

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	東 邦 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①腸上皮, ②腸内細菌, ③免疫制御, ④SFB, ⑤Th17細胞, ⑥自己免疫疾患, ⑦NF- $\kappa$ B		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 崎 創	東邦大学医学部 医学科生化学講座	准 教 授	研究の実施全般・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 野 裕 康	東邦大学医学部 医学科生化学講座	教 授	トランスクリプトーム解析
森 脇 健 太	東邦大学医学部 医学科生化学講座	准 教 授	腸上皮細胞培養系を用いたin vitro解析
西 尾 純 子	東邦大学医学部 免疫疾患病態制御学 ( 寄 附 講 座 )	教 授	腸内細菌叢のメタゲノム解析
近 藤 元 就	東邦大学医学部 医学科免疫学講座	教 授	動物を用いた疾患モデルの誘導
桑 原 卓	東邦大学医学部 医学科免疫学講座	准 教 授	動物疾患モデルにおける免疫応答の解析

# 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] 適正な腸内細菌叢は、腸管の局所的な恒常性維持だけでなく、免疫系をはじめとする全身性の生体応答の制御に重要である。腸管で生体の内と外を隔てる腸上皮細胞が、抗菌タンパク質などの放出を介して腸内細菌叢の維持に重要な役割を果たしていることは明らかだが、宿主に恩恵をもたらす菌種を保持しつつ、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、転写調節因子 I $\kappa$ B $\zeta$  (遺伝子名: *Nfkbiz*) を新規に同定し、この因子が自然免疫応答時のサイトカイン産生などに重要であることを明らかにしてきた (*Nature* 2004; *J. Biol. Chem.* 2001, 2005a, 2005b, 2008, 2016 など)。研究代表者は、I $\kappa$ B $\zeta$ が、活性化した自然免疫系細胞だけでなく、腸管で恒常的に発現していることに着目し、腸管を EDTA で処理して上皮と粘膜固有層に分離したところ、上皮画分に I $\kappa$ B $\zeta$  の発現が認められた。そこで、腸上皮細胞における I $\kappa$ B $\zeta$  の役割を明らかにするために、腸上皮細胞で特異的に I $\kappa$ B $\zeta$  を欠損するマウス (*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre* マウス) を作出した。その結果、この変異マウスの小腸では、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 は種々の自己免疫疾患に関与する Th17 細胞の分化を促進することが知られていたため、*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *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、ヒト多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) の症状の増悪化が観察された。これらのことから、この変異マウスでは、腸上皮細胞の機能変化によって腸内細菌叢のアンバランスが生じ、免疫細胞の分化異常を介して全身性の免疫応答の亢進が起きている可能性が予想された。本研究では、I $\kappa$ B $\zeta$  を介した腸上皮細胞の機能調節が、腸内細菌叢や免疫応答の制御にどのような役割を担っているかを明らかにする目的で、以下の3点について解析を実施する。

- (1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節
- (2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御
- (3) 炎症性疾患の病態形成への関与

## 2. 研究の計画

- (1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節
  - ① 腸管組織を対象としたトランスクリプトーム解析により、*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre* マウスで発現が変動している遺伝子を同定し、その機能や発現制御機構を明らかにする。
  - ② マウス小腸から上皮オルガノイド培養系を調製し、サイトカインによる遺伝子発現調節や標的遺伝子の発現における I $\kappa$ B $\zeta$  の役割を明らかにする。
- (2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御
  - ① *Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre* マウスの糞便および小腸組織を対象にしたメタゲノム解析により、細菌叢の変化を明らかにする。
  - ② 小腸組織内で、胃から盲腸へ方向に沿った各部位について、腸内細菌の棲息を検討し、腸内細菌制御遺伝子の発現との対応を検討する。
  - ③ 粘膜固有層からリンパ球を調製し、各種細胞の構成の変化を解析するほか、サイトカイン遺伝子の発現変化を検討する。
- (3) 炎症性疾患の病態形成への関与
  - ① 腸疾患モデル (抗 CD3 $\epsilon$  アゴニスト抗体投与により誘導される小腸炎、デキストラン硫酸ナトリウム dextran sulfate sodium (DSS) 誘導性大腸炎) を誘導し、臨床スコア、病理学的所見、免疫応答レベルを検討する。
  - ② 全身性の炎症性疾患モデル (実験的自己免疫性脳脊髄炎, experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) を誘導し、腸や標的部位での免疫応答を検討する。

### 3. 研究の成果

#### (1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節

- ① *Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの回腸組織についてトランスクリプトーム解析をおこなったところ、粘膜免疫で重要なIgAの産生に関わる遺伝子群 (*Pigr*, *Ccl28*)や、抗菌活性を持つラジカル産生酵素遺伝子 (*Duox2*, *Nos2*など)の発現が同腹コントロールマウスと比較して低下していた。また、小腸における抗菌タンパク質産生で中心的な役割を担うパネート細胞のマーカー遺伝子 (*Lyz1*,  $\alpha$ -ディフェンシン遺伝子群)の発現が著明に低下していた。
- ② *Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの回腸で発現が低下していた遺伝子の多くは、IL-17によって発現が誘導されることが報告されていたため、マウス小腸から上皮オルガノイド培養系を調製し、サイトカインによる遺伝子発現応答を検討した。その結果、I $\kappa$ B $\zeta$ をコードする*Nfkbiz*遺伝子自体もIL-17刺激に応答して発現が誘導されることが明らかになった。マクロファージをリポ多糖で刺激するような自然免疫応答では、*Nfkbiz*の発現は一過的に誘導された後に速やかに減弱するが、小腸オルガノイドをIL-17で刺激する系では、刺激後48時間後でも高い発現が維持されていた。*Pigr*や*Ccl28*の発現はIL-17刺激で増大し、I $\kappa$ B $\zeta$ を欠損するオルガノイドではその増大が認められなかったことから、これらの遺伝子はIL-17刺激に応答してI $\kappa$ B $\zeta$ によって直接転写レベルが調節されると考えられた。一方、パネート細胞のマーカー遺伝子の発現は、IL-17刺激やI $\kappa$ B $\zeta$ 欠損によって影響されなかった。*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの小腸組織を観察したところ、パネート細胞数が著減していたことから、I $\kappa$ B $\zeta$ はパネート細胞の恒常性維持に重要であることが示唆された。後述のように、*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの空腸組織ではIFN- $\gamma$ の産生が亢進しており、IFN- $\gamma$ はオルガノイド培養系においてパネート細胞を選択的に傷害して細胞死を誘導することから、I $\kappa$ B $\zeta$ を介した腸上皮でのIL-17シグナリングは、IFN- $\gamma$ の産生が亢進しているような炎症の状況下でパネート細胞の維持に重要であると考えられた。そこで、オルガノイドをIFN- $\gamma$ で刺激した後に、よく洗浄し、IFN- $\gamma$ を含まない条件下で再培養したところ、パネート細胞の再生が認められ、さらにその再生過程はI $\kappa$ B $\zeta$ に依存してIL-17刺激により促進された。また、*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスに抗IFN- $\gamma$ 抗体の投与によりパネート細胞の減少が抑制された。

#### (2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御

- ① 同腹のコントロールマウスと同じケージ内で飼育している*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの糞便および小腸組織を対象にしたメタゲノム解析を実施したところ、細菌叢の $\alpha$ -多様性には影響がなかったが、空腸領域と回腸上部において $\beta$ -多様性に有意差が認められた。いずれのサンプルについても*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスにおけるSFBの増加が最も著明な特徴であり、小腸組織ではSFBの増加により科・目レベルでの細菌叢の変動が認められた。
- ② SFBを中心に、小腸内の胃から盲腸への方向に沿った各部位における棲息を検討したところ、*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの小腸全域でSFBの増加が認められた。特に興味深いことに、通常の野生型マウスでは棲息しない上流域でもSFBが検出された。腸上皮細胞でI $\kappa$ B $\zeta$ を欠損することにより、特に小腸上流域で抗菌活性が低下したと考えられたため、*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの空腸領域を対象にトランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、回腸とよく似た遺伝子セットの発現が低下していたことに加え、一連のIFN- $\gamma$ 標的遺伝子の発現が増強されていた。IFN- $\gamma$ の発現が亢進する機構については現在検討中である。
- ③ *Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの粘膜固有層からリンパ球を調製し、CD4陽性のT細胞について検討したところ、IL-17Aを産生するTh17細胞の割合が増大していた。一方、IFN- $\gamma$ を産生するTh1細胞の割合に大きな変化はなかった。最近、IFN- $\gamma$ の産生増加が腸上皮内に存在する腸管上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocytes, IELs)で起きている例が報告されているので、*Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスの空腸で産生が亢進しているIFN- $\gamma$ がこのタイプの細胞に由来する可能性が示唆される。

#### (3) 炎症性疾患の病態形成への関与

- ① *Nfkbiz*<sup>f1/f1</sup> *Vill-Cre*マウスに抗CD3 $\epsilon$ アゴニスト抗体を投与したところ、同腹のコントロールマウスと比較して体重減少が顕著であったことから、小腸炎の増悪化が予想された。

そこで、体重が最も減少する投与4日後に小腸組織の切片を作成し絨毛の長さを測定したところ、*Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスで有意に短小化が認められた。さらに、組織レベルでの遺伝子発現を検討したところ、*Ill17a*や*Ifng*の発現増加が認められたことから、小腸炎を誘導する前から亢進しているこれらのサイトカイン遺伝子の発現がさらに増強されたと考えられた。一方、この変異マウスにデキストラン硫酸ナトリウム dextran sulfate sodium (DSS)を投与して大腸炎を誘導しても同腹コントロールマウスと比較して病態の程度に変化は見られなかった。この疾患モデルでは大腸上皮組織の傷害に伴って自然免疫系が病態形成に重要な役割を担うことが示されているので、*Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスで観察されている獲得免疫細胞の異常の影響は受けにくいのかもかもしれない。

- ② ヒトの多発性硬化症の動物モデルであり、Th17細胞が病態形成に重要な役割を担う実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)を *Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスに誘導したところ、有意な臨床スコアの増悪化が認められた。髄鞘の組織切片をルクソールブルーで染色すると、脱髄の亢進が認められた。腸管で増加しているTh17細胞が中枢神経系に浸潤して病態の増悪化を招いている可能性を想定したが、脊髄での *Ill17a*や*Ifng*の発現亢進は認められなかった。EAEの病態の増悪化に関与する因子は他にも複数報告されているので、検討する必要がある。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節

トランスクリプトーム解析により、*Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスの小腸組織で発現が低下する遺伝子の多くが、細菌の制御に関与するものであることが明らかになり、オルガノイドを用いた解析から、それらがIL-17によって発現誘導されることが明らかになった。さらに、IL-17シグナリングによってパネート細胞の恒常性が維持されていることも判明し、一連の矛盾のない遺伝子調節機構を明らかにすることができた。パネート細胞の再生過程については、既に報告されているパネート細胞の分化機構との共通点を探りながら今後全容を明らかにしていきたいと考えている。また、*Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスの小腸で見られるIFN- $\gamma$ の産生亢進については、今後産生細胞の同定と機構の解明を進めたい。フローサイトメトリーを用いた解析だけでなく、single cell RNA-seqの技術が有用だと考えられる。

### (2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御

16S rRNA遺伝子領域を標的としたメタゲノム解析により、*Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスの消化管や糞便中ではコントロールマウスと比較して細菌叢が大きく変化していることが明らかになった。特に小腸の常在菌であるSFBの増加が著しく、野生型マウスでは通常棲息しない小腸の上流部にも検出された。このことをきっかけに上流部の遺伝子発現解析をおこない、IFN- $\gamma$ シグナリングの亢進を明らかにできた。腸管では、サイトカインによる腸上皮細胞の調節と、腸内細菌による免疫細胞の調節が共存するため、マウスに抗菌薬を投与することにより後者の調節を除いた際に生じる変化についても解析する必要がある。また、SFB以外にも免疫細胞の分化に影響を与える菌種がこれまでに複数同定されているので、それらについて *Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスでの変動を検討する。

### (3) 炎症性疾患の病態形成への関与

3種類の炎症性疾患モデルを用いて *Nfkbiz<sup>f1/f1</sup> Vill-Cre*マウスの病態を解析し、IL-17やIFN- $\gamma$ が病態に影響しているモデルではこの変異マウスでの増悪化が認められた。しかし、サイトカイン産生と臨床スコアの関係については、上述のように未解明な点も残されている。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① iScience 26, 105934 (2023) 「Interleukin 11 confers resistance to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice」 Nishina T, Deguchi Y, Kawauchi M, Xiyu C, Yamazaki S, Mikami T, Nakano H
- ② Mucosal Immunology 15, 1321-1337 (2022) 「IKB $\zeta$  controls IL-17-triggered gene

expression program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents Th17-associated pathologies] Yamazaki S, Inohara N, Ohmuraya M, Tsuneoka Y, Yagita H, Katagiri T, Nishina T, Mikami T, Funato H, Araki K, Nakano H

- ③ Frontiers in Immunology 13, 935114 [Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease] Yamada Z, Nishio J, Motomura K, Mizutani S, Yamada S, Mikami T, Nanki T

## (2) 口頭発表

- ① 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [Cell death-deficient mice develop T cell exhaustion] Seki T, Miyoshi S, Moriwaki K, Yamazaki S, Nakano H
- ② 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [I $\kappa$ B $\zeta$  regulates IL-17-triggered gene program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents autoimmune disorders] Yamazaki S, Inohara N, Tsuneoka Y, Yagita H, Katagiri T, Nishina T, Mikami T, Nakano H
- ③ 第30回日本Cell Death学会学術集会（東京）2022年6月25-26日 [Mice lacking death ligand-induced cell death develop Pneumocystis pneumonia] 関崇生, 三好嗣臣, 森脇健太, 山崎創, 米原伸, 中野裕康
- ④ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease] Nishio J, Yamada Z, Motomura K, Mizutani S, Yamada S, Mikami T, Nanki T
- ⑤ 第9回JCRベーシックリサーチカンファレンス（熊本）2022年11月18-19日 [RAに併発する間質性肺炎に関する細胞老化機構の解明] 渡邊萌理, 西尾純子, 本村香織, 山田善登, 南木敏宏
- ⑥ 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会（ハイブリッド・横浜）2022年4月25-27日 [間質性肺炎における細胞老化機構の関与] 山田善登, 西尾純子, 南木敏宏
- ⑦ 第31回 Kyoto T Cell Conference (Zoom開催) 2022年5月27-28日 [T細胞活性調節におけるミトコンドリアの役割解析] 桑原卓, 近藤元就
- ⑧ 第30回日本シェーグレン症候群学会学術集会（金沢）2022年9月16-17日 [シェーグレン症候群疾患モデルマウスにおけるB細胞活性化機構の解析] 田中ゆり子, 井上彰子, 近藤元就
- ⑨ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [IL-7 regulates the expression of CD69 and CD103 on TRM cells in skin] Ise M, Kuwabara T, Tanaka Y, Naito T, Kondo M
- ⑩ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [Functional analyses of pathogenic T cells in autoimmune prone mice] Tanaka Y Inoue A, Naito T, Kuwabara T, Ise M, Kohwi-Shigematsu T, Kondo M
- ⑪ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [SATB1-dependent mitochondrial ROS production controls TCR signaling in CD4<sup>+</sup> T cells] Kuwabara T, Ise M, Naito T, Tanaka Y, Kondo M

## (3) 出版物

なし