

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05082

研究課題名(和文)炎症抑制能をもつ新規腸管上皮内細胞の遺伝子制御の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the genetic regulation of novel intestinal intraepithelial lymphocytes with anti-inflammatory properties

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) 18,500,000円

研究成果の概要(和文):腸管上皮における免疫細胞においては特にCD4CD8aaT細胞という抑制系のT細胞が存在することが明らかになった。さらにTregから一部分化することをこれまでに示したが、その細胞分化に重要な因子については不明であった。CD4CD8aa細胞における分化に必要な特徴的な遺伝子と同一し、関連性を証明した。さらにヒト炎症性腸疾患患者においても同じ遺伝子群がCD4CD8aaT細胞に関与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで腸管上皮におけるCD4 T細胞については研究が少なかった。マウスモデルにおいてはCD4CD8aa T細胞という腸管上皮内にしか存在しないユニークな細胞集団が腸管上皮のホメオスタシス維持に重要であることが示されており、炎症抑制に同細胞を誘導することが重要であるとされる。しかしこれまで分化に必要な因子、メカニズムは不明であった。そこで、今回同細胞を誘導するのに重要な因子を見つけることで、今後の炎症性腸疾患治療の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文):We found that immune cells in the intestinal epithelium contain suppressor T cells, CD4CD8aaT cells in particular. We have also shown that CD4CD8aa T cells differentiate in part from Treg cells, but the factors that are important for their differentiation are unknown. We identified the key genes to develop CD4CD8aa T cells in intraepithelial compartment. In addition, we showed that the same gene is involved in CD4CD8aaT cells in human patients with inflammatory bowel disease.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎、クローン病は、患者の遺伝的要因、環境要因、免疫学的要因の複合であることが分かってきているが、根本的な治療法は確立されておらず、発症原因の解明と新規治療法の開発が急務とされている。腸管の炎症には、転写因子 T-bet により分化制御される Th1 細胞および転写因子 ROR $\gamma$ t により分化制御される Th17 細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。申請者は、腸炎の進行に伴い、腸管粘膜固有層に存在する T 細胞が、Naïve T 細胞から Th17 細胞、Th17 細胞から Th1 細胞様の性質を併せ持つ Th17/Th1 細胞、さらには Th17/Th1 細胞から exTh17-Th1 様細胞へと表現系を変化させ、最終分化細胞である exTh17-Th1 様細胞が腸管炎症誘導の根幹的役割を果たしている事を報告した (Sujino T. *Gastroenterology* 2011)。腸管粘膜における免疫担当細胞は粘膜固有層リンパ球のみならず腸管上皮間リンパ球 (Intraepithelial Lymphocyte, IEL) も存在する。しかし、粘膜固有層の T 細胞の研究に比して、IEL の分化制御、腸管恒常性や疾患への寄与は十分に研究が進んでいないと言いがたく、さらに詳細な研究が求められている。これまでの研究で、IEL は誘導性腸炎に対し抑制的に働くことが報告されているが (Edelblum KL. *Gastroenterology* 2015)、IEL 内には Foxp3 を発現する制御性 T 細胞 (peripheral Treg; pTreg) は少数であり、pTreg 以外の細胞サブセットが炎症抑制能に寄与していると考えられる。IEL 内には TCR $\gamma$  $\delta$  T 細胞や、CD4CD8 $\alpha$  (CD4<sub>IEL</sub>) T 細胞といった粘膜固有層とは全く異なる細胞集団が存在する。さらに近年 CD4<sub>IEL</sub> 細胞は潰瘍性大腸炎、クローン病において減少していることが知られている (Sarrabayrouse G. *Plos Path.* 2015)。

申請者らは近年、CD4<sub>IEL</sub> の一部が粘膜固有層に存在する Foxp3<sup>+</sup> pTreg から分化することを明らかにした (Sujino T. *Science*. 2016)。さらに、Foxp3<sup>+</sup> pTreg から CD4<sub>IEL</sub> への分化には Thpok (zbtb7b) の減弱と T-bet, RUNX3 の上昇といった転写因子の発現変化 (Mucida D. *Nature Immunology*. 2013, Reis BR. *Nature Immunology*. 2013, *Immunity* 2015) および IRF8 依存性樹状細胞サブセットのサポートが必要であることを示した (Daria E. *Nature Immunology*. 2016, Ruda KM. *Immunity*. 2016)。また、無菌マウスでは Foxp3<sup>+</sup> pTreg から CD4<sub>IEL</sub> への分化が有意に障害されており、CD4<sub>IEL</sub> の分化には腸内細菌が重要であることが示唆された。我々はさらに、OT-II-Rag1 background マウスを用い、経口 OVA 投与による惹起される小腸炎が、CD4<sub>IEL</sub> によって抑制されることを報告した。すなわち、CD4<sub>IEL</sub> は腸管上皮間で pTreg 様の制御性細胞として働き、腸管恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

### 2. 研究の目的

炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病) は慢性消化管炎症をきたす疾患であり、本邦を含むアジア諸国でも増加の一途を辿っている。炎症性腸疾患の発症原因は未だ不明であるが、腸管粘膜に存在する免疫細胞、特に T 細胞の過剰な活性化が疾患の引き金になっていると考えられている。腸管粘膜には炎症惹起に関わる helper T 細胞と炎症抑制に関わる制御性 T 細胞が存在しており、これら相反する性質を有する T 細胞のバランスが腸管免疫の恒常性に重要である。近年、申請者らは腸管上皮間に存在し、炎症抑制的に働く CD4CD8 $\alpha$  陽性 T (CD4<sub>IEL</sub>) 細胞を同定し、その分化制御機構を明らかにした (Sujino T et al. *Science* 2016)。本研究では、CD4<sub>IEL</sub> のさらに詳細な制御機構を明らかにするとともに、腸管恒常性、および炎症性腸疾患病態における本細胞の役割について検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では、CD4<sub>IEL</sub> の分化制御機構についてさらに詳細な研究を行う。

#### 方法 3-1 転写因子 ROR $\gamma$ t の CD4<sub>IEL</sub> 分化、機能における役割

腸内細菌の代謝物 (短鎖脂肪酸) は大腸粘膜における pTreg の誘導に重要であることは良く知られている。一方、小腸粘膜では、腸内細菌依存性の pTreg と腸内細菌非依存性で食餌抗原依存性に制御される pTreg の 2 種の異なるサブセットが存在している (Kim KS, *Science* 2016)。興味深いことに、大腸、小腸両方の粘膜において、腸内細菌依存性の pTreg サブセットは転写

因子 ROR $\gamma$ t を発現しており、腸内細菌依存性制御性 T 細胞の共通のマーカーであると言える。申請者の研究で、CD4<sub>IEL</sub> は小腸粘膜において腸内細菌依存性に pTreg から分化する事を報告したが、CD4<sub>IEL</sub> における ROR $\gamma$ t の発現、および分化制御における同因子の役割は不明である。本研究では、腸管における CD4<sub>IEL</sub> 分化には腸内細菌を抗原とする ROR $\gamma$ t 陽性 pTreg が必要であるという仮説を立て、CD4<sub>IEL</sub> 分化と ROR $\gamma$ t の関係性について検討を行う。

#### 方法 3-2 ヒト腸管上皮付着菌における CD4CD8 $\alpha\alpha$ 細胞誘導の検討

マウス研究では *Lactobacillus Reuteri* の増加が Ahr リガンドを産生することで CD4<sub>IEL</sub> 細胞誘導に寄与することが報告されており、ヒト疾患でも同様に分化に関与する腸内細菌が付着菌として存在する可能性がある。そこで CD4<sub>IEL</sub> 細胞が増加するとされる炎症性腸疾患患者の寛解期の腸内細菌叢の検討と健常者より粘膜付着菌を採取し無菌マウスに移入することで CD4<sub>IEL</sub> 細胞誘導に必要な腸内細菌の探索を行った。

#### 4. 研究成果

##### 研究 1：転写因子 ROR $\gamma$ t の CD4<sub>IEL</sub> 分化、機能における役割

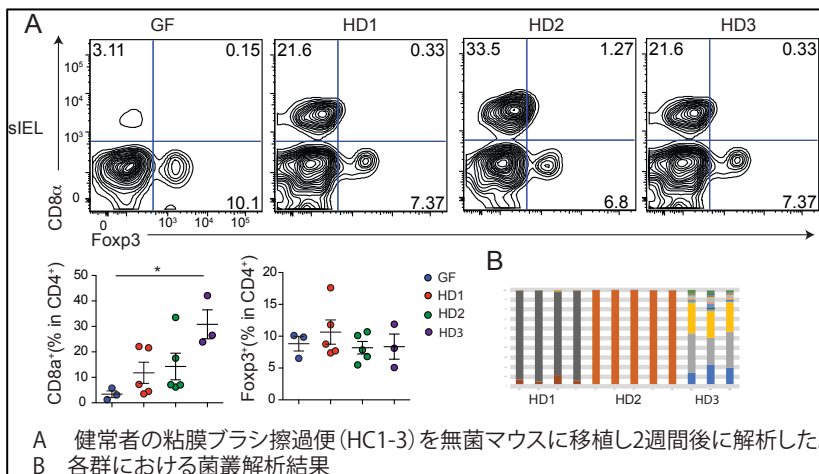
*Rorgt<sup>sfp/+</sup>*、*Rorgt<sup>sfp/sfp</sup>* マウスの小腸上皮より IEL を分離し、フローサイトメトリーにより CD4<sub>IEL</sub> の細胞数の解析をおこなった。*Rorgt<sup>sfp/sfp</sup>* マウスにおいては Ror $\gamma$ t 陽性 pTreg は減少したが、CD4<sub>IEL</sub> の割合は *Rorgt<sup>sfp/+</sup>* マウスと比較し有意な差はなかった。本結果より pTreg が CD4<sub>IEL</sub> 細胞の前駆細胞ではないことが判明した。シングルセルの解析により腸管内 CD4<sub>IEL</sub> は腸管内において Treg から分化するのではなく、所属リンパ節において Treg のプレカーサーよりクロマチン修飾が開始され、腸管内で完成することを確認し報告した (London M, Sujino T, Mucida D. *Nature Immunology* 2021)。

##### 研究 2：ヒト腸管上皮付着菌における CD4<sub>IEL</sub> 細胞誘導の検討

マウス研究では *Lactobacillus* の増加が CD4<sub>IEL</sub> 細胞誘導に寄与することが報告されており、ヒト疾患でも分化に関与する可能性について検討するため、潰瘍性大腸炎寛解時における *Lactobacillus* の解析を行った。2012 年より当院にて採取された糞便を 16s RNA-TLRP 法で再解析した。潰瘍性大腸炎活動期においては *Lactobacillus* の減少を認めるものの、寛解期には増加していることを確認した。さらに *L. reuteri* などが増加していることも確認した。

炎症性腸疾患特有の上皮付着菌を抽出する目的で炎症性腸疾患患者より生検組織を取得し、5000 倍までのズームが可能な走査電顕 (キーエンス社製 VHX-D500)、免疫染色、16sRNA を利用し腸管上皮付着菌を検討した。特定の腸管上皮は確認されなかったが、形態学的に特徴的な所見クリプトの fission, fusion 異常をとらえ報告した (Nomura N, Sujino T. *Digestive Disease and Science* 2020)。腸内細菌の CD4<sub>IEL</sub> 細胞誘導能を検討する目的で、健常者 Healthy control (HC) 3 人を内視鏡施行時に上皮内粘膜をブラシにて擦過し、無菌マウスに投与後に腸管内免疫細胞を検討した。無菌マウスと比較し CD4<sub>IEL</sub> が HC3 において有意に増加した。HC3 で検出され

た 2 菌が誘導能を有している可能性が示唆された。



A 健常者の粘膜ブラシ擦過便 (HC1-3) を無菌マウスに移植し2週間後に解析した。  
B 各群における菌叢解析結果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kiyohara Hiroki, Sujino Tomohisa, Teratani Toshiaki, Miyamoto Kentaro, Arai Mari Mochizuki, Nomura Ena, Harada Yosuke, Aoki Ryo, Koda Yuzo, Mikami Yohei, Mizuno Shinta, Naganuma Makoto, Hisamatsu Tadakazu, Kanai Takanori	4. 巻 7
2. 論文標題 Toll-Like Receptor 7 Agonist Induced Dermatitis Causes Severe Dextran Sulfate Sodium Colitis by Altering the Gut Microbiome and Immune Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 135 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2018.09.010	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 Okabayashi Shinji, Kobayashi Taku, Sujino Tomohisa, Ozaki Ryo, Umeda Satoko, Toyonaga Takahiko, Saito Eiko, Nakano Masaru, Tablante Maria Carla, Morinaga Shojiroh, Hibi Toshifumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Steroid-refractory extensive enteritis complicated by ulcerative colitis successfully treated with adalimumab	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 535 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5217/ir.2017.15.4.535	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, KANAI Takanori	4. 巻 40
2. 論文標題 腸内細菌叢と免疫の関わり	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nihon rinsyou meneki	6. 最初と最後の頁 408 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2177/jsci.40.408	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 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 1
2. 論文標題 Characteristics of the Mucosal Surface on Scanning Electron Microscopy in Patients with Remitting Ulcerative Colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1~6
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 Teratani Toshiaki, Mikami Yohei, 、Sujino Tomohisa, Suda Wataru, Hattori Masahira, Matsui Minoru, Okada Takaharu, Okano Hideyuki, Inoue Masayuki, Yada Toshihiko, Kitagawa Yuko, Yoshimura Akihiko, Tanida Mamoru, Tsuda Makoto, Iwasaki Yusaku, Kanai Takanori	4. 巻 585
2. 論文標題 The liver brain gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 591~596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2425-3	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 Koda Yuzo, Nakamoto Nobuhiro, Chu Po-Sung, Ugamura Aya, Mikami Yohei, Teratani Toshiaki, Tsujikawa Hanako, Shiba Shunsuke, Taniki Nobuhito, Sujino Tomohisa, Miyamoto Kentaro, Suzuki Takahiro, Yamaguchi Akihiro, Morikawa Rei, Sato Katsuaki, Sakamoto Michiie, Yoshimoto Takayuki, Kanai Takanori	4. 巻 129
2. 論文標題 Plasmacytoid dendritic cells protect against immune-mediated acute liver injury via IL-35	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3201~3213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI125863	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 Yoshimatsu Yusuke, Naganuma Makoto, Sugimoto Shinya, Tanemoto Shun, Umeda Satoko, Fukuda Tomohiro, Nomura Ena, Yoshida Kosuke, Ono Keiko, Mutaguchi Makoto, Nanki Kosaku, Mizuno Shinta, Mikami Yohei, Fukuhara Kayoko, Sujino Tomohisa, Takabayashi Kaoru, Ogata Haruhiko, Iwao Yasushi, Kanai Takanori	4. 巻 101
2. 論文標題 Development of an Indigo Naturalis Suppository for Topical Induction Therapy in Patients with Ulcerative Colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 492~498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000501152	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 筋野智久
2. 発表標題 skin inflammation induce gut inflammation by altering host microbe and immune system
3. 学会等名 免疫学会 2019
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------