

NewsLetter Vol.21 No.2

奨励賞受賞 | 第56回日本消化器免疫学会総会 (2019年8月1日, 2日 メルパルク京都)

大腸上皮細胞に発現する Lypd8 は病原細菌の大腸上皮への接着を防止する

奥村 龍 竹田 潔

大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学 / 大阪大学免疫学フロンティアセンター

背景・目的: 消化管では、粘膜を形成する種々の腸管上皮細胞が粘液や抗菌ペプチドを産生することで粘膜バリアを構築し、外部からの病原細菌または常在する腸内細菌の腸管組織への侵入を防止している。我々はこれまで、大腸吸収上皮細胞の頂端側表面に発現する Ly6/Plaur domain containing 8 (Lypd8) という GPI アンカー型蛋白が恒常的に腸管腔内に放出されており、その Lypd8 が大腸菌などの腸内に常在する有べん毛細菌に結合し、それらの大腸組織への侵入を抑制することで腸管恒常性維持に大きく貢献していることを明らかにしてきた。本研究では大腸上皮が発現する Lypd8 が体外から腸管内に侵入する病原細菌に対する感染防御にどのように寄与しているかを、Lypd8 欠損マウスとヒトにおける腸管出血性大腸菌 (EHEC) と同様の機序で大腸粘膜に接着し、マウスに大腸炎を誘導する *Citrobacter rodentium* を用いて検討した。

方法・結果: 初めに野生型マウスと Lypd8 欠損マウスに上記の *C. rodentium* を経口感染させ、Lypd8 欠損マウスの *C. rodentium* 感染に対する感受性を評価した。まず糞便中の *C. rodentium* 細菌数を経時的に解析したところ、Lypd8 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、感染後3日目、6日目の感染早期で、糞便中の細菌数が有意に増加していた (図1A)。次に、大腸上皮に接着する *C. rodentium* の細菌数を解析したところ、感染後3日目から12日目にかけて、Lypd8 欠損マウスで野生型マウスと比較し、有意に多くの *C. rodentium* が大腸粘膜に侵入していることが明らかとなった (図1B)。また電子顕微鏡による解析でも、Lypd8 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、多数の *C. rodentium* の大腸上皮細胞への接着と attachment and effacement (A/E) lesion とよばれる台座様病変が認められた (図1C)。以上の結果より、大腸上皮に発現する Lypd8 は、病原細菌の *C. rodentium* の上皮への接着を抑制することが示唆された。

次に、Lypd8 欠損マウスにおける *C. rodentium* 感染によって誘導される大腸炎の炎症度を評価した。感染後12日目の Lypd8 欠損マウスの大腸の組織切片を観察すると、野生型マウスと比較し、粘膜肥厚、炎症細胞浸潤が著明であり、激しい腸炎像が観察された (図1D)。さらに大腸粘膜固有層リンパ球のフローサイトメトリー解析では、野生型マウスと比較し Lypd8 欠損マウスの大

腸粘膜固有層における Th17 細胞、好中球の著明な増多が認められた。以上の結果により、Lypd8 は病原性細菌である *C. rodentium* の大腸粘膜への接着を抑制し、さらに細菌上皮接着に引き続いて起こる腸管炎症の抑制に大きく寄与していることが明らかとなった。

次に我々は、Lypd8 が *C. rodentium* の大腸粘膜への接着をどのように抑制しているかを検討した。はじめに Lypd8 が腸管内で経口

感染させた GFP を発現する *C. rodentium* に直接結合するかを、抗 Lypd8 抗体を用いたフローサイトメトリーにて解析した。その結果、感染させた GFP を発現する *C. rodentium* の多くに Lypd8 が結合していることが明らかとなった。*C. rodentium* は菌体表面に発現する III 型分泌装置 (T3SS) を上皮細胞の細胞膜に突き刺し、T3SS によって形成される輸送体を介して Translocated intimin receptor (Tir) を上皮細胞に注入し、上皮細胞の

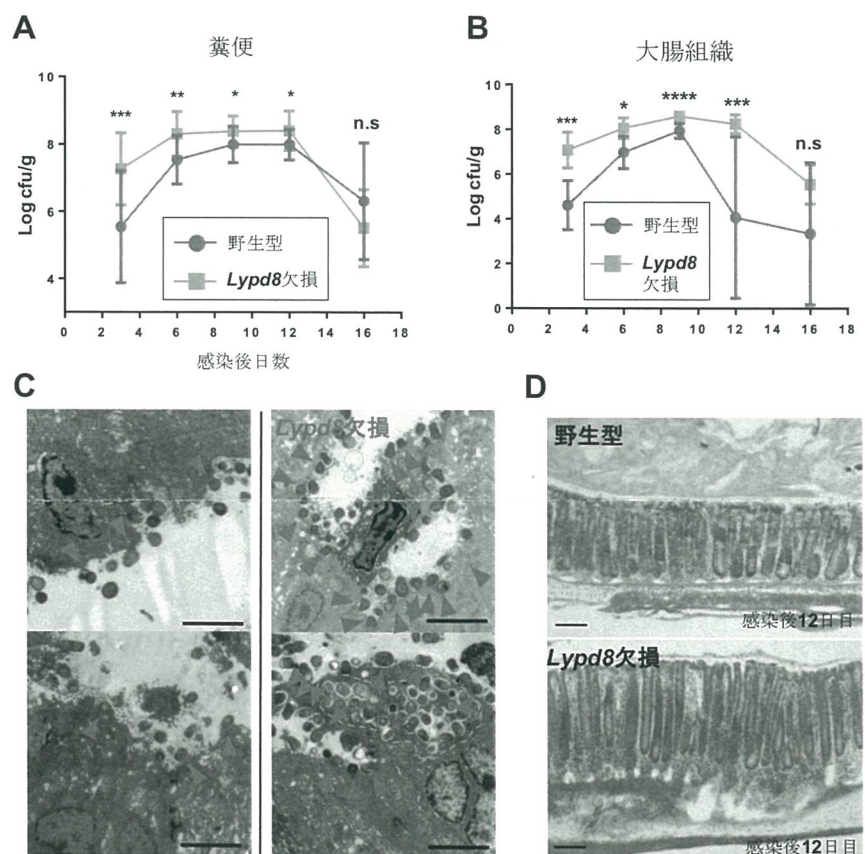


図1 *C. rodentium* 感染における Lypd8 欠損マウスの表現型解析

A: 野生型マウスと Lypd8 欠損マウスの糞便中における *C. rodentium* 細菌数の経時的変化
B: 野生型マウスと Lypd8 欠損マウスの大腸組織における *C. rodentium* 細菌数の経時的変化
C: 野生型マウスと Lypd8 欠損マウスの *C. rodentium* 感染12日目における大腸粘膜の透過型電子顕微鏡像。赤矢印が上皮細胞に接着し、A/E lesion を形成する細菌を示し、緑点線で囲まれた部分は上皮細胞内に侵入する細菌を示す。スケールバー: 5 μ m。
D: 野生型マウスと Lypd8 欠損マウスの *C. rodentium* 感染12日目における大腸組織像 (ヘマトキシリン・エオシン染色)。スケールバー: 100 μ m。

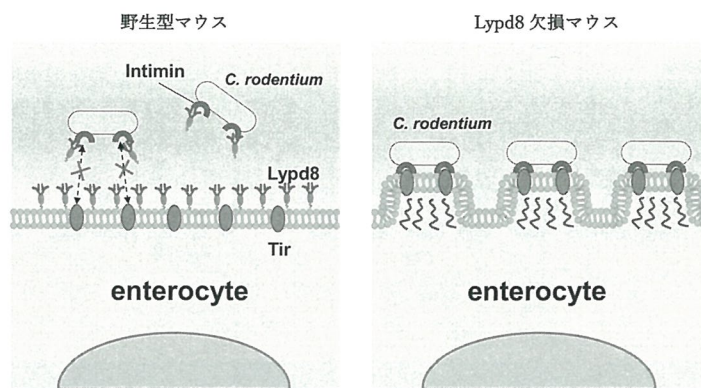


図2 Lypd8 による *C. rodentium* 上皮接着に対する防御メカニズム

細胞膜でTirと菌体表面に発現するIntiminが結合することで、上皮細胞に強固に接着することが知られている。そこで、我々はLypd8がこのような接着に関わる細菌分子に会合するのではないかと仮説を立て、*C. rodentium*のIntimin欠損株、T3SS欠損株を作製し、それらに対する腸管内でのLypd8の結合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、T3SS欠損株へのLypd8の結合は野生株との有意差を認めなかったのに対して、Intimin欠損株への結合は野生株と比較して著しく低下していることがわかり、この結果からT3SSはLypd8のターゲットではな

く、IntiminがLypd8のターゲットとなることが示唆された。

次に我々は、マウスLypd8が*C. rodentium*のIntiminに結合するかを、それぞれのリコンビナント蛋白を精製し、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)と表面プラズモン共鳴分析装置であるBiacoreによって検討した。その結果、Lypd8蛋白がIntimin蛋白に会合することが明らかとなり、その会合はヒトLypd8蛋白とEHECのIntimin蛋白においても認められた。最後にIntiminの受容体であるTirのリコンビナント蛋白を作製し、ELISA、BiacoreにてマウスLypd8蛋白

が*C. rodentium*のIntimin-Tirの結合を阻害するかを検討したところ、両実験系でLypd8蛋白がIntimin-Tirの結合を阻害する結果が得られた。

結論：以上の解析結果により、大腸吸収上皮細胞に発現するLypd8が、病原細菌の*C. rodentium*の細菌表面のIntiminに会合し、Intiminとその受容体であるTirの結合を阻害することで、*C. rodentium*の上皮への接着を抑制することが明らかとなった(図2)。今後は、Lypd8蛋白の立体構造を解析し、Intiminとの結合メカニズムの詳細を明らかにすることで、腸炎とともに重篤な合併症を引き起こすEHEC感染症に対するIntimin-Tirをターゲットとした新たな治療の開発が期待される。

この度は第56回日本消化器免疫学会にて学術奨励賞を賜り、誠に光栄に存じます。理事長の渡辺守先生を始めとして、選出いただきました諸先生方に厚く御礼を申し上げます。また常日頃ご指導いただいております竹田潔教授、また共同研究でお世話になっております大阪大学微生物病研究所の飯田哲也先生、児玉年央先生に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。この受賞を励みに、腸管粘膜バリア機構の詳細を明らかにするという目標に向かって、日々努力して邁進していきたいと思ひます。今後ともご指導、ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。(奥村 龍)

奨励賞受賞 | 第56回日本消化器免疫学会総会 (2019年8月1日, 2日 メルパルク京都)

BATF2によるIL-23/IL-17 axis制御を介した腸管炎症抑制機構

香山 尚子^{1,2,3} 谷 春佳¹ 竹田 潔^{1,2}

¹大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学 / ²大阪大学免疫学フロンティア研究センター / ³大阪大学高等共創研究院

目的：腸管においてIL-17を産生するCD4⁺ T (Th17) 細胞は、上皮バリア機能の向上や好中球誘導による生体防御に機能する一方、過剰なTh17応答は組織破壊につながり、多様な疾患の発症・病態に深く関与する。ミエロイド系自然免疫細胞であるマクロファージや樹状細胞から産生される炎症性サイトカインIL-12p40とIL-23p19のサブユニットからなるIL-23は、腸管組織において、Th17細胞の分化・増殖・維持に機能することで病原体の排除に重要な役割を果たす。一方、過剰なIL-23産生は病原性の高いTh17細胞を誘導し、腸管炎症の発症および重篤化に深く関与する。クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される炎症性腸疾患 (IBD) の患者において、腸管マクロファージにおけるIL-23産生の亢進とTh17細胞の増加が報告されており、腸管組織におけるIL-23産生の厳密な制御が腸管恒常性維持に重要であることが強く示唆される。Basic Leucine Zipper Transcription Factor (BATF) ファミリーに属するBATF/BATF2/BATF3は、免疫細胞 (樹状細胞, T細胞, B細胞) において転写因子であるIRFファミリー分子やJUNファミリー分子とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の発現を制御することが報告されている。マウスの肺と脾臓に加え、小腸および大腸にBATF2が高発現することが報告されているが、腸管組織におけるBATF2の役割は明らかになっていない。そ

こで、我々は、BATF2による腸管恒常性維持機構の解析を行った。

方法：BATF2遺伝子を欠損させたマウス (*Batf2*^{-/-}マウス) を作成し、腸管炎症の解析、大腸粘膜固有層に局在するミエロイド系自然免疫細胞によるサイトカイン産生の解析、自然リンパ球 (ILC) の解析、獲得免疫細胞であるTh1/Th17/制御性T細胞の解析を

行った。BATF2による標的遺伝子の同定および標的遺伝子の発現制御メカニズムをRNA-seq解析やChIP解析などにより検討した。BATF2とその標的遺伝子の二重欠損マウスを作成し、腸管炎症の解析と獲得免疫細胞の解析を行い、BATF2の腸管炎症制御における役割を検討した。さらに、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜固有層および大腸

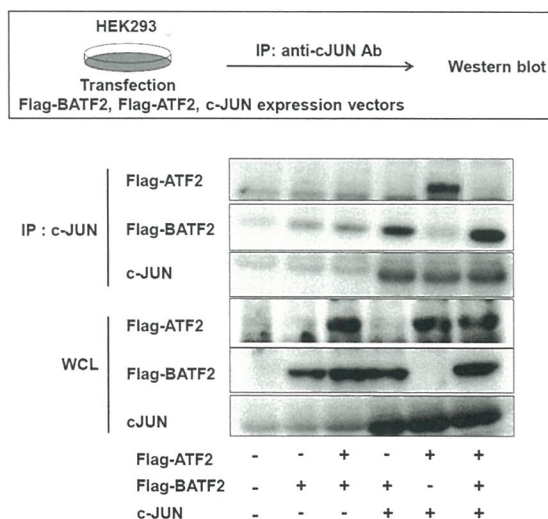


図1 BATF2によるc-JUN/ATF2ヘテロ二量体の形成阻害

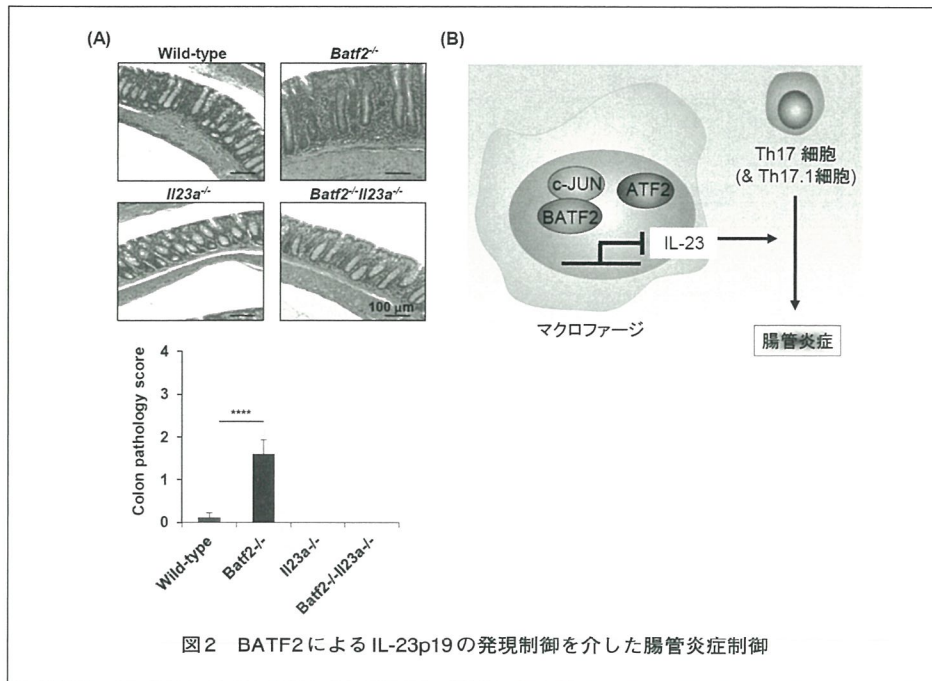


図2 BATF2によるIL-23p19の発現制御を介した腸管炎症制御

がん患者の正常部大腸粘膜固有層におけるBATF2および標的遺伝子の発現を検討した。

結果：Batf2^{-/-}マウスでは、ILC3/IL-17⁺CD4⁺T細胞/IFN- γ ⁺CD4⁺T細胞/IL-17⁺IFN- γ ⁺CD4⁺T細胞の増加を伴う大腸炎と回腸炎が自然発症した。獲得免疫細胞がないBatf2^{-/-}マウス(Rag2^{-/-}Batf2^{-/-}マウス)では、Batf2^{-/-}マウスにおける大腸炎と回腸炎の自然発症が抑制された。マウス大腸粘膜固有層では、上皮細胞・獲得免疫細胞(T細胞/B細胞/IgA産生プラズマ細胞)・CD11c⁺CD103⁺樹状細胞・好中球に比べ、単球とCD11b⁺CD64⁺マクロファージにおいてBATF2が高発現することが明らかとなった。野生型マウスとBatf2^{-/-}マウスの骨髄由来マクロファージをIFN- γ で4時間前処理したのち、LPSで3時間刺激を行い、RNA-seq解析により網羅的な遺伝子発現パターンの比較

解析を行った結果、野生型マクロファージに比べ、BATF2欠損マクロファージでは、IL-17産生CD4⁺T細胞の分化や維持に関与する炎症性サイトカインIL-23p19を含む98遺伝子の発現が亢進することが明らかとなった。さらに、Ingenuity Pathway Analysisにより98遺伝子の多くが転写因子c-JUN依存的な遺伝子であることが示された。c-JUNと転写因子ATF2のヘテロ二量体の発現を誘導することが報告されている。HEK293T細胞にc-JUN/Flag-ATF2/Flag-BATF2発現ベクターをトランスフェクションし、抗c-JUN抗体で免疫沈降を行い、ウェスタンブロット解析を行った結果、c-JUNとATF2が二量体を形成することが示されるとともに、BATF2がc-JUNと結合し、c-JUN/ATF2のヘテロ二量体形成を阻害することが示された(図1)。野生型マウス胚由来繊維芽

細胞(MEF)に比べ、BATF2欠損MEFでは、IFN- γ +LPS刺激に伴うIL-23p19プロモーターへのATF2のリクルートが亢進することが示された。Batf2^{-/-}マウスの大腸マクロファージにおいてIL-23産生亢進が示された。そこで、IL-23p19遺伝子が欠損したBatf2^{-/-}マウス(Il23a^{-/-}Batf2^{-/-}マウス)を作成した。Il23a^{-/-}Batf2^{-/-}マウスでは、Batf2^{-/-}マウスで自然発症する大腸炎が抑制された(図2A)。また、Batf2^{-/-}マウスに比べIl23a^{-/-}Batf2^{-/-}マウスの大腸粘膜固有層では、IL-17⁺CD4⁺T細胞/IL-17⁺IFN- γ ⁺CD4⁺T細胞が顕著に減少した。潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜固有層から回収したCD14⁺HLA-DR⁺マクロファージでは、大腸がん患者の正常部大腸粘膜固有層を回収した細胞に比べ、BATF2の発現が低下する一方、IL-23Aの発現が亢進することが示された。

結論：BATF2がマウス腸管マクロファージに高発現すること、BATF2欠損に伴い腸管炎症が自然発症すること、IL-23p19の欠損に伴いBATF2欠損マウスの大腸炎が抑制されること、潰瘍性大腸炎患者の腸管マクロファージにおいてBATF2の発現が低下しIL-23Aの発現が亢進することが示された。これらの結果より、腸管マクロファージにおいてBATF2がc-JUN/ATF2のヘテロ二量体形成を阻害し、IL-23p19の発現を負に制御することにより、IL-17産生CD4⁺T細胞依存的な腸管炎症の発症を防ぐ可能性が示唆された(図2B)。今後、腸管マクロファージにおけるBATF2発現誘導機構の解析を進め、炎症性腸疾患の治療法開発へつなげたい。

この度は、第56回日本消化器免疫学会総会において奨励賞をいただき、大変光栄に存じます。日頃よりご指導いただいている竹田潔教授をはじめ研究室のメンバーに心より感謝申し上げます。今回の受賞を励みに、粘膜免疫の基礎研究により一層尽力して参りますので、今後ともご指導・ご鞭撻のほどよろしくお願い致します。(香山尚子)

奨励賞受賞 | 第56回日本消化器免疫学会総会 (2019年8月1日, 2日 メルパルク京都)

腸内細菌代謝物酢酸はIgAの反応性を変化させ細菌叢を制御する

竹内 直志^{1,2} 宮内 栄治¹ 島本 周³ 松山 彰収⁴ 大野 博司^{1,5,6}

¹理化学研究所 生命医科学研究センター 粘膜システム研究チーム / ²慶應義塾大学医学部 微生物・免疫学教室

³株式会社ダイセル 研究開発本部 / ⁴株式会社ダイセル 新事業開発室 / ⁵横浜市立大学 免疫生物学教室

⁶神奈川県立産業技術総合研究所 腸内細菌叢プロジェクト

はじめに：IgAは消化管において最も多量に産生・分泌される免疫グロブリンである。過去の報告ではIgAは腸内細菌に結合することで排除もしくは定着などの選択に関わると考えられているが、その機序に関して詳細は明らかになっていない。一方、腸内細菌は短鎖脂肪酸をはじめとする様々な代謝産物を産生することで宿主の免疫系とクロストークしていると考えられている。例えば、短鎖脂肪酸が大腸における制御性T細胞の誘導に重要な役割を果たしていることが示されている(Furusawa Y et al. *Nature* 2013)。近年、短鎖脂肪酸がIgAの産生に関わる可能性が主にin vitroの実験から示唆されている(Kim M et al. *Cell Host Microbe* 2016)。そこで、我々は下部消化管において局所的に短鎖

脂肪酸を増加させることが可能な短鎖脂肪酸付加セルロースを開発し、IgAと腸内細菌の相互作用について解析することとした。

方法・結果：C57BL/6マウスに短鎖脂肪酸付加セルロースを4週間投与した。その結果、酢酸セルロース投与時には糞便中IgA濃度、IgA産生細胞が有意に増加し(図1A, B)、またIgAの細菌に対する結合率が上昇したが、プロピオン酸セルロースおよび酪酸セルロースの投与時には変化が認められなかった。次にIgAと腸内細菌との相互作用を解析するため、IgA-シークエンシングを行い、酢酸セルロース投与時の糞便中IgA結合細菌と非結合細菌を解析した。その結果、酢酸投与時に誘導されたIgAは特にEnterobacterialesやErysipelotrichalesといった潜在的に有害

な細菌種に結合する一方、Bacteroidalesに対する結合率が低下していることが判明した(図1C)。以上の結果は酢酸がIgAを増加させるだけでなく、特定の細菌に対する結合性を変化させることを示唆している。一方、酢酸自体が腸内細菌の構成を変化させ、結果としてIgA結合菌のパターンを変化させた可能性も否定できなかった。そこで次に、Bacteroidalesに属するBacteroides thetaiotaomicron、もしくはEnterobacterialesに属するEscherichia coliを無菌マウスへ投与し単独定着させたマウスを作成し、酢酸セルロースを投与し解析を行った。その結果、酢酸はE. coli単独定着マウスでは細菌反応性のIgAを誘導したものの、B. thetaiotaomicron単独定着マウスでは変化は認めなかった(図2A)。

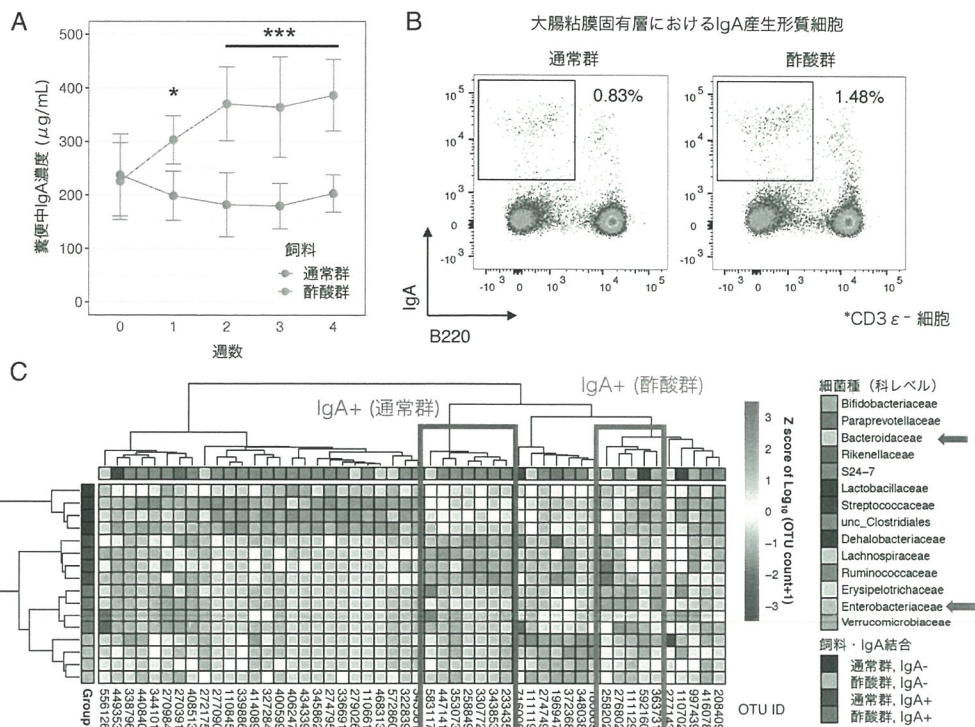


図1 酢酸はIgA産生を増加させ、IgA結合菌のパターンを変化させる

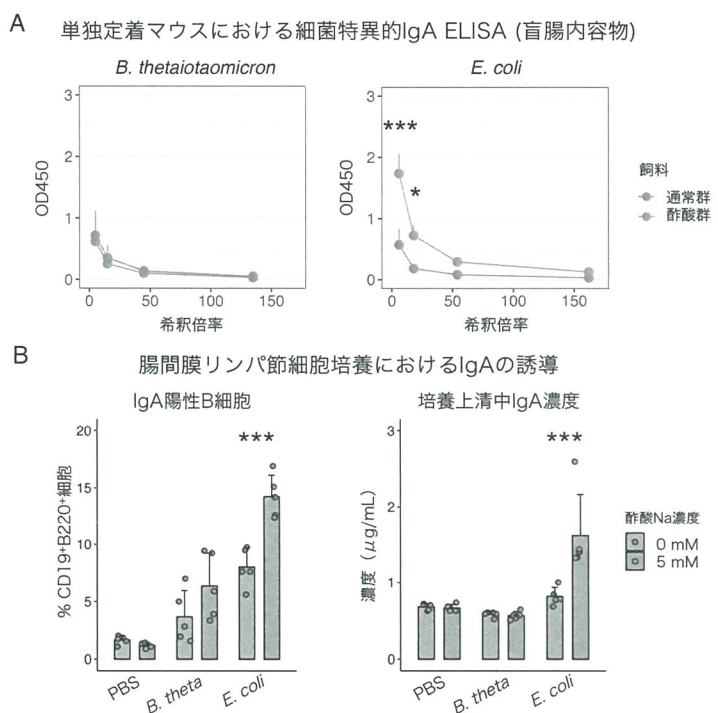


図2 酢酸はin vivoおよびin vitroにおいて細菌特異的にIgA産生を促進する

更に、IgA産生細胞のレパトアを解析したところ、同様に酢酸は*E. coli*単独定着マウスでのみ変化させることが示された。以上より、酢酸は定着する腸内細菌に依存してIgAを誘導することが明らかになった。同様の所見はin vitroの実験系でも確認された。腸間膜リンパ節のリンパ球に対して加熱処理をした*B. thetaiotaomicon* および*E. coli*を添加し、更に酢酸ナトリウムを添加して培養したところ、加熱処理した*E. coli*を添加した場合のみ、酢酸によるIgA産生細胞・上清中IgA濃度の増加を認めた (図2B)。次に酢酸による

細菌選択的なIgA誘導の機序を調べるため、まずT細胞依存性のIgA産生であるかを調べた。CD3 ϵ 欠損マウスに対して酢酸セルロースを投与したところ、野生型マウスで認められた酢酸による糞便中IgA濃度、IgA産生細胞および細菌に対するIgAの結合率の増加は認めなかった。以上より酢酸はT細胞依存性のIgA産生に関与していると考えられた。T細胞は胚中心反応による特異的IgAの産生に必須であることから、次に胚中心反応の関与を調べた。特に腸管における胚中心反応にはCCL20/CCR6ケモカイン系が重要な役割

を果たしていることが知られているが、酢酸セルロースの投与は大腸の孤立リンパ小節におけるCCL20の発現を増加し、同時にCCR6陽性細胞を増加させることが示された。実際にCCR6欠損マウスでは前述の酢酸投与に伴うIgAの結合性の変化が損なわれることが示された。以上の結果から、酢酸による腸内細菌選択的なIgA誘導にはT細胞や胚中心反応といった親和性成熟が関与すると考えられた。最後に、酢酸セルロースにより誘導されたIgAは粘膜付近の細菌叢構成を変化させ、特にEnterobacterialesの細菌の定着を制御している可能性が示唆された。

結論: 我々は本研究によって、腸内細菌の代謝産物である酢酸がIgAの細菌に対する反応性を修飾することで腸内細菌叢を変化させる、という新規の相互作用の一端を明らかにした。一方、その機序の解明に関しては未だ検討の余地が大きいと考えている。現在、*B. thetaiotaomicon* と*E. coli*の活性の違いに関する機序の詳細を検討している。更に、in vivoの結果からT細胞依存性IgA産生の機序が示唆されたため、酢酸によるB細胞とT細胞に対する効果をそれぞれ細分化して解析をしている。これらを解明することで、腸内環境の複雑な相互作用が宿主の免疫系に及ぼす影響をより深く考察することが可能になると考えている。

この度は第56回日本消化器免疫学会総会におきまして栄えある奨励賞を賜り恐縮しておりますと同時に、大変光栄なことで深く感謝を申し上げます。この場をお借りしまして学会の開催にご尽力いただきました諸先生方、審査委員の諸先生方、ならびに日頃からご指導いただいております大野博司先生に厚く御礼を申し上げます。今回の受賞を励みに今後も研究内容を発展させるべく一層精進していく所存です。引き続きご指導ご鞭撻の程、何卒よろしく申し上げます。(竹内直志)