきた腸内細菌-上皮-免疫クロストークの多様性, *腎臓内科・泌尿器科*, 査読無, 7(6), 2018, 613-618
3. 倉島 洋介, 山本 大樹, 清野 宏, 粘膜間葉系細胞による免疫末梢教育と上皮細胞分化制御, *実験医学*, 査読無, 35(7), 2017, 1110-1116
4. 小暮 優太, 山本 大樹, 清野 宏, 倉島 洋介, 組織特異的マスト細胞鎮静化機構の解明と応用, *アレルギーの臨床*, 査読無, 37(3), 2017, 54-57
5. 小暮 優太, 松村 成一, 倉島 洋介, 清野 宏, 血管・リンパ管系を中心としたマスト細胞の感染制御及び炎症機構, *リンパ学*, 査読無, 39(2), 2016, 109-118
6. 小暮 優太, 倉島 洋介, 清野 宏, マスト細胞活性化制御による生体バリアの恒常性維持機構, *アレルギー*, 査読無, 65(2), 2016, 104-112 doi: 10.15036/arerugi.65.104

〔学会発表〕(計 23 件)

・一般発表

国内 (7 件)

1. Kurashima Y., Takasato Y., Kiuchi M., Hirahara K., Murasaki S., Kunisawa J., Kubo M., Uematsu S., Nakayama T., and Kiyono H. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of food allergy」『第 47 回日本免疫学会学術集会』(福岡) 2018 年 12 月(Oral)
2. Kurashima Y., Murasaki S., Morimoto M., Shimizu K., and Kiyono H. 「Mesenchymal-myeloid cell interactions in microenvironment for novel fibrogenic machinery in tissue fibrosis」『千葉大学 グローバルプロミネント研究基幹 シンポジウム (第 3 回)』(千葉) 2018 年 11 月 (Poster)
3. Kurashima Y. 「Mesenchymal cells: Secondary barrier and peripheral educator for the immune system」『第 20 回千葉大学テニュアトラックセミナー』(千葉) 2018 年 11 月(Oral)
4. 倉島洋介, 松村成一, 村崎さゆり, 清野宏. 「間葉系細胞による免疫恒常性維持機構」『第 8 回オルソオルガノジェネシス検討会』(北海道) 2018 年 7 月 (Oral)
5. Kurashima Y., and Kiyono H. 「Mesenchymal-myeloid cell interactions in renal microenvironment for pathological fibrogenic machinery in kidney fibrosis」『第 46 回日本免疫学会学術集会』(仙台) 2017 年 12 月 (Oral)
6. Kogure Y., Kurashima Y., Kunisawa J., Arase H., and Kiyono H. 「Mesenchymal-mediated skin-specific regulatory system for the control of tissue resident mast cells」『第 46 回日本免

疫学会学術集会』(仙台) 2017 年 12 月(Oral)

7. Joo S., Suwanto A., Sato A., Sato S., Ouchida R., Yuki Y., Kurashima Y., Kawaguchi Y., Kiyono H. 「Critical role of the CCR5-CCL5 cascade for the preferential migration of HSV-2-specific effector cells to the vaginal mucosa upon intranasal immunization」『第 46 回日本免疫学会学術集会』(仙台) 2017 年 12 月(Oral)

・特別講演・招待講演

国内 (11 件)

1. 倉島洋介. 「腸管粘膜・皮膚などにおける上皮-間葉-神経系ネットワークによる末梢免疫教育機構」アステラス製薬株式会社 (茨城) 2018 年 12 月
2. Kurashima Y. 「Purinergic regulation of mast cells for symbiosis and elimination」『第 55 回日本消化器免疫学会』(福岡) 2018 年 12 月
3. Kurashima Y. 「Bringing mast cells over to our side to overcome allergy」『第 67 回日本アレルギー学会学術大会 シンポジウム 18』(千葉) 2018 年 6 月
4. 倉島洋介. 「間葉系細胞による免疫末梢教育 Mesenchymal-myeloid cell interactions in renal microenvironment for novel fibrogenic machinery in kidney fibrosis」『第 42 回日本リンパ学会』(青森) 2018 年 6 月
5. Kurashima Y. 「Mesenchymal cell-mediated local inflammatory loop in intestinal inflammation」『2nd Korea-Japan Joint Meeting on Mucosal Immunology 2018』(大阪) 2018 年 6 月
6. 倉島洋介. 「共生と排除を司る粘膜マスト細胞の研究」『第 22 回腸内細菌学会 (奨励賞受賞講演)』(東京) 2018 年 6 月
7. Kurashima Y. 「The novel roles of mast cells as a form of regulatory cells in the anti-allergic therapy」『千葉大学-UCSD 共同シンポジウム “The 2nd cMAV Symposium Tokyo” Pioneering Sciences in Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Leading to the Creation of Novel Prevention and Treatment for Immunologic and Infectious Diseases』(千葉) 2018 年 3 月
8. 倉島洋介. 「腸管粘膜免疫研究からみえてきた「多様性・派生」」『第 1 回最先端粘膜免疫学シンポジウム』(宮城) 2017 年 12 月
9. 倉島洋介. 「炎症性腸疾患における 細胞外 ATP の働き」『第 61 回日本薬学会関東支部大会』(東京) 2017 年 5 月
10. 倉島洋介. 「食物アレルギー治療における新たなマスト細胞の役割」『第 40 回日本リンパ学会』(東京) 2016 年 10 月
11. 倉島洋介. 「マスト細胞の活性化を導く炎症・アレルギー増悪化因子としての ATP」『第 20 回 Japan Purine Club ミーティング』(東京) 2016 年 6 月

国外 (5 件)

1. Kurashima Y. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of allergy」『3rd Annual Symposium for the Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development』(San Diego, US) 2019 年 2 月
2. Kurashima Y. 「Mesenchymal cells as a peripheral educator for immunity and inflammation」『1st Gut Bio Society Workshop』(Seoul, Korea) 2018 年 2 月
3. Kurashima Y. 「Contribution of immune-mesenchymal interactions in the local intestinal inflammation」『Asan Medical Center Seminar』(Seoul, Korea) 2018 年 2 月
4. Kurashima Y. 「Immuno-modulatory Roles of Mast Cells in Oral Immunotherapy」『1st Japan-Korea Joint Meeting on Mucosal Immunology Asan Medical Center』(Seoul, Korea) 2017 年 9 月
5. Kurashima Y. 「Mast cell and mesenchymal cell regulate immunity and inflammation」『The Inaugural Chiba University-UCSD Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines: Impact on Mucosal Diseases and Global Health』(San Diego, US) 2017 年 2 月

〔図書〕(計 2 件)

1. 籠谷領二, 倉島洋介, 清野宏. 免疫生物学 (原書第 9 版), 南江堂, 2019 年 3 月
2. Kurashima Y, Kiyono H. Chronic Inflammation; Mechanisms and Regulation (Editors: Miyasaka, Masayuki, Takatsu, Kiyoshi) Physiological and Pathological Inflammation at the Mucosal Frontline, Springer, 2016 年 11 月

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 線維化関連分子に対する抗体およびその医療応用
発明者: 倉島 洋介, 清野 宏 (東京大学)
権利者: 同上

番号：特開 2018-90524
出願年：2016 年
国内外の別：国内・国外

〔その他〕

Kurashima Y, Establishing a novel and innovation treatment for allergic and inflammatory disease in mucosa, Impact, 2018(10), 2018, 63-65 doi: 10.21820/23987073.2018.10.63

6. 研究組織

※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。