

NewsLetter Vol.19 No.2

奨励賞受賞 | 第54回日本消化器免疫学会総会

免疫グロブリンAによる腸内細菌叢調節と腸管粘膜防御の再検証

津川 直也¹ 永石 宇司¹ 渡部 太郎¹ Nisha Jose¹
細谷 明德¹ 小島 裕大¹ 安達 貴弘² 渡辺 守¹

¹東京医科歯科大学 消化器内科 / ²東京医科歯科大学 免疫疾患分野

腸管組織において免疫グロブリン(Ig)Aは粘膜固有層内の形質細胞から産生され、二量体を形成して分泌型IgAとして粘液中に移行する。以前より、IgAは腸管内腔に存在する微生物が腸管組織内へ侵入するのを阻止したり、細菌由来の毒素を中和することなどによって、腸管粘膜の恒常性維持に重要な役割を果たすと推測されている。実際、ヒトのIgA欠損はセリアック病や炎症性腸疾患のリスク因子となることが報告されている。一方、マウスのIgA欠損モデルとしては、activation-induced cytidine deaminase (AID) 欠損マウスがこれまで広く用いられている。このAID欠損によるB細胞のIgクラススイッチ障害は、腸内細菌叢の変化をもたらすという表現型が知られている。ところがAID欠損はIgA以外のクラスのIg発現も阻害する。腸管粘膜固有層内にはIgAばかりでなく、IgG1, IgG2a, IgG2bなどその他のクラスを産生する形質細胞も定常状態から少なからず存在している。したがって、AID欠損マウスでみられる表現型は本当にIgA単独の欠損に直接起因しているのか、あるいは他のIgクラスの欠損も影響しているのかは明確ではなく、これまでそれを実際に証明した報告はない。そこで我々はCRISPR/Cas9システムを用いてIgA変異モデルを新たに樹立し、腸管粘膜におけるIgA産生の重要性を再検証することとした。

Ig heavy chain 遺伝子座におけるε鎖とα鎖の細胞内ドメインを標的としたguide RNAを構築し、Cas9 mRNAとともにC57BL/6接合子に導入した。生殖・成育が可能で最終的に得られた8系統のうち、1系統はIgA遺伝子座のほぼ全領

域が欠損していることが、ゲノムDNA中のε-α鎖間の配列から確定された。そして血清中のIgAが欠損していること、またそれ以外のIgクラス発現には影響がないことをELISAによるlittermate対照群との比較で確認し、この系統をIgA欠損マウス(IgA^{-/-})と同定した。そして我々はこのマウスがAID欠損マウスでみられるような腸内細菌叢の変化を起こしているか否かを検証することとした。

Segmented filamentous bacteria (SFB)はマウス回腸上皮に強固に接着して生存する細菌であり、Th17を誘導する細菌として近年注目されている。また以前からこの細菌はIgA分泌を促進することでも知られ、さらにAID欠損マウスでは回腸内のSFBが増殖することが報告されている。そこで腸内細菌叢の変化の有無を評価するにあたり、まず腸管粘膜を走査電子顕微鏡で観察することとした。その結果、littermate対照群と比較してIgA^{-/-}の小腸粘膜表面におけるSFBが著しく増殖していることが観察された。

次に、空腸、回腸、大腸の管腔内容物、および糞便から16S rRNAを抽出しメタゲノム解析(UniFrac解析)を行った。その結果、対照群とIgA^{-/-}群の小腸内容物のUniFrac distanceが有意に大きく、とくに回腸において対照群とIgA^{-/-}群における腸内細菌叢の構成変化が最大であることが確認された。

これらを受け、IgA^{-/-}で変化している腸内細菌叢が実際に腸管組織に病理学的変化をもたらしているか否かを解析することとした。その結果、回腸粘膜特異的に有意に炎症が自然誘発されていることが確認された。つづいて回腸粘膜固有層からリンパ球を単離してFACS解析を

行った結果、littermate対照群と比較してIgA^{-/-}ではCD4陽性エフェクターT細胞が有意に増加していた。さらにこれらの培養上清中のサイトカイン産生をELISAで測定したところ、IgA^{-/-}ではIFN-γおよびIL-17の産生が増加し、IL-4の産生が低下していることが確認された。

以上より、AID欠損マウスでみられるような腸内細菌叢の変化がIgA^{-/-}でも確認されたことから、この表現型がIgAの欠損に起因するものであることが証明された。またこの変化が腸管の恒常性破綻に起因する回腸粘膜特異的な炎症を誘発し得ることが暗示された。しかしこの炎症に関しては、腸内細菌叢の変化によるものが原因であるのか、IgA欠損によるその他の機序が原因であるのかを判断することができず、さらなる解析が必要であると考えられた。

この度は第54回日本消化器免疫学会総会において、栄えある学術奨励賞を受賞させて頂き、大変うれしく存じます。選出いただいたご関係の諸先生方をはじめ、学会員の皆様に厚く御礼申し上げます。今回受賞の対象となった研究業績は、終始ご指導・激励を頂いた渡辺守教授、永石宇司准教授をはじめ、共同研究者の皆様、ならびに東京医科歯科大学消化器内科研究室の皆様のご支援の賜物であり、この場をお借りして改めて感謝の意を表したいと思います。(津川直也)



高脂肪食中の脂肪酸はマウスの胃体部に化生を誘導し壁細胞を減少させる

平田 有基^{1,2}

福田 真嗣³

山田 和彦³

樋口 和秀¹

河村 由紀²

土肥多恵子²

¹大阪医科大学 第二内科 / ²国立国際医療研究センター / ³慶應義塾大学先端生命科学研究所

背景：世界的に肥満患者の数は増加しており、様々な癌腫のリスクファクターとなることから問題視されている。消化管領域では、食道バレット腺癌や胃の噴門部癌、大腸癌が肥満との相関が高いがそのメカニズムについては不明な点が多く食事内容と発癌について検討を行った研究は少ない。そこで我々は、マウスに高脂肪食を摂取させ特に上部消化管にどのような変化を来すのか、また高脂肪食中に含まれる脂肪酸が上皮にどのような変化を起こすのかを調べることとした。

方法：C57BL/6マウスに4週齢から高脂肪食を摂取させ、経時的に胃の組織学的変化を検討した。また、胃体部細胞の遺伝子発現解析を、コラゲナーゼ処理で細胞分離したのちに、フローサイトメトリーで壁細胞以外の上皮細胞を回収しsingle cellレベルで行った。次に透過型電子顕微鏡 (TEM) で高脂肪食摂取群とコントロール食摂取群の胃の細胞の構造を比較した。また、胃体部の細胞を用いて脂肪酸が細胞生存に与える影響を胃体部のprimary cellやcell lineを用いて*in vitro*で解析した。最後に不飽和脂肪酸が豊富に含まれている食餌と飽和脂肪酸が豊富に含まれている食餌を作成し摂取したマウスの胃の変化を*in vivo*で検討を行った。

結果：C57BL/6マウスに高脂肪食 (60% kcal% fat) を摂取させると、摂取開始より15週間後にはコントロール食 (10% kcal% fat) を摂取しているマウスと比較して胃体部の粘膜の肥厚を認め、約1/4の個体で胃体部に白色隆起病変を認めた。

胃体部を構成する細胞の組成を調べると高脂肪食摂取群では、胃酸を分泌する壁細胞が明らかに減少しており、粘液を産生する細胞の数が増加していた。増加している粘液は、MUC2陽性の腸型ではなくMUC6陽性の胃型であった。また、本来胃体部では発現していないCD44が、高脂肪食摂取群では高発現しており、これらの表現型はマウスに*Helicobacter felis*を感染させた際に発生する前癌病変と考えられているSPEM (Spasmodic polypeptide-expressing metaplasia) に酷似していた。SPEMのマーカーであるTFF2も免疫染色で陽性であ

ることが確認された。

遺伝子レベルでの変化を詳しく調べるためにsingle cell analysisという手法で、壁細胞以外の上皮細胞の細胞一つ一つの遺伝子発現パターンを高脂肪食摂取群とコントロール食摂取群で比較した。その結果、高脂肪食摂取群ではコントロール食摂取群と比較すると遺伝子発現パターンが大きく変化しており、幹細胞のマーカーやSPEM特有の遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。また、高脂肪食摂取群の細胞の約半数では内分泌細胞のマーカーの発現が上昇していた。さらに電子顕微鏡で胃体部の細胞の構造を観察したところ、高脂肪食摂取早期 (投与4週後) から壁細胞のミトコンドリアの構造異常を認め、増加している粘液細胞内には類円形の構造物を多数認めた。しかし、これらの構造物はコントロール食を摂取しているマウスの細胞内ではほとんど認めなかった。これらの構造物は全てOil red O染色陽性であり脂肪滴と考えられた。そこで我々は、高脂肪食内の脂肪酸自体が胃体部の細胞に影響を与えているという仮説を立て検証を行った。遊離脂肪酸には細胞毒性があることが知られており、高脂肪食摂取マウスの胃内に遊離脂肪酸が増加しているかを質量分析法で測定した。すると食餌そのものには含まれていない遊離脂肪酸が高脂肪食摂取したマウスの胃内で明らかに増加していた。

次に胃体部の上皮細胞を分離し初代培養を行い、脂肪酸添加培地内で6時間培養を行った。脂肪酸は胃癌の細胞株ではほとんど毒性を示さなかったが、初代培養上皮細胞に対しては濃度依存的に細胞毒性を示した。また、飽和脂肪酸であるステアリン酸 (18:0) やパルミチン酸 (16:0) と比較して、不飽和脂肪酸であるリノール酸 (18:2) やオレイン酸 (18:1) の方が細胞毒性が強いことが明らかになった。

電子顕微鏡の所見で壁細胞ミトコンドリアの構造異常が早期から指摘されたことから、細胞毒性はミトコンドリアのダメージによって起こっているのではないかと考えた。TMRMという細胞内のintactなミトコンドリアを可視化できる

系で評価を行ったところ細胞毒性の実験と同様に不飽和脂肪酸の方がミトコンドリアに与えるダメージが飽和脂肪酸より大きい所見が得られており、高脂肪食中の特に不飽和脂肪酸が一連の変化に深く関わっていることが予想された。

最後に不飽和脂肪酸 (リノール酸) が多く含まれている餌と飽和脂肪酸 (ステアリン酸) が多く含まれている餌をマウスに投与したところ、不飽和脂肪酸を多く含む餌を投与した群では、約9割の個体で白色隆起病変の発生を認めた。

結論：今回の我々の研究では、高脂肪食に含まれる脂肪酸そのものが胃の上皮細胞に影響を与え、胃粘膜の前がん病変発生に寄与している可能性が示された。

高脂肪食摂取によって、特に壁細胞が大きなダメージを受けていることが明らかになった。高脂肪食を摂取したマウスの残存している壁細胞内には、増加した粘液細胞内比べて明らかに脂肪滴の数が少なかった。脂肪滴の役割の一つに脂肪酸の毒性から細胞を保護するものがあり、脂肪滴を作る能力の乏しい壁細胞は脂肪酸の毒性を受けやすいのではないかと考えられた。

今回の系では不飽和脂肪酸の毒性が飽和脂肪酸と比較して高いことが示されたが、同じ肥満でも食事内容によって発癌率に差が出てくる可能性も示唆している。今後、消化管の発癌の研究には食事内容も考慮する必要があるのではないかと考えられた。

今回このような素晴らしい学会でのプレゼンテーションの機会だけでなく奨励賞まで頂き、感激にたえません。私がこのような幸運を得られたのも、偏に今まで御指導いただいた樋口教授や土肥先生のおかげです。この場を借りて心から感謝申し上げます。今後も、この授賞を励みにして研究・臨床共々精進して参りたいと思いますので、どうぞよろしくお願いいたします。
(平田有基)



消化器疾患の再生医療に向けて

竹原 徹郎 (大阪大学大学院医学系研究科 内科学)



第54回日本消化器免疫学会総会 (2017年9月 於：東京 会長：渡辺 守)
〈シンポジウム：消化器免疫の再生医療〉座長

消化器臓器は再生能が高いという特徴がある。典型的なのは肝臓で、正常の肝臓は3分の2を切除しても、その後何もなかったように再生しもとのサイズに復することが知られている。生体肝移植という特殊な医療が成立するのも、このおかげである。消化管もLgr5陽性の消化管上皮幹細胞が自己複製能とすべての消化管上皮細胞に分化する能力を有しており、分化した細胞が管腔側に移動していき絨毛の先端に達し管腔内に剥がれ落ちるといったサイクルを繰り返している。肝臓と消化管にすこし差があるとすれば、肝臓では特殊な場合を除いて組織幹細胞ではなく成熟した肝細胞から再生が起こるということであろう。このように消化器臓器は再生力に富んだ臓器、あるいは絶えず分化増殖している臓器である。しかし、再生を医療に応用するという視点では、ハードルの高い臓器であった。これは、再生医療が進んでいる心臓や眼、あるいは血球系細胞に比し、消化器臓器

が極めて複雑な構築をもっているためである。肝臓は確かに再生力が豊富な臓器の典型であるが、極めて高度な機能を有する肝細胞を作り上げること、ましてやそれを複雑に組織構築することは極めて難易度が高く、国の再生医療計画の中でもその実現性は最も後ろに位置付けられている。消化管上皮も、皮膚と同じように生体の外界と内部を分かち臓器で、自由自在に再生することができれば、広範な炎症性疾患やあるいは短腸症候群などに対する治療として、効果は計り知れないものがあるが、先にあげた再生医療が先行している臓器に比べると難易度は高い。

そのような中で、本シンポジウムでは消化管の再生に関する優れた演題2題、そして肝臓の再生医療に関する優れた演題1題の発表があった。東京医科歯科大学の中村先生からは、オルガノイド技術を用いて培養した腸管上皮細胞が、粘膜障害を有する個体に注腸投与により生着

するという前臨床研究の成果が報告された。慶応大学の杉本先生からは、オルガノイドにおけるLgr5細胞の系譜解析とともに、ヒトの大腸上皮を再構築するためのヒト大腸オルガノイドの作出についての発表があった。山口大学の高見先生からは、非代償性肝硬変患者に対する自己骨髄細胞注入治療に関して、骨髄の間葉系幹細胞の重要性、また大動物モデルを用いてカテーテルを用いた肝動脈投与の有用性について発表があった。

再生医療は国をあげて力が入れている領域である。消化器疾患においても再生医療、そして再生医学のさらなる展開が望まれている。本シンポジウムは消化器領域における再生医療の先端研究を理解する上で極めて有益であり、時機にかなったものであった。このようなシンポジウムの司会を担当する機会をいただき、改めて会長の渡辺守先生に感謝いたします。

日本が先導する消化器再生医療の現状と展望

金井 隆典 (慶應義塾大学医学部 内科学教室 (消化器))



第54回日本消化器免疫学会総会 (2017年9月 於：東京 会長：渡辺 守)
〈シンポジウム：消化器免疫の再生医療〉座長

消化器免疫学会は粘膜免疫学を中心に発展してきた学会であるが、古くから上皮細胞には粘膜防御機構の中核として機能するばかりではなく、抗原提示機能が存在することも知られており、本学会でも上皮細胞研究は重要な課題であった。また、上皮細胞の裏打ち構造である繊維芽細胞も上皮細胞を支持する細胞やさまざまなサイトカインを産生する細胞としての重要性は古くから知られており、消化器免疫学会で活発に議論されてきた。一方、再生医学領域の勃興に伴い、近年、再生医療としての上皮細胞、繊維芽細胞の応用研究が注目されている。今回のシ

ンポジウム企画として、まさに、タイムリーに、実用化を見据えた高いレベルの3人の演者に、さらに、コメンテーターにStappenbeck先生をお招きして、英語で開催された。

東京医科歯科大学の中村哲也先生より、成熟、胎児マウスの大腸オルガノイド上皮細胞、成熟マウスの小腸オルガノイド上皮細胞を成熟マウス大腸への移植という極めて困難な挑戦ともいえる膨大なプロジェクトの開発の経緯から現状について解説頂いた。短腸症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎の上皮細胞機能障害への新規治療法につながる極めて重要な研究と

言える。一方、慶應義塾大学の杉本真也先生からはヒト大腸オルガノイド上皮細胞を免疫不全マウス大腸へ移植するというさらにハードルの高い移植実験の紹介がされた。ヒト大腸上皮細胞の分化メカニズムをクリスパー・キャス9技術を取り入れ、細胞系譜解析を用いた圧巻の仕事であった。両者の研究はヒトへの応用のための非臨床研究の重要なステップであり、共同で日本から発信する再生医療最前線の一例を同時に聞くことができた有意義な演題であった。

炎症性腸疾患の病態解明と新規治療／診断を目指した基礎検討 ——腸管免疫から挑む——

西田 淳史 (滋賀医科大学 消化器内科)



第54回日本消化器免疫学会総会 (2017年9月 於:東京 会長:渡辺 守)
(消化管1) 座長

第54回消化器免疫学会総会において一般演題2, 消化管1のセッションを担当させていただいたことに、まずは本学会長の渡辺守先生ならびに関係者の皆様にご礼申し上げます。また、本セッションにおいて、質問やコメントが多数あり、活発な議論が行われ、ご協力いただいた会員の皆様に深く感謝申し上げます。

本セッションでは、消化管粘膜免疫からアプローチした炎症性腸疾患の病態解明を目指した基礎検討と、基礎研究から臨床応用を目指すtranslationalな研究があり、合計4演題が発表されました。

演題O2-1「潰瘍性大腸炎においてIL-33が腸炎増悪をきたすメカニズムの検討」が、島根大学消化器内科の三島義之先生から発表された。インターロイキン(IL-)33は、IL-1サイトカインファミリーに属し、通常は上皮細胞などの細胞内に蓄積され、細胞が破壊されると放出されるため、Alarminとして知られている。さらに、Th2型免疫応答に重要な役割を果たしており、2型自然リンパ球からのIL-5やIL-13の産生にも必須であることから、重要なサイトカインである。IL-33の炎症性腸疾患との関与については、以前より潰瘍性大腸炎(Ulcerative colitis: UC)との関連性が報告されている。本研究では、IL-33欠損マウスに対するデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)投与による腸炎モデルを用いて、IL-33がUCの腸炎増悪に寄与するメカニズムの解明に挑んでいる。IL-33欠損マウスにIL-33を投与することによってIL-33非投与群よりも腸炎回復が遅延しており、腸管組織を用いたマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析による両群の比較を行ったところ細胞接着因子とATP-binding cassette transporter (ABCトランスポーター) 関連遺伝子の発現低下がみられた。このことから、IL-33は腸炎回復期において、細胞接着因子とABCトランスポーターの発現異常をきたし、腸炎回復を遅延させている可能性が示唆される結果であった。本検討はIL-33をターゲットとした炎症性腸疾患の治療戦略を考える上で重要な基礎データである。

演題O2-2「シクロスポリンのmonocar-

boxylate transporter 1 (MCT1) を介した腸炎治療効果」が、弘前大学大学院医学研究科消化器血液内科の太田真二先生から発表された。シクロスポリンは難治性UCに対する重要な治療薬の1つに位置付けられている。その作用機序としては、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性に活性化されるタンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを阻害することが主な機序と考えられている。本研究では、DSS誘発腸炎モデルを用いた酪酸吸収トランスポーターMCT1を介したシクロスポリンの新たな作用機序の検討がなされている。シクロスポリン投与によってDSS腸炎の抑制が認められ、腸管上皮細胞でのMCT1の発現上昇が確認された。さらに、この腸炎抑制効果は、腸管内酪酸産生に寄与する腸内細菌の抗菌剤による除菌により、その効果が消失するとともに、腸管内の酪酸濃度の低下も確認された。このことから、シクロスポリンの作用機序として、腸内細菌による酪酸産生と、MCT1発現上昇による酪酸取り込み増加が重要な機序であることが示唆される結果であった。本検討は、シクロスポリンの効果増強を目的とした、腸内細菌をターゲットとした治療の追加や、腸管内酪酸濃度上昇を目指した追加治療などの有効性を示唆する重要な成果である。

演題O2-3「腸管マクロファージにおけるIL-10産生機序解明」が、北里大学北里研究所病院の竹内修先生から発表された。腸管は、腸内細菌などの外来抗原に常に暴露されている環境にあり、腸管内免疫担当細胞は常にそれらの外来抗原と相互作用を行い、腸管の恒常性を保っている。この腸管の恒常性維持のメカニズムを、腸管マクロファージにおけるNLRP3インフラマソーム経路に重点をおいた基礎検討を行うことで解明している。Toll様受容体アダプター分子MyD88の欠損マウスと、NLRP3欠損マウスから単離した腸管マクロファージを用いた*in vivo*の検討と、骨髄から単離したマクロファージを用いた*in vitro*の検討から、腸管マクロファージにおけるIL-1受容体刺激によるMyD88依存的経路を介したNLRP3活性化によるIL-10産生が、腸管の恒常性

維持に関与していることが示唆される結果であった。近年、腸内細菌と腸管免疫細胞との相互作用が、炎症性腸疾患の病態に重要な役割を果たしていることが分かってきた。本研究は、炎症性腸疾患の病態形成において、腸管マクロファージのNLRP3経路を介したIL-10産生の異常が関与していることが示唆され、さらに炎症性腸疾患の治療ターゲットとして、腸管マクロファージのNLRP3経路やIL-10産生も考慮できるとする成果である。

演題O2-4「ヒト大腸オルガノイドを用いた炎症性腸疾患疑似モデルの構築による薬効評価システムへの応用」が、東京医科歯科大学消化器内科の西村龍先生から発表された。臓器移植に代わる再生医療として近年期待されているのが細胞シートやオルガノイドを用いた移植療法である。腸管上皮細胞の体外培養が可能となり、腸管上皮オルガノイドが樹立され、炎症性腸疾患に対しても、罹患上皮への移植も考慮される段階にある。本研究では、ヒト大腸オルガノイドを用いて、炎症性腸疾患の薬物効果の評価システム開発を検討している。クローン病の生検検体から大腸オルガノイドを樹立し、長期の刺激培養によって、炎症性遺伝子の上昇や粘液形質の低下などの特徴をもった大腸オルガノイドの慢性腸炎状態の擬似化に成功している。さらに、この慢性炎症状態の擬似化ヒト大腸オルガノイドを用いて、新規薬剤の反応性も可能とした。これらの結果から、ヒト大腸オルガノイドが、炎症性腸疾患の治療応用だけでなく、あらたな治療薬の開発に強力なツールとなると考えられ、今後の発展が大いに期待される。

本セッションにおける演題は、将来的に炎症性腸疾患の診断および治療への応用が期待される興味深い発表であった。また、炎症性腸疾患の病態解明と新たな治療開発に対して果敢に挑む研究者の熱意が感じられるセッションでありました。今後の皆様の研究および臨床の発展をお祈りいたしまして、本稿を終わることとしたいと存じます。