

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02747

研究課題名(和文) T細胞におけるDAMPs-GPCRs経路活性化を介した腸管炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on the interaction between immune cells and intestinal metabolites through GPCRs in the pathogenesis of inflammatory bowel disease

研究代表者

香山 尚子 (Kayama, Hisako)

大阪大学・高等共創研究院・准教授

研究者番号：40548814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される炎症性腸疾患(IBD)の患者数は、世界的に増加しているが、根本的治療法の開発につながる発症関連分子メカニズムの詳細は明らかになっていない。本研究課題では、腸内代謝産物LysoPS(クローン病で増加)およびUDP-glucose(潰瘍性大腸炎で増加)がGPCRであるP2Y10受容体とP2Y14受容体を介して宿主免疫応答を活性化し、IBDを増悪させるメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBD患者の腸管組織において増加する代謝産物および発現が上昇するGPCRsに焦点をあてた本研究課題では、細菌由来LysoPS-P2Y10受容体シグナルがTh1細胞の解糖系活性化を介してクローン病の増悪に関与すること、UDP-glucose-P2Y14受容体シグナルが好酸球を活性化することで潰瘍性大腸炎の重症化に関与することを明らかにした。これらの成果から、P2Y10受容体アンタゴニスト・LysoPS産生酵素(ホスホリパーゼA)阻害剤・E. coliなどがクローン病の創薬標的となる可能性、P2Y14受容体アンタゴニスト・ERK1/2阻害剤などが潰瘍性大腸炎の創薬標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Although the incidence and prevalence of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are increasing globally, their etiology remains poorly understood. To define the impacts of interactions between intestinal metabolites and immune cells through GPCRs on the pathogenesis of UC and CD, we have conducted the following studies: (1) The influence of LysoPS in progression of CD: We identified that LysoPS derived from dysbiotic microbiota enhances Th1 responses through P2Y10 receptor and exaggerate colitis. (2) The influence of UDP-glucose-P2Y10 receptor signaling in UC aggravation: We identified that P2RY14 mRNA is highly expressed in colonic mucosa from UC patients and its ligand UDP-glucose is increased in inflamed sites of colonic mucosa. We demonstrated that activation of UDP-glucose-P2Y10 receptor signaling leads to prolonged survival of colonic eosinophils by inducing phosphorylation of ERK1/2 and thereby aggravates dextran sodium sulfate-induced colitis.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：自然免疫 獲得免疫 腸内細菌 代謝産物

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ライフスタイルの欧米化に伴い、我が国において、炎症性腸疾患 (IBD) である潰瘍性大腸炎とクローン病の患者数は急速に増加している。IBD は、「遺伝的素因」に「上皮細胞の異常」「腸内細菌叢の変化」「環境因子 (食事・喫煙・衛生環境)」が加わり、過剰な免疫応答が慢性的に誘導される疾患であると考えられている。潰瘍性大腸炎は、サイトカイン IL-4/IL-13 を産生する CD4⁺ T (Th2) 細胞を主体とする病態、クローン病は、IFN- γ を産生する CD4⁺ T (Th1) 細胞と IL-17 を産生する CD4⁺ T (Th17) 細胞に起因する病態であることが示唆されている。しかし、多因子疾患である IBD において、「発症に関する詳細な分子機構」は明らかにされておらず、根本的治療法の開発には至っていない。IBD の患者数は本邦のみならず世界的に増加の一端をたどっており、新規治療法の開発につながる「発症および病態形成機構」の解明が望まれている。

オミックス解析技術の進展により、IBD 患者では、腸内細菌叢・腸内代謝産物の組成・宿主/腸内細菌遺子発現プロファイルが大きく変化していることが明らかとなってきた。しかし、IBD 患者の腸内で増加する細菌や代謝産物の大部分は、腸管恒常性維持および IBD 病態制御においてその役割は明らかになっていない。そのため、腸内代謝産物の産生機構および宿主細胞への作用解明は、新たな IBD 診断法および治療法開発のために必要な標的分子の同定につながることを期待される。

2. 研究の目的

スフィンゴシン 1-リン酸やリゾホスファチジン酸に代表されるリゾリン脂質は、(1) 生理活性作用をもつリン脂質代謝産物であること、(2) 各リゾリン脂質に対して特異的な GPCRs が存在すること、(3) ヒト疾患病態に深く関与する脂質メディエーターであることが明らかになりつつある。リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) は、活性化した血小板やアポトーシス細胞において、細胞膜の外側に反転したホスファチジルセリン (PS) に分泌型もしくは細胞質型のホスホリパーゼ A1/A2 (PLA1/PLA2) が作用することにより産生される。研究代表者らは、健常者に比べクローン病患者の血漿および便において 18:0 LysoPS・18:1 LysoPS の濃度が上昇すること、マウス大腸に局在する CD4⁺ T 細胞に LysoPS 受容体 *P2ry10* mRNA が高発現することを見出した。これまでに、P2Y10 受容体-LysoPS シグナルによる T 細胞活性制御がクローン病におよぼす影響は明らかになっていない。

研究代表者は、潰瘍性大腸炎様の大腸炎を誘導したマウスの大腸において P2Y14 受容体のリガンドである UDP-glucose (細胞傷害関連分子パターン (DAMPs) の一種) が増加すること、また、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜において P2Y14 受容体の発現が亢進していることを見出した。しかし、腸管組織において P2Y14 受容体を発現する細胞および P2Y14 受容体-UDP-glucose シグナルが腸管炎症におよぼす影響については解析が進んでいない。

そこで、本研究課題では、IBD の診断法および治療法開発につながる基礎基盤提供を目指し、腸管内代謝産物による GPCRs の活性化 (LysoPS-P2ry10 経路と UDP-glucose-P2ry14 経路) を介した腸管免疫応答制御が腸管恒常性維持および腸管炎症制御に果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) クローン病で増加する腸管内 LysoPS による炎症制御機構解明

腸管粘膜に局在する T 細胞の生理機能に LysoPS-P2Y10 受容体シグナルがおよぼす影響を明らかにするため CRISPR-Cas9 システムを用いて P2Y10 受容体を有しないマウスを作成し、LysoPS の腸管炎症への作用解析、*in vitro* T 細胞分化/細胞内代謝への作用解析などを行う。*In vitro* 実験に関しては、クローン病患者由来の T 細胞を用いて同様の解析を行う。さらに、クローン病患者における腸内 LysoPS 増加機構を明らかにするためメタゲノム解析を行う。

(2) UDP-glucose による P2Y14 受容体を介した炎症制御機構の解明

UDP-glucose-P2Y14 シグナルが潰瘍性大腸炎の病態へおよぼす影響を明らかにするため、CRISPR-Cas9 システムを用いて *P2ry14* 欠損マウスを作成し、デキストラン硫酸塩 (DSS) 誘導性大腸炎 (潰瘍性大腸炎モデル) に対する感受性解析・P2Y14 受容体シグナルの宿主免疫系への作用機序解析を行う。

4. 研究成果

(1) クローン病で増加する腸管内 LysoPS による炎症制御機構解明

①日本人健常者と日本人クローン病患者の便と血漿を用いてリポドミクス解析を行った結果、18:0 LysoPS と 18:1 LysoPS が、健常者に比べクローン病患者の便と血漿において増加する脂

質分子であることが示された。そこで、LysoPS がクローン病におよぼす影響を明らかにするため、*Rag2* 欠損 (*Rag2*^{-/-}) マウスに野生型マウスの脾臓から回収した naive CD4⁺ T 細胞を移入して大腸炎/回腸炎 (クローン病モデル) を発症させたのち、18:1 LysoPS を腹腔内へ投与した。Vehicle 群に比べ 18:1 LysoPS 投与群では、著しい体重減少に加え、腸管粘膜における Th1 細胞増加を伴う大腸炎 (図 1) および回腸炎の増悪が示された。

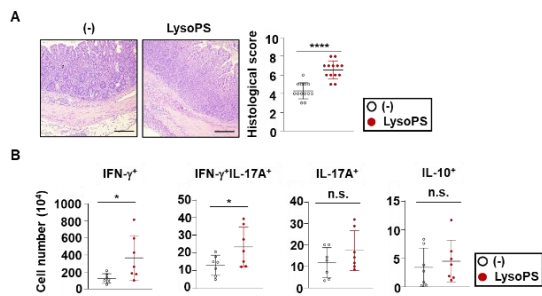


図1：18:1 LysoPS 依存性な Th1 細胞増加を伴う大腸炎の重症化

② *In vitro* で誘導した Th1 細胞を 18:1 LysoPS で刺激したのち RNA-seq 解析を行った。その結果、18:1 LysoPS で刺激した Th1 細胞では、解糖系に関わる遺伝子の発現が亢進していることが示唆された。そこで、18:1 LysoPS もしくは 18:0 LysoPS 存在下で培養した Th1 細胞を用いて解糖系の活性指標である ECAR の値を測定したところ、vehicle 群に比べ LysoPS 刺激群では ECAR の値が顕著に上昇していることが示された。そこで、便中の 18:1 LysoPS レベルが異なるクローン病患者の末梢血由来エフェクターメモリー T 細胞における解糖系の活性度合いを測定したところ、便中 18:1 LysoPS の濃度と ECAR の値が正の相関を示すことが明らかとなった (図 2)。

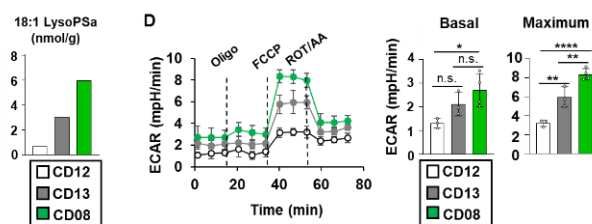


図2：クローン病患者の便中18:1 LysoPS濃度とT細胞における解答系活性度合い

③ 腸管粘膜 CD4⁺ エフェクター T 細胞では LysoPS の受容体 *P2ry10* mRNA の発現が極めて高いことから、*P2ry10* 遺伝子および相同性の高い *P2ry10b* 遺伝子を欠損させた (*P2ry10*^{-/-} *P2ry10b*^{-/-}) マウスを作成した。野生型マウスと *P2ry10*^{-/-} *P2ry10b*^{-/-} マウスの脾臓 naive CD4⁺ T 細胞を移入して腸炎を発症させた *Rag2*^{-/-} マウスに 18:1 LysoPS を投与したところ、野生型 T 細胞移入群では Th1 細胞の増加を伴う大腸炎の重症化が示されたが、P2Y10 受容体を有しない T 細胞を移入した群では 18:1 LysoPS 依存性な Th1 細胞の増加は起こらず、大腸炎は重症化しなかった (図 3)。これらの結果から、LysoPS-P2Y10 受容体シグナルによる細胞内代謝の制御 (解糖系の活性化) が Th1 細胞依存性な腸炎の重症化につながるということが明らかとなった。

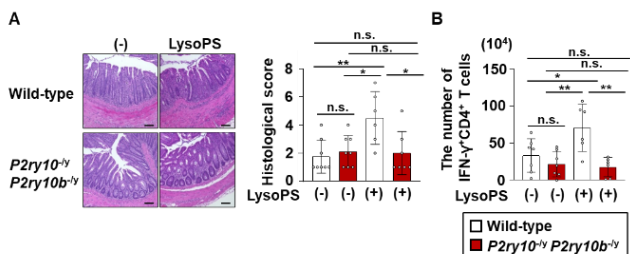


図3：P2Y10受容体を介したLysoPSによるTh1依存性大腸炎の重症化

④ クローン病患者における LysoPS の増加に腸内細菌が関与するかを明らかにするため、健常者とクローン病患者の便から単離した DNA を用いてメタゲノム解析を行った。その結果、クローン病患者では健常者とは異なる腸内細菌叢を有していること、また、LysoPS 産生に関わる酵素ホスホリパーゼ A をコードする遺伝子 ECSF_3660 をもつ *Escherichia coli* が増加していることが示された (図 4)。さらに、クローン病患者由来の便を経口投与してクローン病型腸内細菌叢を定着させたマウスでは、健常者型腸内細菌叢を有するマウスに比べ、便中の 18:1 LysoPS および 18:0 LysoPS 濃度が上昇することが明らかとなった。

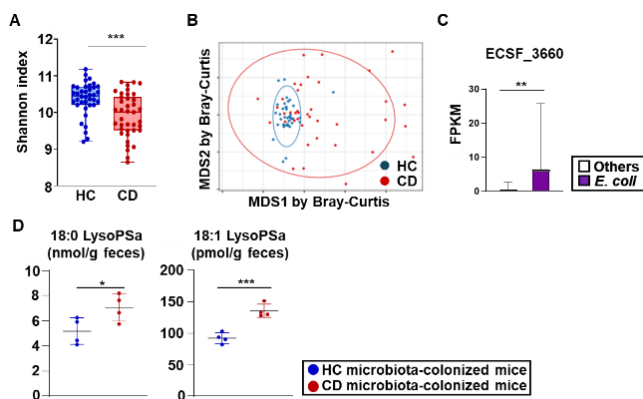


図4：クローン病型腸内細菌叢によるLysoPSの産生

上述の結果から、クローン病患者では腸内細菌の乱れにより LysoPS を産生する *E. coli* が増加すること、LysoPS が P2Y10 受容体を介して Th1 細胞を活性化することによりクローン病を増悪させることが明らかとなった (*J Exp Med.* 219(7):e20211291 (2022)) (図5)。本研究成果から、ファージによる *E. coli* 除去、吸着材などによる LysoPS 除去、P2Y10 受容体阻害剤などがクローン病の治療につながることを期待される。

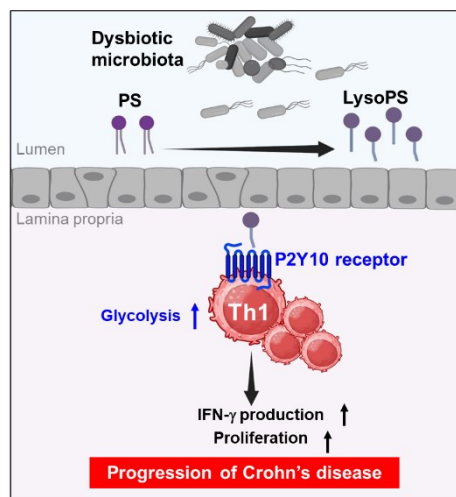


図5：LysoPSによるクローン病増悪機構

(2) UDP-glucose による P2Y14 受容体を介した炎症制御機構の解明

①潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜において *P2RY14* mRNA の発現が高いこと、DSS 誘導性大腸炎を誘導したマウス大腸粘膜において P2Y14 受容体のリガンドである UDP-glucose が増加することが示された (図6)。そこで、UDP-glucose-P2y14 受容体シグナルが大腸炎におよぼす影響を明らかにするため、*P2ry14* 欠損 (*P2ry14*^{-/-}) マウスを作成し、DSS 投与後の Disease Activity Index スコア (DAI スコア:下痢/血便/体重減少をスコア化したものの合計) および病理組織学的スコアを解析した。その結果、野生型マウスに比べ *P2ry14*^{-/-} マウスでは、DAI スコアおよび病理組織学的スコアが低下することが示された (図6)。また、DSS 投与後の大腸粘膜組織における免疫細胞の解析を行った結果、野生型マウスに比べ *P2ry14*^{-/-} マウスでは、大腸に浸潤した好酸球・好中球・マクロファージ・肥満細胞の数が少ないことが明らかとなった。さらに、DSS 投与時に P2Y14 受容体阻害剤 PPTN を腹腔内投与した C57BL/6J マウスでは、vehicle 投与群に比べ、DAI スコアおよび病理組織学的スコアが低下しており、大腸炎の改善が示された。これらの結果から、UDP-glucose-P2Y14 受容体シグナルが大腸炎の重症化に関与していることが強く示唆された。

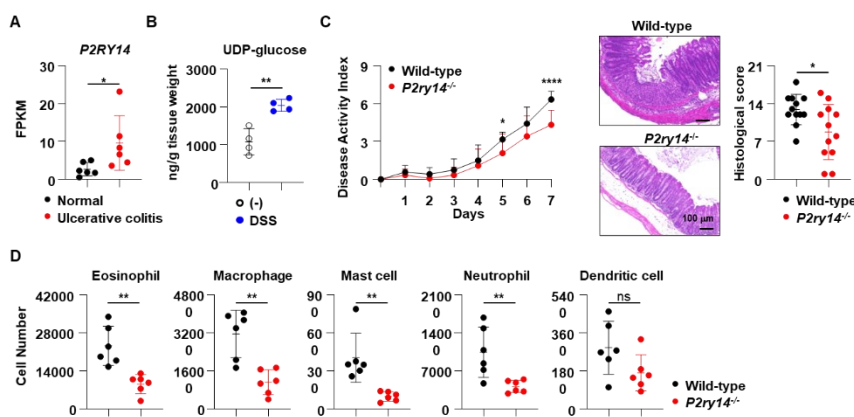


図6：UDP-glucose-P2Y14受容体シグナルを介した大腸炎の重症化

②大腸粘膜に存在する免疫細胞および大腸上皮細胞を回収し *P2ry14* mRNA の発現を解析したところ、好酸球に特異的に高発現していることが示された。そこで、DSS 投与中の *P2ry14*^{-/-} マウスへ野生型マウス骨髄由来好酸球もしくは *P2ry14*^{-/-} マウス骨髄由来好酸球を移入した。その結果、野生型マウス骨髄由来好酸球移入群において DSS 誘導性大腸炎の重症化が示され (図7)、大腸好酸球における UDP-glucose-P2Y14 受容体シグナルの活性化が大腸炎の増悪に関与することが明らかとなった。

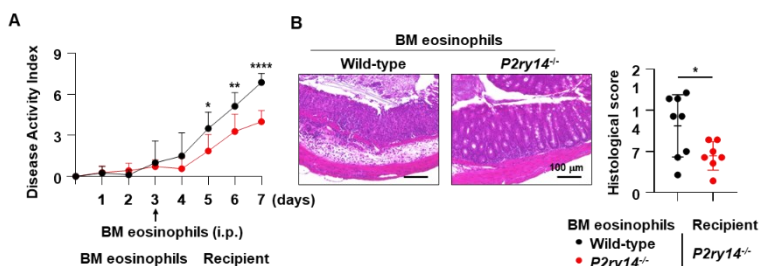


図7：好酸球におけるP2Y14受容体活性化による大腸炎の重症化

③DSS 誘導性大腸炎を発症した野生型マウスと *P2ry14*^{-/-} マウスの大腸から好酸球を回収し RNA-

seq 解析をおこなったところ、野生型マウス大腸好酸球では ERK1/2 シグナル依存的な遺伝子の発現が亢進していることが示された。このデータと一致して、UDP-glucose で刺激した野生型マウス由来の大腸好酸球では ERK1/2 のリン酸化が誘導されたが、*P2ry14*^{-/-}マウス由来の大腸好酸球では UDP-glucose 依存的な ERK1/2 のリン酸化は誘導されなかった。UDP-glucose で刺激した野生型マウス大腸好酸球において *Cxcl16* をはじめとする炎症関連分子の発現が亢進した。一方、ERK1/2 阻害剤処理により UDP-glucose 依存的な遺伝子発現の亢進は抑制された。また、UDP-glucose 刺激した野生型マウス大腸好酸球では、未刺激の細胞に比べ、Annexin 陽性細胞の割合が低下した。しかし、*P2ry14*^{-/-}マウス大腸好酸球では UDP-glucose 依存的なアポトーシス抑制は起こらなかった (図 8)。

さらに、ERK1/2 阻害剤 U0126 処理または P2Y14 受容体阻害剤 PPTN 処理を行った野生型マウス大腸好酸球では、UDP-glucose 刺激依存的なアポトーシス抑制が解除された。

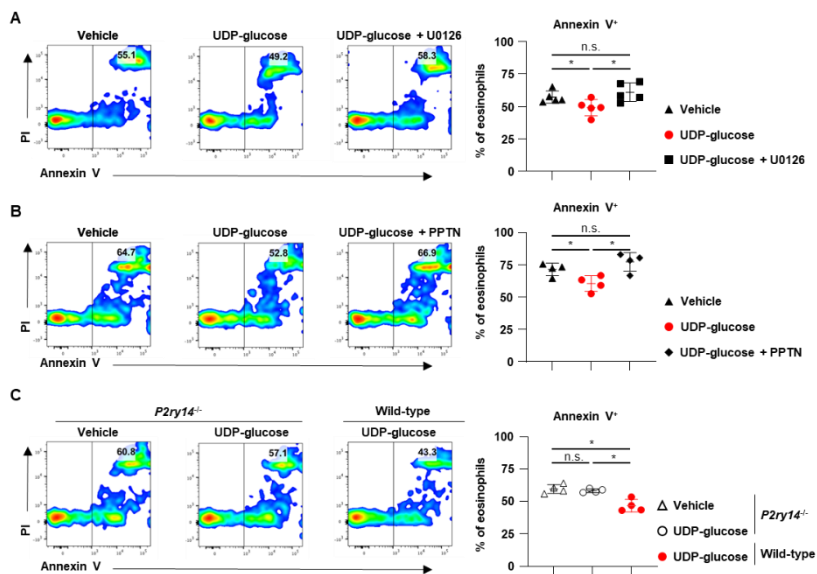


図8：UDP-glucose-P2Y14-ERK1/2シグナル依存的な好酸球におけるアポトーシス抑制

これらの結果から、大腸炎発症時に大腸粘膜組織内で増加する UDP-glucose は、P2Y14 受容体を介して ERK1/2 依存的な好酸球の寿命延伸（大腸粘膜における好酸球の集積につながる）や好酸球における炎症関連分子の発現亢進を誘導することで大腸炎を増悪させることが明らかとなった (*Int Immunol.* 36(4):155-166 (2024)) (図 9)。IBD 患者の腸管粘膜において活性化した好酸球の割合が増加することが報告されており (*Nature* 615:151-157 (2023))、今後、UDP-glucose-P2y14 受容体シグナル関連分子がこ IBD 治療候補となることが期待される。

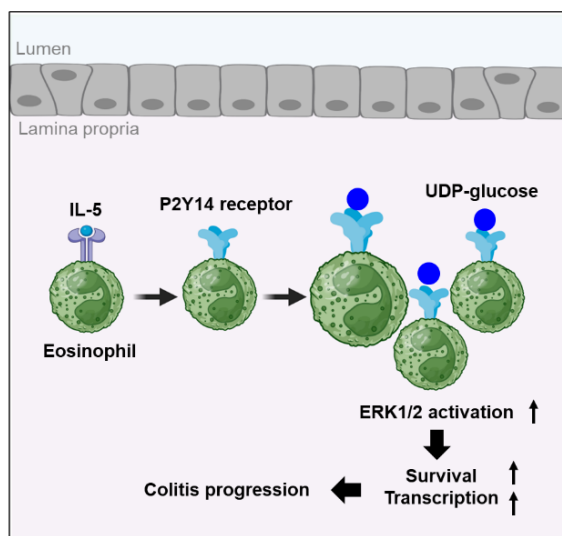


図9：UDP-glucose-P2Y14受容体による腸炎増悪機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Otake-Kasamoto Yuriko, Kayama Hisako, Kishikawa Toshihiro, Shinzaki Shinichiro, Tashiro Taku, Amano Takahiro, Tani Mizuki, Yoshihara Takeo, Li Bo, Tani Haruka, Liu Li, Hayashi Akio, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Okada Yukinori, Iijima Hideki, Takeda Kiyoshi, Takehara Tetsuo	4. 巻 219
2. 論文標題 Lysophosphatidylserines derived from microbiota in Crohn's disease elicit pathological Th1 response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211291	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 Liu Li, Ito Takayoshi, Li Bo, Tani Haruka, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Miyazaki Hazuki, Ogino Takayuki, Nakamura Shota, Takeda Kiyoshi, Kayama Hisako	4. 巻 36
2. 論文標題 The UDP-glucose/P2Y14 receptor axis promotes eosinophil-dependent large intestinal inflammation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxad050	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 Hisako, Takeda Kiyoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Emerging roles of host and microbial bioactive lipids in inflammatory bowel diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 e2249866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.202249866	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3件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hisako Kayama, Yuriko Otake-Kasamoto, Shota Nakamura, Yukinori Okada, Hideki Iijima, and Tetsuo Takehara, Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Microbiota-derived lysophosphatidylserines elicit pathological Th1 response in Crohn's disease
3. 学会等名 the 10th Annual Meeting of the Asian Organization for Crohn's and Colitis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hisako Kayama
2. 発表標題 Microbiota-derived lysophosphatidylserines induce immunopathological Th1 cells in Crohn's disease
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 香山尚子
2. 発表標題 腸管恒常性維持とその破綻における生理活性脂質の役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023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