

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07174

研究課題名(和文)上皮細胞による腸管恒常性維持の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of intestinal homeostasis regulated by epithelial cells

研究代表者

香山 雅子 (KOHYAMA, Masako)

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・准教授

研究者番号：70311339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非免疫細胞である腸管上皮細胞におけるMHC II分子の発現やその機能を制御するCD74分子の発現が無菌マウスや抗生物質の投与により変化し、CD74分子欠損マウスにおいて腸管ダメージ(放射線照射による腸管損傷モデル、DSS誘導性腸炎モデル)に対する感受性が亢進することが明らかとなった。さらに、小腸上皮細胞特異的にCD74分子を欠損しているマウスを作成し、腸管ダメージにおけるCD74分子の役割を解析した。その結果、小腸上皮細胞の細胞表面に発現するCD74分子が腸管ダメージにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腸内フローラとアレルギーや自己免疫疾患の関係が指摘され、その作用機序の解明に注目が集まっている。本研究では腸内細菌叢の変化によってその発現が制御される分子を同定し、腸管ダメージにおける役割の重要性を示した。この結果はこの分子をターゲットとした治療や、新薬開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The expression of MHC II molecules in intestinal epithelial cells and the expression of CD74 molecules that regulate MHC II molecules functions in intestinal epithelial cells are altered by different types of intestinal bacteria, and CD74 deficient mice show increased susceptibility to intestinal damage (irradiation-induced intestinal damage model and DSS-induced intestinal inflammation model). Furthermore, we generated mice lacking CD74 molecules specifically in small intestinal epithelial cells and analyzed the role of CD74 molecules in intestinal damage. The results revealed that CD74 molecules expressed on the cell surface of small intestinal epithelial cells play an important role in intestinal damage.

研究分野：免疫学

キーワード：腸管免疫 上皮細胞 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮細胞は栄養や水分の吸収という機能とともに、病原性の腸内細菌から腸管の組織を守り、腸内細菌や食物抗原に対する過剰な免疫応答を回避するための粘膜バリアを構築する。また、上皮細胞は腸内細菌と粘膜固有層に存在する免疫担当細胞の間に存在し、腸管免疫系を制御している。この腸管免疫系の最大の特徴は、病原性細菌など有害な抗原には免疫応答を発動し排除する一方で、食物抗原、共生細菌など無害な抗原には反応しないような制御(経口免疫寛容)する機構が備わっていることである。この免疫バランス制御の破綻が、食物アレルギーや炎症性腸疾患などの疾患発症の主因と考えられている。例えば、出生時から無菌状態で飼育したマウス(無菌マウス)では、経口免疫寛容も起こりにくくなっていることが知られており、共生細菌の重要性は指摘されている。このように共生細菌と宿主の相互作用は腸管免疫系の恒常性維持に重要であると考えられているが、その分子機構には不明な点が多い。腸内細菌と粘膜固有層間に存在する上皮細胞は数日で再生をくりかえすダイナミックな組織である。上皮細胞の元となっている腸管上皮細胞は、永続的な自己複製能とすべての腸管上皮細胞への分化能を有する細胞であるが、その詳細なる分子機構さらには上皮細胞の自己複製能の維持や分化に及ぼす腸内細菌の役割についての解析は進んでいない。

2. 研究の目的

近年腸内細菌叢の乱れ(攪乱; dysbiosis)が様々な疾患に関連することが指摘され、細菌叢を制御することで細菌叢腸管恒常性維持する試みが盛んである。本研究では腸管上皮細胞に発現する MHC II 及び CD74 の恒常性維持に於ける役割を腸内細菌叢との関わりを中心に明らかにし、腸管上皮細胞の機能を制御することで腸管のバリア機能の破綻によって生じる様々な腸疾患の予防や治療の可能性を模索する。着目している分子は、近年のゲノムワイド関連解析(GWAS)より微生物叢が影響を与える多くの疾患の感受性に関連する遺伝子の一つであり、かつ特定の MHC II を持つ人が特定の腸疾患になりやすいなどその重要性は認識されているが、これまで腸管上皮細胞における MHC II 及び CD74 分子の機能については研究されてはいない。申請者はこれらの分子が上皮細胞で高発現している事に着目し、これらの分子の上皮細胞における役割を明らかにする事で、腸管の恒常性維持機構の解明のみならず、細菌叢の制御の可能性を模索する。

3. 研究の方法

- 1)腸管上皮細胞における CD74 及び MHC II 分子の役割を生体内において明らかにするために、上皮特異的にこれらの分子を欠損するマウスを作成する。具体的には申請者がすでに樹立した CD74 分子が LoxP 配列に挟まれている CD74 f/f マウス、及び MHC II 分子が LoxP 配列に挟まれている MHC f/f マウスを Villin-cre マウスと掛け合わせ、腸管上皮細胞特異的に MHC II 分子あるいは CD74 を欠損させる(MHC II cKO マウス、CD74 cKO マウス)。
- 2)上記で作成したマウスを用いて、MHC II 及び CD74 分子の機能的に異なる種々の上皮細胞(吸収上皮、胚細胞、Paneth 細胞など)分化への影響を組織免疫化学法にて解析する。形態変化は HE 染色、各種上皮細胞の分化への影響は ALP 染色、PAS 染色、などで評価する。また、粘膜バリアの形成(糖衣の形成や、抗菌ペプチドの産生についても検討する。
- 3)腸管恒常性維持への役割の評価の一つとして小腸と大腸にダメージを人為的に与え、MHC II

及び CD74 分子の腸管における役割を検討する。具体的には、小腸にはインドメタシン投与、放射線照射によるダメージを、大腸には DSS 投与によるダメージを与える。そして体重変化、死亡率、及び組織免疫法にて形態変化を指標に、これらの分子の役割を検討する。

4. 研究成果

腸管上皮細胞に発現する MHC II 分子の役割と調べるために、作成した MHC II 分子を小腸上皮細胞でのみ欠損するマウス MHC II f/f-Villin-cre (MHC II cKO) マウスを用いて経口免疫寛容への影響を調べた。その結果、MHC II 欠損マウスでは経口免疫寛容が成立しにくくなることが判明した。さらに経口免疫寛容誘導マウスの血清のトランスファーによって

免疫寛容は誘導でき(図 1)、血清中の MHC II 分子を除くことによってこの免疫寛容が成立しなくなることも明らかとなった。食物抗原などの外来抗原と最初に接するバリアである小腸上皮細胞から分泌される MHC II 分子が免疫寛容に重要な役割を果たしている事が示された。

次に小腸上皮細胞に発現する CD74 分子の機能を調べるために、まずその発現のパターンおよび腸内細菌叢の影響を検討した。B 細胞と同様に小腸上皮細胞は CD74 を高発現しているが、B 細胞とは異なり細胞表面上にその多くは発現していることが明らかとなった(図 2-a)。さらに上皮細胞における CD74 の発現は抗生物質投与によって

作成した無菌マウス(GF)では著しく低下するが、腸粘膜固有層リンパ球では変化しなかった(図 2-b)。したがって上皮細胞における CD74 分子の発現は、腸内細菌によって制御されて、リンパ球とは異なる制御を受けている事が明らかとなった。次に、作成した小腸上皮細胞でのみ欠損するマウス CD74 f/f-Villin-cre マウス (CD74

cKO)に、放射線照射あるいはインドメタシン投与による腸管損傷の系を用いて、体重変化および生存率を指標に検討した。その結果、腸管損傷に対する感受性が CD74 cKO マウスで高くなっている事が明らかとなった(図 3-a)。腸管ダメージが亢進している原因を同定するために、

上皮細胞の増殖能を Ki67 染色で検討した。その結果野生型マウスに比べて、細胞の増殖が低下していることが明らかとなった(図 3-b)。さらに粘膜保護の機能に関するシクロオキシゲナーゼ(COX-1)の発現を調べてみたところ、その発現が低下していることも明らかとなった(図 4)。従って、細胞表面に発現する CD74 分子が小腸上皮細胞の増殖や機能の制御を担い、腸管損傷からの修復に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

図1 MHC II分子を小腸上皮細胞で欠損しているマウスにおいては経口免疫寛容の誘導が阻害される

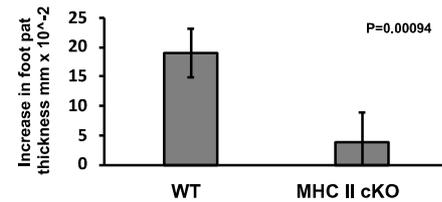


図2 小腸上皮細胞は腸管表層にCD74を高発現し、その発現は無菌マウスにおいて低下する

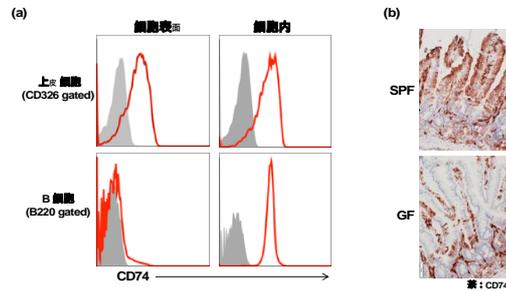


図3 (a) 放射線照射による腸管損傷実験 (b) Ki67染色による細胞増殖能の比較

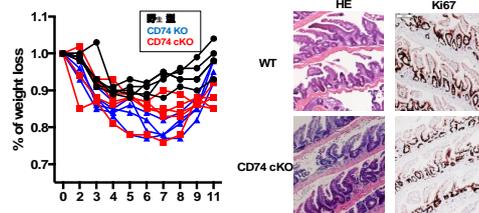
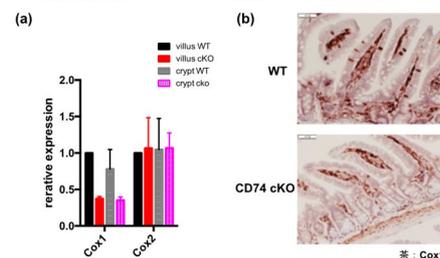


図4 小腸上皮細胞におけるCOX1の発現はCD74cKOで低下する



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kohyama Masako, Suzuki Tatsuya, Nakai Wataru, Ono Chikako, Matsuoka Sumiko, Iwatani Koichi, Liu Yafei, Sakai Yusuke, Nakagawa Atsushi, Tomii Keisuke, Ohmura Koichiro, Okada Masato, Matsuura Yoshiharu, Ohshima Shiro, Maeda Yusuke, Okamoto Toru, Arase Hisashi	4. 巻 35
2. 論文標題 SARS-CoV-2 ORF8 is a viral cytokine regulating immune responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 43～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac044	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 Liu Y, Soh WT, Kishikawa JI, Hirose M, Nakayama EE, Li S, Sasai M, Suzuki T, Tada A, Arakawa A, Matsuoka S, Akamatsu K, Matsuda M, Ono C, Torii S, Kishida K, Jin H, Nakai W, Arase N, Nakagawa A, Matsumoto M, Nakazaki Y, Shindo Y, Kohyama M, et al.	4. 巻 184
2. 論文標題 An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 3452-3466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2021.05.032	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 Sakoguchi A, Saito F, Hirayasu K, Shida K, Matsuoka S, Itagaki S, Nakai W, Kohyama M, Suenaga T, Iwanaga S, Horii T, Arase H.	4. 巻 548
2. 論文標題 Plasmodium falciparum RIFIN is a novel ligand for inhibitory immune receptor LILRB2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 167-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.02.033.	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 Matsumoto Y, Kishida K, Matsumoto M, Matsuoka S, Kohyama M, Suenaga T, Arase H.	4. 巻 534
2. 論文標題 A TCR-like antibody against a proinsulin-containing fusion peptide ameliorates type 1 diabetes in NOD mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 680-686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.019.	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 香山 雅子、荒瀬 尚	4. 巻 39
2. 論文標題 ウイルス感染による免疫応答とサイトカインストーム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 524-529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Soodgupta D, White LS, Yang W, Johnston R, Andrews JM, Kohyama M, Murphy KM, Mosammaparast N, Payton JE, Bednarski JJ.	4. 巻 29
2. 論文標題 RAG-Mediated DNA Breaks Attenuate PU.1 Activity in Early B Cells through Activation of a SPIC-BCLAF1 Complex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 829-843.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.026.	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 Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H.	4. 巻 511
2. 論文標題 Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27 free heavy chain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 862-868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.120.	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 Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Fc R11IA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 303-314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz010.	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 Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H.	4. 巻 511
2. 論文標題 Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27 free heavy chain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 862-868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.120.	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 Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Fc RIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz010.	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 Shishido T, Kohyama M, Nakai W, Matsumoto M, Miyata H, Suenaga T, Arase H.	4. 巻 509
2. 論文標題 Invariant chain p41 mediates production of soluble MHC class II molecules.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 216-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.12.106.	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 Kayama H, Kohyama M, Okuzaki D, Motooka D, Barman S, Okumura R, Muneta M, Hoshino K, Sasaki I, Ise W, Matsuno H, Nishimura J, Kurosaki T, Nakamura S, Arase H, Kaisho T, Takeda K.	4. 巻 115
2. 論文標題 Heme ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis through providing intestinal macrophages with noninflammatory profiles.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 8418-8423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1808426115.	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 香山雅子	4. 巻 26
2. 論文標題 脾臓や肝臓の組織マクロファージとその分化制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 192-196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masako Kohyama, Tatsuya Suzuki, Toru Okamoto, Hisashi Arase
2. 発表標題 SARS-CoV-2 ORF8 is a viral cytokine involved in lung inflammation
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihito Sakoguchi, Fumiji Saito, Kouyuki Hirayasu, Masako Kohyama, Shiroh Iwanaga, Toshihiro Horii, Hisashi Arase
2. 発表標題 Immune activating receptors specific to Plasmodium falciparum-infected red blood cells
3. 学会等名 第13回寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadahiro Suenaga, Yuta Shimizu, Masako Kohyama, Hideki Yorifuji, Jin Hui, Noriko Arase, Hisashi Arase
2. 発表標題 Fc RIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masako Kohyama, Sumiko Matsuoka, Tatsuya Shishido, Yuta Shimizu, Hisashi Arase
2. 発表標題 CD74 isoform p41 regulates soluble MHC class II production
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hui Jin, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki, Hisashi Arase
2. 発表標題 TSHR / MHC class II complexes are involved in the pathogenesis of Graves' disease
3. 学会等名 第18回あわじ感染と免疫フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihito Sakoguchi, Fumiji Saito, Kouyuki Hirayasu, Kyoko Shida, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Shiroh Iwanaga, Hisashi Arase
2. 発表標題 RIFINs of Plasmodium falciparum target multiple inhibitory receptors for immune evasion
3. 学会等名 第18回あわじ感染と免疫フォーラム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 英輝、大村 浩一郎、荒瀬 規子、香山 雅子、榊原 修平、菊谷 仁、末永 忠広、三森 経世、荒瀬 尚
2. 発表標題 MHCクラス II 分子によるDNAの提示
3. 学会等名 第29 回Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸田 一輝, 香山雅子, 末永忠広, 荒瀬 尚
2. 発表標題 T細胞レセプターと同様な抗原特異性を示す抗体による新たな免疫制御機構
3. 学会等名 第28 回Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriko Muramatsu, Tadahiro Suenaga, Masako Kohyama, Hisashi Arase
2. 発表標題 Host Molecules Associating with Human Herpesvirus 6(HHV-6)
3. 学会等名 第17回あわじしま感染症・免疫フォーラム(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依藤 秀樹, 荒瀬 規子, 平野 亨, 香山 雅子, 末永 忠広, 熊ノ郷 淳, 荒瀬 尚
2. 発表標題 HLA-B27による細胞内ミスフォールド蛋白質輸送能
3. 学会等名 第5回 JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Tsuji, Koichiro Ohmura, Shuhei Sakakibara, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hitodhi Kikutani, Hisashi Arase
2. 発表標題 Recognition of DNA / HLA-class II complex by anti-DNA antibodies from SLE patients
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hui Jin, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki, Hisashi Arase
2. 発表標題 TSHR-stimulating autoantibody production by TSHR / MHC class II complexes
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Kishida, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase
2. 発表標題 Regulation of T cell response by TCR-like antibodies
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya Shishido, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase
2. 発表標題 Deletion of invariant chain in adult mice resulted in autoantibody production
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yushi Matsumoto, Kazuki Kishida, Sumiko Matsuoka, Masako Koyama, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase
2. 発表標題 Regulation of diabetogenic T cell response by antibodies against peptide-MHC class II complex
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihito Sakoguchi, Fumiji Saito, Kouyuki Hirayasu, Kyoko Shida, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Shiroh Iwanaga, Toshihiro Horii, Hisashi Arase
2. 発表標題 RIFINs of Plasmodium falciparum target multiple inhibitory receptors for immune evasion
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 可溶性MHCクラス 分子の産生誘導組成物、可溶性MHCクラス 分子の産生誘導キット、可溶性MHCクラス 分子の産生細胞、可溶性MHCクラス 分子の産生細胞の製造方法および可溶性MHCクラス 分子の製造方法	発明者 荒瀬 尚、伊勢 雅子、穴戸 達也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-228986	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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