

2023年度（第48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- κ 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] 適正な腸内細菌叢の維持は、腸管での宿主防御や栄養素の供給だけでなく、免疫系をはじめとする全身の生体応答に重要である。腸管の中で最も外界近くに位置する腸上皮細胞が腸内細菌叢の調節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細菌種を保ちつつ、感染症や免疫異常の原因となる菌種を排除する仕組みについては不明な点が多い。特に、腸上皮細胞の機能は、粘膜固有層に存在するリンパ球などの免疫細胞から放出されるサイトカインによって重要な調節を受けることが示唆されてきているが、その調節についての理解は十分でない。研究代表者らは以前、NF- κ B と結合する新規核内因子 I κ B ζ (マウス遺伝子名 *Nfkbiz*) を同定し、I κ B ζ が自然免疫応答時の遺伝子発現調節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 κ B ζ が、活性化した自然免疫細胞に次いで小腸の腸上皮組織で高く発現していることを見出したため、腸上皮細胞で特異的に I κ B ζ を欠損するマウス (*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウス) を作成し、表現型解析をおこなった。I κ B ζ は転写調節因子であることから、はじめに回腸組織を対象とした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関連因子 (*Duox2*, *Nos2* など) の発現がコントロールマウスと比較して顕著に低下していた。また、小腸における抗菌タンパク質産生に中心的な役割を担うパネート細胞に関連した遺伝子 (*Lyz1*, α -ディフェンシン遺伝子群) の発現が低下していた。また、このマウスの小腸では、齧歯類の回腸に常在するセグメント細菌 (Segmented filamentous bacteria, SFB) がコントロールマウスと比較して有意に多く認められ、粘膜固有層では Th17 細胞が増多していた。さらに、Th17 細胞を主要な責任細胞とする自己免疫疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) をこのマウスに誘導したところ、増悪化が認められた。したがって、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスでは、腸上皮細胞での抗菌関連因子の産生不全によって腸内細菌叢のアンバランスが生じ、Th17 細胞が増え、この細胞を介した免疫応答が異常になったと考えられた。本研究では、I κ B ζ を介した腸上皮細胞の機能調節が、腸内細菌叢や全身性の免疫応答で担っている役割を明らかにする。次の3点に着目して解析を進める。

- (1) 腸上皮細胞における抗菌関連遺伝子の発現調節
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
- (3) 炎症性疾患の病態形成における役割

2. 研究の計画

- (1) 腸上皮細胞における抗菌関連遺伝子の発現調節
 - ① 腸管の3箇所 (空腸、回腸、大腸) についてトランスクリプトーム解析をおこない、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスで発現が変動している遺伝子を同定する。
 - ② *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの小腸組織から上皮オルガノイド培養系を確立し、IL-17やIL-22による遺伝子発現調節におけるI κ B ζ の役割を明らかにする。
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
 - ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの腸管の2箇所 (空腸と回腸) および糞便サンプルを用いたメタゲノム解析をおこない、腸内細菌叢の変化を明らかにする。
 - ② 粘膜固有層細胞を調製し、各細胞タイプの組成変化を明らかにする。
- (3) 炎症性疾患の病態形成における役割
 - ① TCR に対するアゴニスト抗体の投与により誘導される小腸炎モデルを用いて、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの病態形成や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抗菌関連遺伝子の発現調節

- ① *Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの回腸では、IgAの生合成に関与する遺伝子のほか、抗菌ラジカル産生酵素の遺伝子、パネート細胞関連遺伝子の発現がコントロールマウスと比べて低下していた。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの大腸組織についてもトランスクリプトーム解析をおこなったところ、ラジカリ産生関連遺伝子の発現低下が目立った。また、小腸粘膜固有層でのTh17細胞の増多と一致して、大腸でもTh17関連サイトカインであるIL-17A, IL-17F, IL-22をコードする遺伝子の発現が増大していた。また、IL-22応答遺伝子であり、上皮細胞傷害のマーカー遺伝子としても知られる*Reg3b*や*Reg3g*の発現増大が認められた。さらに、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの空腸領域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、回腸の解析で認められた抗菌関連遺伝子の発現低下に加えて、一群のIFN- γ 応答性遺伝子の発現亢進が認められた。現時点で発現細胞や発現亢進の機序は不明だが、IFN- γ をコードする遺伝子 (*Ifng*) の発現もコントロールマウスと比べて有意に増大していた。以前、小腸上皮オルガノイドをIFN- γ で刺激すると、パネート細胞などが選択的に傷害されることが報告されていたので、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウス的小腸で認められたパネート細胞の減少は、IFN- γ の恒常的な過剰産生によるものと考えられた。
- ② コントロールマウスおよび*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウス的小腸から上皮オルガノイドを調製し、IL-17AおよびIL-22に応答した遺伝子発現応答を検討した。コントロールマウス由来の上皮オルガノイドをIL-17Aで刺激するとI κ B ζ の発現が誘導された。また、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウス由来の上皮オルガノイドでは、IL-17に応答性の遺伝子発現応答がほぼ完全に障害されていた。興味深いことに、複数のラジカル産生酵素関連遺伝子の発現は、IL-17AとIL-22の同時刺激により相乗的に増大し、その相乗効果はI κ B ζ 依存的であった。オルガノイドからの活性酸素種の産生誘導能はIL-22の方がIL-17よりも高かった。パネート細胞関連遺伝子のいくつかはIL-22に応答性であり、IL-22の存在下ではIFN- γ によるパネート細胞障害の抑制が認められた。
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
- ① ローテーションを組んで一定期間同じケージ内に同居飼育したコントロールマウスと*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの回腸、空腸、糞便からDNAサンプルを調製し、メタゲノム解析をおこなった。腸上皮細胞におけるI κ B ζ の欠損は、細菌叢の α -多様性にはほとんど影響を及ぼさなかったが、空腸と回腸領域に接着している細菌叢に関して β -多様性に有意差を認めた。特異的なプライマーを用いた解析から、小腸および糞便中のいずれにおいてもSFBの増加が認められた。
- ② 小腸の粘膜固有層に存在する細胞を解析した結果、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスではTh17細胞の増多が観察された。粘膜固有層では、Th1細胞を初めとするIFN- γ 産生細胞の数には影響がなかったが、上述のように*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの空腸でIFN- γ やIFN- γ 応答性遺伝子の発現亢進が認められた。腸管上皮細胞間リンパ球からのIFN- γ 産生が報告されているが、この細胞タイプの活性化機構については不明である。
- (3) 炎症性疾患の病態形成における役割
- ① TCR に対するアゴニスト抗体の投与により誘導される小腸炎モデルでは、特に小腸の上流部での炎症が顕著である。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre* マウスでは抗体未投与のマウスにおいても恒常的に Th17 細胞の増多のために IL-17 シグナルと IL-22 シグナルが亢進しているが、抗体投与によりその傾向が助長され、上皮障害が促進された。

4. 研究の反省・考察

(1) 腸上皮細胞における抗菌関連遺伝子の発現調節

- ① 腸上皮細胞におけるI κ B ζ の主要な役割はIL-17応答性の遺伝子発現調節であったが、腸上皮オルガノイドを用いて、もう一つの重要なサイトカインであるIL-22の作用について検討したことにより、腸上皮細胞の機能変化について理解を進めることができた。IL-17とIL-22の同時刺激によって相乗的に発現が増大する遺伝子があることを見出したほか、IFN- γ による上皮障害がIL-22によって抑制されることを明らかにした。IL-17とIL-22は、粘膜固有層のTh17細胞やILC3から放出されると考えられるが、IFN- γ の産生細胞については特定に至っていない。オルガノイドを用いたin vitroの系にとどまらず、生体内ではどのような状況で種々のサイトカイン産生細胞の構成が変化するかについて

検討を進める必要がある。

- ② 腸上皮オルガノイド培養系については、IFN- γ によるパネート細胞傷害を観察する系として非常に優れているので、細胞死関連の遺伝子を欠損するマウスの小腸から調製したオルガノイドを用いる実験のほか、種々のシグナル伝達因子の阻害薬を用いた実験が有用だと思われる。さらに、IL-22による抑制効果を検討することにより、IFN- γ シグナリングとIL-22シグナリングのクロストークについて新たな知見が期待される。
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
 - ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスの小腸ではSFBの増多とTh17細胞の増多が顕著である。SFBによってTh17細胞の分化が促進する機構として、上皮細胞でのSAA因子群の放出が報告されているが、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスの小腸組織ではSAAの発現はむしろ障害されているため、他の機構が主にはたらくと考えられる。*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスの小腸サンプルを用いたメタボローム解析などをおこなうことにより、腸内細菌叢によるTh17細胞の分化調節について新しい機構が明らかになる可能性がある。
 - ② 今回見出されたIFN- γ 産生の促進が、腸内細菌叢の変化とどのような関係にあるかについては未だ不明である。IFN- γ 産生の促進がSFBやTh17の増多と同時に起きることが他のグループから報告されているので、我々の*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスとの共通点を検討することにより、IFN- γ 産生促進の機構を明らかにしたい。*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスへの抗IFN- γ 抗体投与の実験により、IFN- γ シグナルを抑制すれば腸上皮細胞の障害が部分的には抑制できることを見出しているため、腸内細菌叢を調節することにより腸上皮細胞を保護する方法論を探りたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Nature Communications 14, 6304 (2023) 「Fibroblast growth factor 18 stimulates the proliferation of hepatic stellate cells, thereby inducing liver fibrosis」 Tsuchiya Y, Seki T, Kobayashi K, Komazawa-Sakon S, Shichino S, Nishina T, Fukuhara K, Ikejima K, Nagai H, Igarashi Y, Ueha S, Oikawa A, Tsurusaki S, Yamazaki S, Nishiyama C, Mikami T, Yagita H, Okumura K, Kido T, Miyajima A, Matsushima K, Imasaka M, Arai K, Imamura T, Ohmuraya M, Tanaka M, Nakano H
- ② Inflammation doi.org/10.1007/s10753-024-01986-8 (2024) 「Relationship between the lipidome profile and disease activity in patients with rheumatoid arthritis」 Masuoka S, Nishio J, Yamada S, Saito K, Kaneko K, Kaburaki M, Tanaka N, Sato H, Muraoka S, Kawazoe M, Mizutani S, Furukawa K, Ishii-Watabe A, Kawai S, Saito Y, Nanki T
- ③ European Journal of Internal Medicine 16, S0953-S6205 (2023) 「Safety of SARS-CoV-2 mRNA vaccines and effects of immunosuppressive drugs on adverse reactions in patients with rheumatic diseases」 Kawazoe M, Nishio J, Hirose W, Furukawa K, Nanki T
- ④ Journal of Immunology 211, 209-218 (2023) 「Crucial roles of SATB1 in regulation of thymocyte migration after positive selection」 Naito T, Ise M, Tanaka Y, Kohwi-Shigematsu T, Kondo M
- ⑤ Journal of Immunological research 2023, 9969079 (2023) 「Irradiation attenuates systemic lupus erythematosus-like morbidity in NZBWF1 mice: Focusing on CD180-negative cells」 Fujita K, Kuwabara T, Wang B, Tanaka K, Ito K, Akishima-Fukasawa Y, Mikami T, Akasaka Y, Ishii T

(2) 口頭発表

- ① 第96回日本生化学会（福岡） 2023年10月31日-11月2日 「腸上皮細胞におけるIkB ζ の役割：IL-17応答性の遺伝子発現を介した腸内細菌叢の調節と自己免疫疾患の抑制」 山崎創，猪原直弘，大村谷昌樹，恒岡洋右，八木田秀雄，片桐翔治，仁科隆史，三上哲夫，中野裕康
- ② 第52回日本免疫学会学術集会（千葉） 2024年1月17日-19日 「Fibroblast growth factor

18 stimulates the proliferation of hepatic stellate cells, thereby inducing liver fibrosis] Seki T, Tsuchiya Y, Shichino S, Nishina T, Yamazaki S, Matsushima K, Yagita H, Okumura K, Tanaka M, Nakano H

- ③第10回JCRベーシックリサーチカンファレンス（東京）2023年11月24日-25日「関節リウマチ患者の気道細菌叢の解析」小柴慶子，西尾純子，増岡正太郎，金地美和，川添麻衣，渡邊萌理，村岡成，金子開知，古川果林，南木敏宏
- ④第67回日本リウマチ学会総会（福岡）2023年4月24日-26日「モデルマウスを用いた関節リウマチ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，山田善登，南木敏宏
- ⑤第32回Kyoto T Cell Conference（京都）2023年6月16日-17日「自己免疫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，有田通恒，近藤元就
- ⑥第52回日本免疫学会学術集会（千葉）2024年1月17日-19日「The role of IL-7 in formation of the medullary microenvironment in the thymus」Ise M, Tanaka Y, Kuwabara T, Naito T, Kondo M
- ⑦第52回日本免疫学会学術集会（千葉）2024年1月17日-19日「Role of SATB1 in regulation of thymocyte migration after positive selection」Naito T, Ise M, Tanaka Y, Kuwabara T, Kohwi-Shigematsu T, Kondo M
- ⑧第52回日本免疫学会学術集会（千葉）2024年1月17日-19日「Elimination mechanism of B16 melanoma cells in autoimmune prone mice」Tanaka Y, Ise M, Naito T, Kuwabara T, Mashimo S, Inoue A, Kondo M

(3) 出版物

- ① 臨床免疫・アレルギー科 81(2), 149-157 (2024)「腸上皮細胞における転写調節因子 IκBζの役割」科学評論社