

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07184

研究課題名(和文) 上皮-免疫細胞間の接着を中心とする腸管恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Gut homeostasis regulated by epithelia-immune cell interaction

研究代表者

内藤 拓 (Naito, Taku)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：10568728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抑制的なヒストン修飾を司るEedのT細胞、特に腸上皮間リンパ球(IEL)の分化や動態における役割を検討した。その結果、マウスにおいてEed欠損によりCD4+ CD8+ IELの分化が促進される傾向が見られた。またin vitroの系では、細胞接着分子の存在下でCD4+ CD8+ IELの分化が促進され、Eedのヘテロ欠損により増強された。さらにEed欠損はCD8+ IELに比べて、CD4+ T細胞の分化・生存に顕著な障害を及ぼした。これらより腸管の免疫学的恒常性の維持に細胞接着因子とエピジェネティックな機構の相互作用が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管は無害・有害を問わず恒常的に異物にさらされており、その恒常性の維持は個体の生存にとって重要である。腸管恒常性維持を担う分子機構の解明は、炎症性腸疾患(IBD)の新規治療作用点の同定につながることを期待される。本研究では従来からIBDの治療標的となってきた細胞接着分子がエピジェネティックな分子機構を介して腸管恒常性維持を制御していることを示唆しており、IBDの新たな治療標的候補としての抑制的ヒストン修飾の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The role of Eed, a mediator of repressive histone modification, in differentiation and maintenance of intraepithelial lymphocytes (IELs) was examined. Loss of Eed in mouse resulted in the trend of increased CD4+ CD8+ IEL. In vitro culture system identified a cell adhesion molecule as an enhancing factor of CD4+ CD8+ IEL differentiation, which was further enhanced by Eed heterozygous deletion. In addition, loss of Eed affected differentiation/survival of CD4+ but not much of CD8+ IELs. These results suggested that the interaction between cell adhesion molecule and epigenetic machinery plays a role in the gut homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 エピジェネティクス 腸上皮間リンパ球

1. 研究開始当初の背景

腸管免疫系は食物や常在細菌には寛容的に、病原体に対しては排除的に応答するという精妙なバランスの上で機能しており、その破綻は炎症性腸疾患などに直結する。近年本邦においても食生活等の変化に伴って、炎症性腸疾患や食物アレルギーなど腸管における免疫寛容の破綻が関係する疾患の有病率が増加傾向にある。したがって腸管における免疫寛容や抑制的な免疫応答の仕組みを解明することは、これらの疾患に対する新たな治療法の開発や、患者の「生活の質」の改善につながると期待される。腸管上皮内リンパ球(IEL)は腸管腔に接する最前線に位置し、病原体やストレスを受けた細胞の除去、そして上皮層の修復促進などの多面的な働きを通して、制御性 T 細胞 (Treg) とともに腸管免疫のバランスを維持している。組織常在性メモリー T 細胞と同様に、IEL の分化や機能は、上皮層という「場」により多くを規定されていると予想される。上皮層における IEL 制御機構としてはサイトカインやケモカイン、細胞接着因子が明らかにされているが、それらの機能連関や作用機序の詳細は必ずしも明らかでない。炎症性腸疾患の多くは難病であり、既存の治療法で必ずしも十分な結果を得られない。腸管免疫恒常性を維持する分子メカニズムのさらなる解明は、新たな切り口の治療法の開発、そして最終的には患者の生活の質の向上につながることを期待される。そのコンテキストにおいて、IEL の分化や動態を制御するメカニズムの解明は新たな突破口となることが考えられた。

エピジェネティック制御因子である Eed は抑制的ヒストン修飾である H3K27 のメチル化を触媒するのに必須であり、Eed の T 細胞特異的欠損は *in vitro* で CD4⁺ T 細胞からの TGF β 依存的な CD4⁺ CD8⁺ IEL (DP- IEL) の分化を促進した。また T 細胞特異的 Eed 欠損マウスでは恒常的に腸間膜リンパ節の腫大が見られ、また腸管上皮の過形成や脱肛も高頻度に観察された。DP- IEL は免疫抑制的に機能する T 細胞サブセットであることから、Eed は DP- IEL の分化や動態の制御を介して腸管恒常性を維持していることが予想された。

2. 研究の目的

エピジェネティック制御因子である Eed は核内での転写制御だけでなく、細胞質でインテグリンとも相互作用する。申請者の従来のデータは、Eed が上皮細胞と IEL のクロストークを、核と細胞質のクロストークに変換することで、IEL を多面的に制御するキー分子であることを示唆した。そこで本研究は Eed を切り口に、腸管上皮と IEL の細胞間接着の持つ可能性に着目し、腸管免疫研究に新たな視点とツールをもたらすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 培養系を用いた IEL 分化機序の研究

DP- IEL 分化における細胞接着の役割の詳細を検討するために、*in vitro* 培養系を用いた。具体的には野生型マウスの脾臓よりナイーブ CD4⁺ T 細胞を単離し、抗 CD3/抗 CD28 抗体および TGF β 存在下で活性化し、DP- IEL へと誘導した。その際腸管で発現している細胞接着因子 Mad-CAM の有無について検討した。さらには生体内での DP- IEL 分化の様相も考え、1 段階目と 2 段階目で刺激条件を変化させる系についても検討した。

(2) *in vivo* における IEL の動態解析と Eed の役割の解明

IEL の動態における Eed の役割について解明するため、複数のアプローチを試みた。具体的には、(A) 免疫不全マウスなどへの養子移入、(B) Bcl2 トランスジェニック、および Cre レポーターノックインの導入により、Eed が *in vivo* での IEL 動態に及ぼす影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 系を用いた DP- IEL 分化促進因子の探索

DP- IEL の分化誘導における腸管微小環境の役割について探索することを目的として、腸管に発現する E-cadherin が DP- IEL の分化を促進するか検討を行った。In *vitro* での DP- IEL 分化は抗 CD3/抗 CD28 抗体+TGF β により誘導できるが、その効率は数%程度にとどまる。E-cadherin によりコートされたプレートを用いても、DP- IEL 産生に大きな違いは見られなかった。TGF β 刺激により T 細胞表面への発現が誘導される CD103 は E-cadherin と結合することが知られている。T 細胞が IEL 分画へとホーミングする過程を考えたとき、まず腸管関連リンパ組織においてレチノイン酸 (RA) の存在下で活性化されることにより CCR9 とともに CD103 を発現する。また DP- IEL は IEL 分画に到着後、CD4⁺ IEL から分化する。そこでこれを模する形で最初に RA 存在下で、次に数日において TGF β および E-cadherin 存在下で刺激するという 2 段階活性化のプロトコルで DP- IEL の分化誘導を試みた。その結果、従来のおよそ 2 倍の効率で DP- IEL を誘導することに成功した。また従来の方式では CD4⁺ CD8⁺ よりも CD4⁺ CD8⁺ の DP- IEL が多く誘導されていたが、2 段階活性化方式ではその比が逆転し、*in vivo* で見られる CD4⁺ CD8⁺ が優位に産生された。この結果は DP- IEL 誘導にはサイトカインなどの液性因子と共に、インテグリンを介した細胞接着も重要であることを強く示唆した。

(2) in vivo IEL 動態における Eed の役割の解明

T 細胞特異的 Eed 欠損では、腸管恒常性が乱されるという予備的な結果を得ていた。そこで IEL 動態制御における役割を検討した。Eed 欠損による腸管への T 細胞ホーミングに異常がある可能性について、野生型および T 細胞特異的 Eed 欠損型の骨髓細胞を 1:1 の割合で競合的に養子移入し、検討した。その結果、脾臓、リンパ節においては Eed 欠損 T 細胞は野生型と比較してわずかに減少していた。対照的に IEL 分画においては、Eed 欠損 T 細胞は野生型細胞に対する著明な減少が見られた。このことは Eed 欠損 T 細胞では、腸管上皮層へのホーミング、あるいはそこにおける生存に障害がある可能性が示唆された。

活性化や増殖への Eed の関与を検討するため、Eed 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Rag2 欠損マウスへと養子移入する実験も行った。野生型ナイーブ CD4⁺ T 細胞はこのような条件下で、homeostatic proliferation により増殖するが、それに対して Eed 欠損 T 細胞の場合ほとんど増殖せず、ナイーブ T 細胞の表現型を保ったままであった。さらに腸管上皮層へホーミングがする細胞もほとんど見られなかった。このことは Eed 欠損 T 細胞が活性化、細胞増殖、もしくは生存に著しい障害があり、野生型と比較した IEL 分画における減少は、その結果であることが強く示唆された。そこで T 細胞特異的 Eed 欠損マウスに、抗アポトーシス因子である Bcl2 を血球細胞特異的に発現するトランスジェニックと掛け合わせることで、腸管上皮における IEL 数が回復するか検討を行った。しかし Bcl2 により細胞死を抑制しても IEL 数の減少を回復させることはできなかった。このことから Eed 欠損 T 細胞は活性化の段階に障害があることが強く示唆された。

Eed 欠損が IEL の動態に与える影響をより詳細に検討するために、Cre 組換えタンパク質の発現により組換えが起きると tdTomato が発現するレポーターを用いて、IEL における Eed の欠損状況について検討を行った。IEL 分画のうち CD4⁺ CD8⁻ の細胞集団では tdTomato⁺ と tdTomato⁻ がほぼ半分半分であった。CD4⁺ CD8⁻ 集団より分化する DP-IEL で同様の解析を行ったところ、CD4⁺ CD8⁻ と比較して tdTomato⁺ の割合が増える傾向が観察された。このことは Eed を欠損した方が DP-IEL に分化しやすいことを示唆しており、in vitro での結果と合致した。さらに様々な T 細胞集団についても検討したところ、脾臓やリンパ節においては、CD4-Cre によりほぼ全ての T 細胞において Eed は欠損していた。しかし IEL 分画では CD4⁺ CD8⁻ の集団において、Eed 欠損の効率が半分以下に低下していることを見出した。興味深いことに CD4⁺ CD8⁻ の集団では 80%以上の細胞で Eed 欠損が起きていたことから、Eed 欠損が CD4⁺ IEL 特異的に影響を及ぼすことが強く示唆された。また脾臓の T 細胞について詳しく見たところ、CD8⁺ と比較して CD4⁺ において effector memory 表現型 (CD62L⁻ CD44⁺) を示す Eed 欠損細胞が著しく減少していることを見いだした。このことは CD4⁺ と CD8⁺ の T 細胞では、Eed はその活性化や増殖に異なる役割を果たしていることを強く示唆した。また CD4⁺ IEL における Eed 欠損効率の見かけ上の低下が、Eed 欠損による細胞死の亢進によるものであるか検討するために、Bcl2 導入遺伝子の存在下で同様の実験を行った。しかし Bcl2 の過剰発現によっても CD4⁺ IEL における Eed 欠損効率の低下はレスキューされなかった。このことから Eed が CD4⁺ IEL の生存ではなく、分化もしくはホーミングに効いている可能性が支持された。

これらの解析より、Eed が in vivo においても DP-IEL の分化を抑制している可能性が強く示唆された。また CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞において、活性化や増殖/生存に Eed が異なる役割を果たしていることを示唆する結果を得た。これらのことから Eed を含む PRC2 複合体を標的とした介入により、DP-IEL 誘導促進を介した腸管炎症の制御や、Th1 や Th17 依存性の炎症性疾患の制御に有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuriko Tanaka, Akiko Inoue, Taku Kuwabara, Taku Naito, Motonari Kondo
2. 発表標題 Lack of SATB1 leads to Sjogren's syndrome like autoimmune manifestations in mice
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taku Naito, Yuriko Tanaka, Taku Kuwabara, Motonari Kondo
2. 発表標題 Effect of Satb1 deficiency on differentiation of CD4+ vs CD8+ SP thymocytes.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taku Kuwabara, Marii Ise, Taku Naito, Yuriko Tanaka, Motonari Kondo
2. 発表標題 Mitochondrial respiration is critical for TCR signaling via an oxidative inactivation of phosphatase
3. 学会等名 The 42nd annual meeting of the molecular biology society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuriko Tanaka, Akiko Inoue, Taku Naito, Taku Kuwabara, Motonari Kondo
2. 発表標題 Lack of SATB1 leads to Sjogren's syndrome like autoimmune manifestations in mice
3. 学会等名 52nd Annual Meeting Of The Society For Leukocyte Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤拓, 近藤元就
2. 発表標題 CD4+ CD8 + 腸上皮内リンパ球のin vitro分化におけるE-カドヘリンの影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriko Tanaka, Akiko Inoue, Taku Kuwabara, Taku Naito, Motonari Kondo
2. 発表標題 An analysis of pathophysiology of Sjogren's syndrome in SATB1 deficient mice
3. 学会等名 The 47th Annual meeting of the Japanese society for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taku Kuwabara, Fumio Ishikawa, Yuriko Tanaka, Taku Naito, Motonari Kondo
2. 発表標題 Mitochondrial transcription factor A rescues defect in T cell receptor responsiveness in SATB1 deficient mice.
3. 学会等名 The 47th Annual meeting of the Japanese society for Immunology (国際学会)
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
---------	---------