

腸上皮細胞による腸内細菌叢の調節と免疫恒常性の維持機構

1. 研究の目的

[背景] 腸内細菌叢を適正に維持することは、消化管における局所的な宿主防御だけでなく、免疫系をはじめとする全身性の生体応答の調節に不可欠である。腸上皮細胞が粘膜構成因子や抗菌タンパク質の放出を介して腸内細菌叢の維持に寄与していることは疑いないが、宿主に恩恵をもたらす細菌群を保持しつつ、感染症や免疫異常を招く細菌を排除する仕組みについては不明な点が多い。研究代表者は以前、I κ B ζ と命名した転写調節因子（遺伝子名：*Nfkbiz*）を新規にクローニングし、この分子が自然免疫応答に重要であることを示してきた（*Nature* 2004; *J. Biol. Chem.* 2001, 2005a, 2005b, 2008 など）。最近、腸上皮細胞で I κ B ζ を欠損するマウス（*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウス）を作出したところ、小腸の常在菌であるセグメント細菌（Segmented Filamentous Bacteria, SFB）の過剰増殖が認められた。SFB は、様々な自己免疫疾患の発症に関与する Th17 細胞の生成を促進することが知られていたため、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの小腸粘膜固有層の免疫細胞を解析したところ、Th17 細胞が増加しており、さらに、ヒトの多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE）の重篤化が認められた。従って、このマウスでは腸上皮細胞の機能低下により腸内細菌叢が変化し、全身性の免疫応答異常を招いている可能性が示唆された。そこで、次の(1)～(3)を明らかにすることを目的として研究を実施した。

(1) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明

- ① 網羅的な遺伝子発現解析をおこない、腸上皮での I κ B ζ の欠損により小腸組織レベルでの遺伝子発現プロファイルにどのような影響が及ぶかを明らかにする。
- ② 発現変動遺伝子を同定し、小腸組織内におけるそれらの機能を明らかにする。
- ③ 転写調節因子としての I κ B ζ の役割を踏まえ、ゲノムワイドでのクロマチン構造変化への影響を明らかにする。

(2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内での腸内細菌叢変化の解明

- ① 小腸組織片および糞便サンプルから調製した DNA を用いて網羅的な細菌叢解析をおこない、腸上皮の機能変化による細菌叢への影響を明らかにする。
- ② 細菌叢の多様性や均一性に関わるパラメーターを算出し、複数の分類レベルでの細菌組成の変化を明らかにする。

(3) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明

- ① 小腸粘膜固有層における免疫細胞の構成の違いを明らかにし、上述の EAE モデルを誘導した後の病態とその病態形成への免疫細胞の関与を明らかにする。
- ② 抗 CD3 ϵ アゴニスト抗体の投与による小腸炎モデルの病態形成への影響を明らかにする。
- ③ Dextran Sulfate Sodium (DSS) 投与による大腸炎モデルの病態形成への影響を明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明

- ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸組織片を用いてマイクロアレイ解析や RNA-seq 解析をおこなう。
- ② 発現変動遺伝子を抽出し、個体数を揃えた RT-qPCR 法により発現変動を確認すると共に、オントロジー解析による機能予測をおこなう。さらに、EDTA 処理により小腸組織を上皮と粘膜固有層に分画し、着目している変動遺伝子が上皮に発現している場合は、マウス小腸上皮由来のオルガノイド培養系を用いてこれらが上皮細胞において直接 I κ B ζ による発現調節を受けているかを検討する。
- ③ *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸組織片を用いて ATAC-seq 解析をおこない、クロマチン構造が弛緩しているゲノム領域を明らかにする。クロマチン構造の違いが発現変動遺伝子の周辺に認められるかを明らかにする。

(2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内での腸内細菌叢変化の解明

- ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスおよびコントロールマウスについて個体数を揃え、検体採取前

に十分なco-housing(1週間ずつローテーションで合計4週間程度)を実施することにより、暴露される細菌叢を均一化する。その後、小腸組織内の複数の部位および糞便からDNAを調製し、16S rRNA遺伝子領域を対象にした網羅的な細菌叢解析をおこなう。

②細菌叢解析で用いられる多様性や均一性のパラメーターを算出し、門、綱、目、科のレベルでの構成割合の変化を明らかにする。特定の細菌種の含量が変動している可能性を検討する。

(3)腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明

①Th17細胞に着目し、フローサイトメトリーにより、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸粘膜固有層に存在する免疫細胞の解析をおこなう。次にこれらにEAEモデルを誘導し、小腸およびEAEの標的組織である中枢神経系について組織像および免疫細胞の浸潤を検討する。Th17細胞を介した免疫応答に焦点を当て、小腸および脊髄においてTh17細胞が産生するサイトカインの発現を解析する。

②マウスの腹腔に抗CD3 ϵ アゴニスト抗体を繰り返し注射すると、T細胞受容体の非特異的な活性化により小腸炎を誘導することができる。このモデルでは特に小腸の上流域(十二指腸~空腸)で著しい組織損傷が起きることが知られている。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスにこのモデルを誘導し、投与後の体重減少を経時的に測定するとともに、急性期の組織像およびサイトカイン産生を検討する。

③Dextran Sulfate Sodium (DSS)投与による大腸炎モデルを誘導し、体重変化を指標に症状の重篤化を評価する。

3. 研究の成果

(※全体像を図に示す)

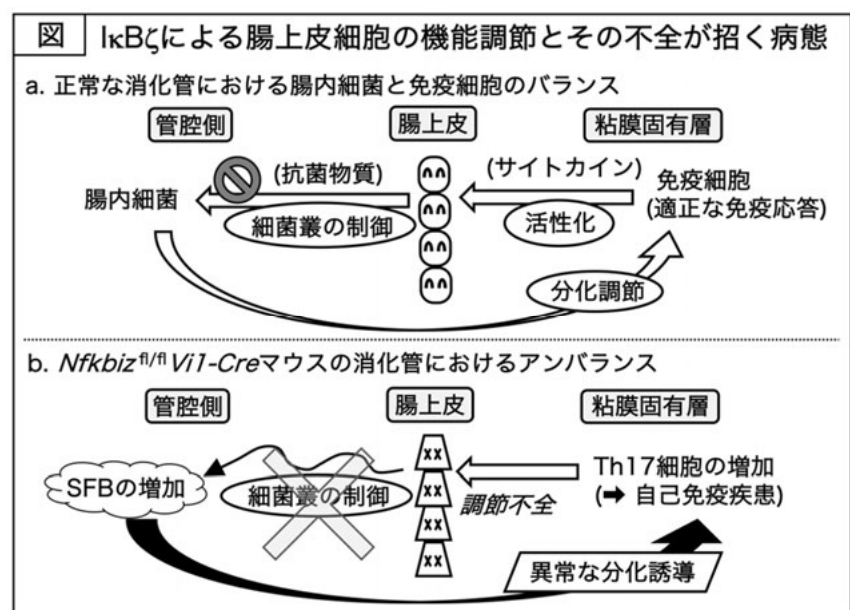
(1)腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明

①*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスの回腸末端部の小腸組織片を用いてマイクロアレイ解析をおこなった。また、小腸では部位によって発現遺伝子に差異があることが知られていたため、空腸領域の組織片を用いてRNA-seq解析を実施した。

②回腸末端部の組織片を対象にしたマイクロアレイ解析の結果、腸管粘膜で重要な役割を果たすIgAの産生に不可欠なPolymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR)やCCL28のほか、抗菌ペプチドである一群の α -Defensinファミリーの発現が低下していた。EDTAを用いた野生型マウスの小腸組織の分画をおこなったところ、これらの遺伝子はいずれも上皮面分に発現していたことから、転写調節因子であるI κ B ζ が欠損することにより、上皮細胞におけるこれらの宿主防御因子の発現が障害されたと考えられた。そこでマウス小腸から調製したオルガノイド培養系を用いてこれらの遺伝子の発現を検討したところ、pIgRやCCL28などの発現はIL-17A刺激に

応答してI κ B ζ 依存的に発現誘導されることが明らかになった。一方、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの小腸で発現が亢進している遺伝子が複数あったが、これらは、後述するように、粘膜固有層で増加しているTh17細胞によるものであると考えられた。

すなわち、Th17細胞が発現するIL-17やIL-22などのサイトカインや、それらのシグナルを受けた上皮細胞で誘導されるReg3などの遺伝子の発現が亢進していた。さらに、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの空腸領域の組織片を用いたRNA-seq解析では、回腸末端



部と同様にIgA産生や抗菌ペプチド関連の発現低下が認められたことに加え、Th17細胞が発現するサイトカイン遺伝子の発現亢進が回腸末端部よりも顕著に認められ、さらに驚いたことにIFN- γ の標的遺伝子の発現が強く誘導されていた。以上のことから、腸上皮細胞でI κ B ζ が欠損することにより、宿主防御因子の産生が障害され、恐らく腸内細菌の変化を介して慢性的な炎症状態に陥ると考えられた。

- ③ *Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスの小腸では、回腸末端部より空腸領域において発現変動遺伝子が多く見出されたため、空腸領域を標的にしたATAC-seq解析をおこなったところ、pIgRやCCL28をコードする遺伝子座の周辺でI κ B ζ 依存的に弛緩したクロマチン構造をとる領域が見出された。一方、 α -Defensinファミリー遺伝子の周辺ではI κ B ζ の欠損によってクロマチン構造が変化する領域は認められなかったことから、I κ B ζ の欠損による発現低下は小腸組織内での間接的な影響であると考えられた。IFN- γ 誘導性遺伝子については、発現上昇と矛盾なくクロマチン構造の弛緩が認められた。
- (2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内での腸内細菌叢変化の解明
- ① 十分なco-housingをおこなった *Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスおよびコントロールマウス (n=9) について、空腸、回腸、糞便検体からDNAを調製し、16S rRNA遺伝子領域を対象にした網羅的な細菌叢解析をおこなった。
 - ② サンプルごとに固有の多様性や均一性を示す α -多様性については、遺伝子型に対応した差異は認められなかったが、サンプル間の比較によって得られる β -多様性については、小腸サンプルで有意な違いが認められた。また、コントロールマウスの小腸ではHelicobacteraceae科の細菌が占める割合が圧倒的であるのに対し、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスではClostridiales科の割合が有意に増えている。これは、この科に属するSFBの増加によることが明らかになった。SFBは通常、回腸の末端部に多く観察されるが、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスの小腸では、空腸などの小腸上流域で顕著に増加していた。回腸末端部と空腸では発現する抗菌タンパク質の種類が異なることが報告されているので、腸上皮でのI κ B ζ の欠損によって部位ごとに異なる影響が生じたと考えられる。
- (3) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明
- ① *Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸粘膜固有層からリンパ球を単離し、フローサイトメトリーをおこなったところ、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスでTh17細胞の有意な増加が認められた。また、Th17細胞が発現するサイトカイン遺伝子である *Il17a*, *Il17f*, *Il22*の発現は、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスの回腸末端部より空腸で強く増強されていた。これは、SFBによってTh17細胞の分化が促進される事実とよく一致する。次に *Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスに対して、通常より弱い条件下でEAEを誘導したところ、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスは同腹コントロールマウスよりも症状が重篤化していた。
 - ② 抗CD3 ϵ アゴニスト抗体の投与による小腸炎においても、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスで明確な重篤化が認められた。また、体重減少の程度が大きく、組織像で絨毛の短小化が著しかった。さらに、小腸内の複数の部位におけるサイトカイン遺伝子の発現を検討したところ、特に十二指腸などの上流部位で発現上昇が見られた。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスの小腸では特に上流域での抗菌活性の低下により、SFBの増加を中心とした腸内細菌叢の変化が生じる結果、Th17細胞が増加して炎症性疾患の症状が悪化すると考えられた。
 - ③ *Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスにDSSを投与して大腸炎を誘導したが、体重減少を指標に評価した限り、遺伝子型に対応した症状の違いは認められなかった。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスでは、大腸でもpIgRなどの遺伝子の発現が障害されており、抗菌スペクトルが変化していることが予想されたが、このモデルで誘導される上皮傷害による炎症反応や組織修復の過程に大きな差はないと考えられた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明
- ① 種々の分解酵素を大量に含む小腸だが、適切に組織片を調製し、高い精度で遺伝子発現プロファイルの知見を得ることができた。また、回腸末端部だけでなく、小腸の上流部の組織片についても解析したことにより考察が深まった。
 - ② オントロジー解析により、発現変動遺伝子群に共通の生理機能が抗菌作用であることを

明らかにできた。また、上皮細胞での遺伝子発現変化だけでなく、粘膜固有層での免疫細胞の変化も見出すことができた。さらに、小腸由来のオルガノイドを用いた解析を実施したことにより、発現変動遺伝子の発現調節の仕組みに迫ることができた。

- ③ ATAC-seq解析を実施したことにより、発現変動遺伝子の発現調節機構に関する理解を深めることができた。一方、ATAC-seq解析のようなゲノムワイドの解析には極めて多額の費用が必要になることを再認識した。
- (2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内での腸内細菌叢変化の解明
 - ① 網羅的な細菌叢解析により、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの小腸内および糞便内での細菌組成について有意な差を認めた。
 - ② 標準的な解析方法により多様性・均一性および、種々の分類レベルでの細菌組成の変化を明らかにすることができた。細菌叢解析においても小腸内の複数の部位でサンプリングしたことにより遺伝子発現解析との対応を含め深い理解に繋がった。
- (3) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明
 - ① Th17細胞が産生するサイトカインに着目して複数の小腸組織内の部位での発現を検討したことにより、抗菌活性の変化や細菌叢の変化と対応させることができた。小腸でのTh17細胞の増加によりEAE誘導時に中枢神経系に浸潤するTh17細胞が単純に増えるのではないことが判明した。
 - ② 抗CD3 ϵ アゴニスト抗体の投与による小腸炎モデルでは、小腸でのTh17細胞の増多と病態がよく一致することが明らかになった。一定の定常状態にある*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの小腸にこのモデルを誘導したことにより、病態の形成機構について新たな知見を得ることができた。
 - ③ Dextran Sulfate Sodium (DSS)投与による大腸炎モデルを誘導したことにより、大腸と小腸の上皮細胞におけるI κ B ζ の役割の違いを明らかにすることができた。今後、さらに別の大腸炎モデルの誘導を実施したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Communications Biology 4, 80 (2021) 「MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitination of cFLIP_L」 Nakabayashi O, Takehashi H, Moriwaki K, Komazawa-Sakon S, Ohtake F, Murai S, Tsuchiya Y, Koyahara Y, Saeki Y, Yoshida Y, Yamazaki S, Tokunaga F, Sawasaki T, Nakano H
- ② Immunological Medicine 20, 1-12 (2021) 「Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB」 Katagiri T, Kameda H, Nakano H, Yamazaki S
- ③ Nature Communications 12, 2281 (2021) 「Interleukin-11-expressing fibroblasts have a unique gene signature correlated with poor prognosis of colorectal cancer」 Nishina T, Deguchi Y, Ohshima D, Takeda W, Ohtsuka M, Shichino S, Ueha S, Yamazaki S, Kawauchi M, Nakamura E, Nishiyama C, Kojima Y, Adachi-Akahane S, Hasegawa M, Nakayama M, Oshima M, Yagita H, Shibuya K, Mikami T, Inohara N, Matsushima K, Tada N, Nakano H
- ④ Scientific Reports 11, 20231 (2021) 「Identification and characterization of a novel *Enterococcus* bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis」 Nishio J, Yanai H, Hasegawa H, Ishii Y, Tanji Y, Taniguchi T
- ⑤ Cytokine 146, 155652 (2021) 「CXCL1/fractalkine regulates the differentiation of human peripheral blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells into osteoclasts」 Muraoka S, Kaneko K, Motomura K, Nishio J, Nanki T
- ⑥ Pharmaceuticals 14, 474 (2021) 「Treatment with and anti-CX3CL1 antibody suppresses M1 macrophage infiltration in interstitial lung disease in SKG mice」 Mizutani S, Nishio J, Kondo K, Monomura K, Yamada Z, Masuoka S, Yamada S, Muraoka S, Ishii N, Kuboi Y, Sendo S, Mikami T, Imai T, Nanki T
- ⑦ Front Cell Infect Microbiol 11, 602833 (2021) 「Increased incidence and plasma-

biofilm formation ability of SCC mec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from patients with bacteremia] Hamada M, Yamaguchi T, Sato A, Ono D, Aoki K, Kajiwara C, Kimura S, Maeda T, Sasaki M, Murakami H, Ishii Y, Tateda K

(2) 口頭発表

- ① 第50回日本免疫学会学術集会 (奈良/Web hybrid) 2021年12月8日 「Mice lacking death ligand-induced cell death develop Pneumocystis pneumonia」 Yamazaki S, Yonehara S, Nakano
- ② 第65回日本リウマチ学会総会 (Web開催) 2021年4月28日 「肺胞細菌叢が関与する間質性肺炎の病態の研究」 山田善登, 水谷聡, 佐藤洋志, 村岡成, 西尾純子, 南木敏宏
- ③ 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス (Web開催) 2021年11月12日 「間質性肺炎における細胞老化機構の関与」 山田善登, 本村香織, 西尾純子, 南木敏宏
- ④ 第50回日本免疫学会学術集会 (奈良/Web hybrid) 2021年12月9日 「Identification and characterization of a novel *Enterococcus* bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis」 Nishio J, Negishi H, Hangai S, Yanai H, Taniguchi T
- ⑤ The 15th Vaccine Congress 2021年10月3日 「Intranasal vaccine development using probiotic *E. coli*-derived membrane vesicles carrying pneumococcal capsular polysaccharides」 Nakao R, Iwabuchi Y, Kimura S, Hirayama S, Morino S, Suzuki M, Ohnishi M
- ⑥ The 3rd Asian Pneumococcal Symposium 2021年12月2日 「Genetic linkage analysis identifies pneumococcal susceptibility locus in mice」 Shindo R, Kimura S, Ishii Y, Tateda K
- ⑦ Orthopaedic Research Society 2022年2月6日 「The study of the candidate drug to prevent the cytotoxic effects of vancomycin on osteoblasts」 Tsuji K, Kimura S, Tateda K, Takahashi H

(3) 出版物

なし