

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07898

研究課題名(和文) 腸管神経系と免疫系のクロストーク破綻による腸炎症の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of failure of collaboration between enteric neuron and immunity

研究代表者

藤村 理紗 (FUJIMURA, LISA)

千葉大学・バイオメディカル研究センター・助教

研究者番号：30376363

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)：当研究では、腸管神経過多であるNcxKOマウスを用い、神経による腸管防御機構について解析を行った。NcxKOマウスの小腸粘膜固有層(LP)では、好酸球増加とIL5発現上昇を認めた。IL5がLPにおける好酸球の誘導に関わるか調べたところ、成熟好酸球がIL5KO/NcxKOダブルKOマウスではNcxKOマウスと比較し減少した。以上から、小腸におけるIL5の高発現は、好酸球成熟に関与すると示唆された。次に、腸管神経の関与について調べたところ、免疫染色法によりIL5と神経の共局在を認めた。現在、神経特異的にIL5を欠損するnestinCre/IL5FL/NcxKOマウスを作製し解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非常に高い防御機能をもつ腸管では、上皮系・内分泌系・免疫系・神経系・腸内細菌叢が相互作用を行い恒常性を維持している。それらのバランスが崩れると、腸炎などの機能異常が起こると考えられている。近年、粘膜に存在する神経系が免疫系細胞と解剖学的に非常に近接していること、それらが相互作用を行っていて、その破綻は炎症やアレルギーの原因であると報告されているが、ごく少数である。また、近年わが国で増加傾向にある潰瘍性大腸炎やクローン病などの難治性腸疾患の発症や病態は、多大なストレスと関連があるといわれており、神経系-免疫系相互作用の解明とその破綻による腸炎の病態解明における本研究は、非常に意義がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed relation of enteric neurons (EN) and intestinal barrier using Ncx KO mice in which EN were increased. We demonstrated that eosinophils (Eo) increased in lamina propria (LP) of Ncx KO mice small intestine (SI) compared to those of WT mice. Expression of IL5 was higher in the intestinal tissues from Ncx KO than that from WT.

In order to examine whether IL5 is responsible for increased number of Eo in Ncx KO mice LP, we generated IL5 KO mice in Ncx KO background. FACS analysis revealed that mature Eo in LP was decreased in IL5/Ncx double KO mice compared to those of Ncx KO mice. As a result, the total Eo was decreased in double KO mice. These data indicated that high amount of IL5 expression in SI is responsible for mature Eo generation in Ncx KO mice. To elucidate that EN could produce IL5, Immunohistology revealed that EN express IL5. We are currently investigating the mechanism of IL5 production from EN and biological significance of increased number of Eo in Ncx KO mice.

研究分野：胚工学

キーワード：腸管神経 好酸球 IL5 腸炎

1. 研究開始当初の背景

近年、腸における免疫系や腸内細菌叢の異常は、難治性腸疾患などの病態に影響を及ぼすことが報告され、腸研究の重要性が非常に高まっている。一方で、腸管は、第二の脳と形容されるほどに神経が発達しており、腸管神経が、蠕動運動ばかりでなく、ストレス応答やホルモン分泌に重要であると報告されている。しかし腸管神経の機能についての研究・報告は少なく、腸神経異常を主眼とした疾患の病態解明および治療法探索は喫緊のテーマである。

申請者らは、腸管における神経系の機能を明らかとするために、腸管神経が過剰に存在する遺伝子組換えマウス(Ncx ノックアウト(KO))を用いて解析を行い(Ncx は転写因子であり、胎生期の神経堤細胞由来の腸管神経に発現している。NcxKO マウスは、生後2週までに起こる腸管神経のアポトーシス異常から結果的に野生型(Wild Type: WT)と比較して約1.5倍の腸管神経が存在する)、腸管神経が腸上皮や腸内細菌叢に影響を与えていること、それらの関係破綻は腸炎の病態に影響を及ぼすことを明らかとしてきた。

一方で、粘膜に存在する神経系が、免疫系細胞と解剖学的に非常に近接していること、それらが相互作用を行っていて、その破綻は炎症やアレルギーの原因であると報告されているが、ごく少数である。また、近年わが国で増加傾向にある潰瘍性大腸炎やクローン病などの難治性腸疾患の発症や病態は、多大なストレスと関連があるといわれており、神経系-免疫系相互作用の解明とその破綻による腸炎の病態解明における研究は、重要である。申請者らは、

- (1) 腸管神経系と免疫系細胞がどのような相互作用を行っているか
- (2) (1)における相互作用が、炎症性腸疾患の発症・病態にどのように影響を与えるのかを「問い」とし、研究を進めている。

2. 研究の目的

申請者らは、腸管における神経系と免疫系の相互作用を明らかとするために、腸管神経が過剰に存在する遺伝子組換えマウス(NcxKO)を用いて解析を行い、以下の結果を得た。

結果：Ncx-KO マウス腸管でみられた好酸球の増加と活性化

(1) 腸管粘膜固有層(Lamina Propria: LP)から細胞を抽出し、フローサイトメトリー法(FACS)により解析を行った。NcxKO マウスでは、WT マウスと比較して、T細胞、B細胞、樹状細胞(Dendritic cell: DC)などの数に差を認めなかった。

(2) NcxKO マウスのLPでは、好酸球の増加(CD11b+CCR3+; WT:53.2%, Ncx-KO:75.8%)と活性化(CD45+SiglecF+CD11b+CD63+; WT:14.8%, Ncx-KO:75.9%)を認めた。一方でNcxKO マウスの脾臓では、好酸球数の低下(WT:0.63%, Ncx-KO:0.06%)を認め、NcxKO マウスでは何らかの原因で好酸球が腸管へ局所動員されていることがわかった。

(3) サイトカイン IL5 は、前駆細胞から好酸球への分化誘導と、局所への動員をも行う。Real Time PCR法を用いて、腸管組織におけるIL5発現について調べたところ、NcxKO マウスではWT マウスと比較して、約10-13倍増強していた。

以上の結果から、腸管神経-免疫系相互作用(腸管において好酸球の誘導)という新しい機構の存在が考えられた。本研究では、

腸管神経-免疫系相互作用の解明
の破綻による腸炎の病態解明

を目的とし、研究を進めている。

3. 研究の方法

(1) NcxKO マウスの腸管でみられた好酸球の集積の機序を以下の手順で明らかにする。

好酸球を誘導する可能性のある他のケモカイン(RANTES、eotaxin1,2、MCP1,2など)について、腸管組織における発現をReal Time PCR法で調べる。

腸管LP細胞におけるIL5産生細胞について調べるために、NcxKOおよびWTからLP細胞を抽出し、セルソーターを用いて、自然リンパ球(ILC2:Lin-Thy1.2+CD25+, ILC3:Lin-Thy1.2+CD25-)と、好酸球(成熟好酸球:CCR3+CD11b-, 活性化好酸球:CCR3+CD11b+)をそれぞれ抽出し、RNAを抽出し、qPCR法を用いてIL5の発現を調べる。

好酸球増加が、NcxKO マウス腸管でのIL5発現上昇が、T細胞または自然リンパ球によるものなのか調べる。anti-CD4抗体を投与しCD4T細胞を消去、または自然リンパ球分化に重要な転写因子RORaのインバースアゴニストSR3335を投与し、LP細胞を抽出し、好酸球の数についてFACS法を用いて調べる。

IL5KO/NcxKO または IL5KO/WT マウスを確立し(マウス線維芽細胞に電気穿孔法を用いて導入し、ガイドRNAの選定を行い、NcxKO または野生型マウスの受精卵を用いてガイドRNA/cas9タンパクの電気穿孔法導入によるIL5KOマウスの作製)、繁殖をすすめて、好酸球誘導の比較について検討を行う。

腸管神経がIL5産生に関わるのか調べるために、免疫組織学的解析を行う。腸管からLP細胞を抽出し、遠心法によりスライドガラスにはりつけ、神経マーカーTuj1とIL5による免疫染色を行う。腸管組織においても同様に検討する。

腸管神経由来 IL5 が好酸球の誘導に関わるか調べるために、神経特異的に IL5 を欠損するために、神経特異的中間径フィラメント nestin のプロモーターとエンハンサー制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを作製する。方法は、nestin cre トランスジェニックマウスの精巣上体尾部を入手し（東京医科歯科大学から譲受手配済み）、NcxK0 マウスと体外受精を行う。得られた前核期胚に、ゲノム編集法を用いて、IL5 FL を導入する。得られたマウスの遺伝子型を決定後、繁殖をすすめる実験を行う。

(2) NcxK0 マウスの腸管でみられた好酸球の集積の生理的意義について好酸球欠損マウスと交配して解析する。

NcxK0 腸管における好酸球増加の生理的意義については、NcxK0 マウスにおける好酸球欠損マウスを作製する。好酸球分化に重要な転写因子 GATA1 について、マウス線維芽細胞に電気穿孔法を用いて導入しガイド RNA の選定を行い、NcxK0 または野性型マウスの受精卵を用いてガイド RNA/cas9 タンパクの電気穿孔法導入による dbIGATA1K0 マウスの作製を行う。得られたマウスの遺伝子型を決定後、繁殖をすすめる実験を行う。NcxK0 マウス腸管における好酸球の集積が、腸炎発症・病態にどのように関連するのか調べるために、dbIGATA1K0 /NcxK0 マウスと NcxK0 マウスを用いて、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導腸炎モデルまたは放射線照射腸炎モデルを作製して、その病態(生存率、体重、血便・軟便の有無など)について評価を行う。

4. 研究成果

申請者は、NcxK0 マウスを用いて、腸における神経系と免疫系の相互作用に着目して、これまで以下の結果を得た。

(1) NcxK0 マウスの腸管粘膜固有層(Lamina propria:LP)では、好酸球の増加を認めた。

(2) (1)の原因として、好酸球を誘導するサイトカイン・ケモカインについて調べたところ、NcxK0 マウスの腸管では、IL5 の RNA 発現増加を認めた。好酸球を誘導する可能性のある他のケモカイン(IL33・RANTES・eotaxin1/2・MCP1/2 など)については、WT と比較して特に差を認めなかった。

(3)腸管 LP 細胞における IL5 産生細胞について調べるために、NcxK0 および WT から LP 細胞を抽出し、セルソーターを用いて、自然リンパ球(ILC2:Lin-Thy1.2+CD25+, ILC3:Lin-Thy1.2+CD25-)と、好酸球(成熟好酸球:CCR3+CD11b-, 活性化好酸球:CCR3+CD11b+)をそれぞれ抽出した。それらの細胞から RNA を抽出し、qPCR 法を用いて IL5 の発現を調べたところ、NcxK0 マウス ILC2 における IL5 の高い発現を認めた。ILC3 および好酸球においては、NcxK0 と WT 間において差を認めなかった。一方で、NcxK0 の LP 細胞では ILC2 細胞を上回る高い IL5 の発現を認め、ILC2 以外の細胞における IL5 産生の可能性が考えられた。現在、LP から腸管神経の抽出を試みており、同様に IL5 発現について調べている。

(4)NcxK0 マウス腸管での IL5 発現上昇が、T 細胞または自然リンパ球によるものなのか調べた。anti-CD4 抗体を投与し CD4T 細胞を消去、または自然リンパ球分化に重要な転写因子 RORa のインバースアゴニスト SR3335 を投与したが、NcxK0 マウス腸管組織の IL5 発現は依然高く、好酸球の増加は投与前と同等であった。

(5)IL5K0/NcxK0 および IL5K0/WT マウスを作製した。LP 細胞を抽出し、好酸球について FACS 解析を行った。IL5K0/NcxK0 マウスでは、成熟好酸球(CCR3+CD11b-)が NcxK0 マウスと比較して減少した (IL5K0/NcxK0 : 3.29% vs NcxK0:34.7%)。IL5K0/WT マウスでも同様の結果が得られた (IL5K0/WT : 1.813% vs WT:6.99%)。一方で、活性化好酸球とされる(CCR3+CD11b+)には大きな減少を認めなかった (IL5K0/NcxK0 : 42.3% vs NcxK0:49.9%)。このことから、腸管神経由来の IL5 が、腸管における好酸球の分化に影響しているのではないかと考えられた。

(6)IL5 発現が腸管神経によるものか調べるために、マウス胎生期 12.5 日齢より腸管神経堤細胞を抽出し、神経分化を誘導した。LPS+IL4 刺激 24 時間後に免疫染色を行ったところ、Tuj1(神経マーカー)と IL5 の共局在を認めた。以上の結果から、腸管神経は、IL5 を産生し好酸球誘導に関わることが示唆された。

(7)腸管 LP 細胞を抽出し、遠心法によりスライドガラスにはりつけ、神経マーカー Tuj1 と IL5 による免疫染色を行ったところ、Tuj1 陽性細胞は、IL5 陽性であった。腸管組織についても同様に検討を行っている。

(8)腸管神経が IL5 を産生し好酸球の分化に影響を与えるかについて調べるために、神経特異的に IL5 を欠損するマウス(NcxK0 および WT)の作製を試みた。神経特異的中間径フィラメント nestin のプロモーターとエンハンサー制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスの精巣上体尾部を入手し（東京医科歯科大学から譲受手配済み）、NcxK0 マウスと体外受精を行った。得られた前核期胚に、ゲノム編集法を用いて、IL5 FL を導入し、2 細胞期胚を偽妊娠マウスに移植した。現在仔マウスは得られておらず、進行中である。

(9)NcxK0 腸管における好酸球増加の生理的意義について調べるために、NcxK0 マウスにおける好酸球欠損誘導マウス作製を試みた。EoDTRTg マウス(ジフテリアトキシン(DT)により好酸球欠損誘導)の凍結胚を導入し NcxK0 マウスと交配を行った。DT を投与し、末梢血の好酸球減少を認めたが、腸管では減少を認めなかった。DT の濃度をあげて検討したが、マウスが死亡し、実験

系を成立させることができなかった。そこで、好酸球分化に重要な転写因子 GATA1 について、マウス線維芽細胞に電気穿孔法を用いて導入し、ガイド RNA の選定を行い、NcxKO または野性型マウスの受精卵を用いてガイド RNA/cas9 タンパクの電気穿孔法導入による dbIGATA1KO マウスの作製を行った。得られたマウスの遺伝子型を決定について、現在、シーケンス法を用いて解析中である。

以上の結果から、腸管神経は IL5 を産生し、腸管における成熟好酸球の分化に関与しているのではないかと示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Chizuru Ito, Kenji Yamatoya, Keiichi Yoshida, Lisa Fujimura, Hajime Sugiyama, Akiko Suganami, Yutaka Tamura, Masahiko Hatano, Kenji Miyado, Kiyotaka Toshimori	4. 巻 156-6
2. 論文標題 Deletion of Eqtn in mice reduces male fertility and sperm-egg adhesion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 579-590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-18-0394	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 Ogasawara T, Kohashi Y, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Hirata H, Fukushima Y, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M	4. 巻 9(750)
2. 論文標題 Allergic TH2 Response Governed by B-Cell Lymphoma 6 Function in Naturally Occurring Memory Phenotype CD4+ T Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00750	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 Takashi Shimazui, Taka-aki Nakada, Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masahiko Hatano, Shigeto Oda	4. 巻 50(6)
2. 論文標題 Development of Noninvasive in Vivo Approach to Assess Vascular Permeability in Inflammation Using Fluorescence Imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 shock	6. 最初と最後の頁 729-734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001075	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 Takehiko Oami, Eizo Watanabe, Masahiko Hatano, Youichi Teratake, Lisa Fujimura;Akemi Sakamoto, Chizuru Ito, Kiyotaka Toshimori, Paul Swanson, Shigeto Oda	4. 巻 50(4)
2. 論文標題 Blocking Liver Autophagy Accelerates Apoptosis and Mitochondrial Injury in Hepatocytes and Reduces Time to Mortality in a Murine Sepsis Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 shock	6. 最初と最後の頁 427-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001040	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 Yukiko Ohara, Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Youichi Teratake, Shuichi Hiraoka, Haruhiko Koseki, Takeshi Saito, Keita Terui, Tetsuya Mitsunaga, Mitsuyuki Nakata, Hideo Yoshida, Masahiko Hatano	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Genetic background-dependent abnormalities of the enteric nervous system and intestinal function in Kif26a-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82785-1	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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Takashi Fumita, Masahiko Hatano
2. 発表標題 Roles of enteric neuron in eosinophil induction
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 中嶋利典、坂本明美、藤村理紗、清宮航、文田貴志、大森智瑛、幡野雅彦
2. 発表標題 腸管炎症における制御性T細胞の役割とオートファジーの関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清宮航、藤村理紗、坂本明美、中嶋利典、文田貴志、幡野雅彦
2. 発表標題 Ncx KOマウスを用いたプロボリスの腸管バリア機能改善に及ぼす効果の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masahiko Hatano
2. 発表標題 Roles of enteric neurons in gut mucosal immunity
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 笈田 諭, 齋藤 武, 坂本 明美, 照井 慶太, 中田 光政, 小松 秀吾, 原田 和明, 秦 佳孝, 勝海 大輔, 古金 遼也, 藤村理紗, 幡野 雅彦, 吉田 英生
2. 発表標題 胆道閉鎖症の病態形成における制御性T細胞の意義
3. 学会等名 第45回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Oita, Takeshi Saito, Akemi Sakamoto, Keita Terui, Shugo Komatsu, Kazuaki Harada, Yoshitaka Shinno, Lisa Fujimura, Masahiko Hatano, Hideo Yoshida
2. 発表標題 Analysis of the frequency and function of regulatory T-cell using human blood samples in biliary atresia.
3. 学会等名 The Pacific Association of Pediatric Surgeons 52nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	坂本 明美 (SAKAMOTO AKEMI) (90359597)	千葉大学・バイオメディカル研究センター・准教授 (12501)	

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
---------	---------