

NewsLetter Vol.22

奨励賞受賞 | 第58回日本消化器免疫学会総会 (2021年7月2日, 3日 京都ホテルオークラ)

腸管上皮細胞間リンパ球はCD103/E-cadherinを介した細胞間接触により腸管腫瘍を抑制する

森川 亮¹ 米本 有輝¹ 根本 泰宏² 永石 宇司¹ 大島 茂¹ 岡本 隆一¹ 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 消化器病理学

背景・目的: 免疫チェックポイント阻害剤の発展に伴い免疫療法が注目されているが、悪性腫瘍微小環境には様々な免疫回避機構が備わっていることが知られており、その詳細を明らかにすることが有効な癌免疫療法を進展させる上で重要となってくる。小腸癌は大腸癌としてはるかに少ないことが知られているが、その理由は詳細に解明されていない。小腸には上皮細胞間リンパ球 (IEL) と呼ばれる、その大半がT細胞で構成される細胞集団が上皮細胞の間に存在することが知られており、消化管腫瘍の発生源地である上皮細胞に最も近接した免疫細胞であるということが出来る。IELは上皮細胞と接触しながら移動していること、細胞傷害性を有する分画を多数含むことなどが知られている。そこで我々は、IELが細胞間接触を介して腸管上皮細胞を監視し、腫瘍細胞を排除しているために小腸には腫瘍が少ないという仮説を立てた。そこで独自に開発した小腸腫瘍のintravital microscopy, 小腸腫瘍オルガノイド-IEL共培養

システムを用いて腫瘍微小環境におけるT細胞の動態およびIELと腫瘍の細胞間相互作用を可視化し、腫瘍免疫におけるその意義を検討した。

方法・結果: 最初に、T細胞のレポーターマウスであるDPE-GFPマウスと消化管腫瘍モデルであるAPC^{min/+}マウスを組み合わせAPC^{min/+}/DPE-GFPマウスを作成し、腫瘍微小環境におけるT細胞の配置、動態を解析した。まず、小腸腫瘍サンプルに透明化処理を施し、腫瘍微小環境の3Dイメージングを行なったところ、腫瘍微小環境ではT細胞の数が減少し、その分布は血管周囲に局限していた。次に小腸腫瘍マウスにおいてintravital microscopyを施行した。小腸腫瘍マウスの非腫瘍部と野生型マウスの小腸におけるIELの動態に有意な差は見られなかった。一方で小腸マウスの腫瘍部では非腫瘍部と比較して、T細胞の分布は血管周囲に局限し、全T細胞の上皮細胞と接触している時間の合計値は低下していた (図1A)。以上の結果より、

腫瘍微小環境ではT細胞と上皮細胞の接触が減少していることが証明され、T細胞と上皮細胞の接触の減少が、腫瘍微小環境における免疫回避に寄与している可能性が示唆された。次に我々はT細胞と上皮細胞の接触に焦点を当て、IELに発現するCD103と、上皮細胞に発現するE-cadherinに注目した。これら分子の相互作用はIELを腸管上皮間領域に保持するのに重要な役割を果たしていることが知られている。まず免疫染色を行なったところ、腫瘍マウスでは上皮細胞におけるE-cadherinの発現が低下していた。一方でFlow Cytometryを行なったところ、腫瘍部におけるT細胞のCD103の発現率は、腫瘍マウス非腫瘍部および非腫瘍マウスと比較して低下していなかった。そこでCD103の欠損モデルであるitgae^{-/-}マウスとAPC^{min/+}マウスを掛け合わせたところ、小腸腫瘍の数および面積が増加した (図1B)。以上の結果からCD103を欠損し、IELと上皮細胞の接触が低下することにより腫瘍が増加した可

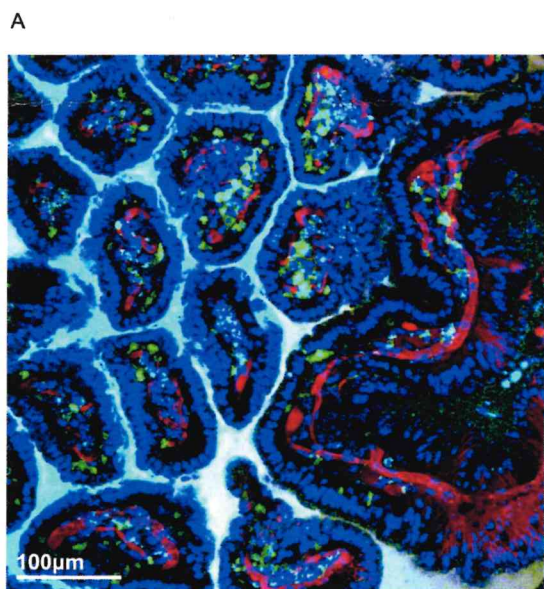
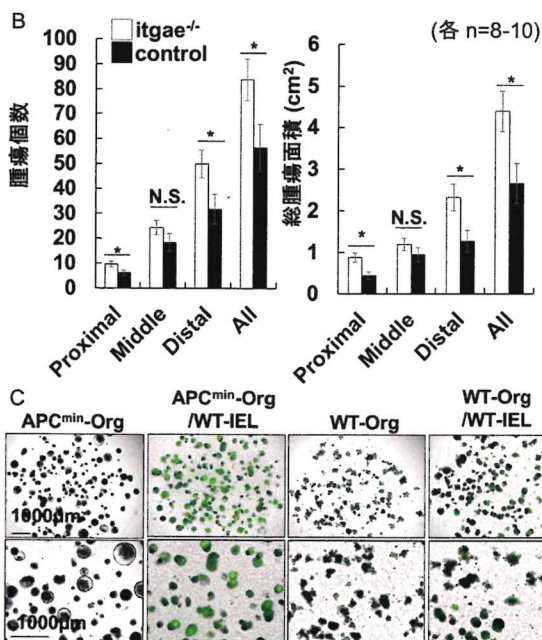


図1 IELはCD103-Ecadherinを介して腫瘍の発育を抑制する。
Morikawa et al. CMGH 2021 (一部改変).



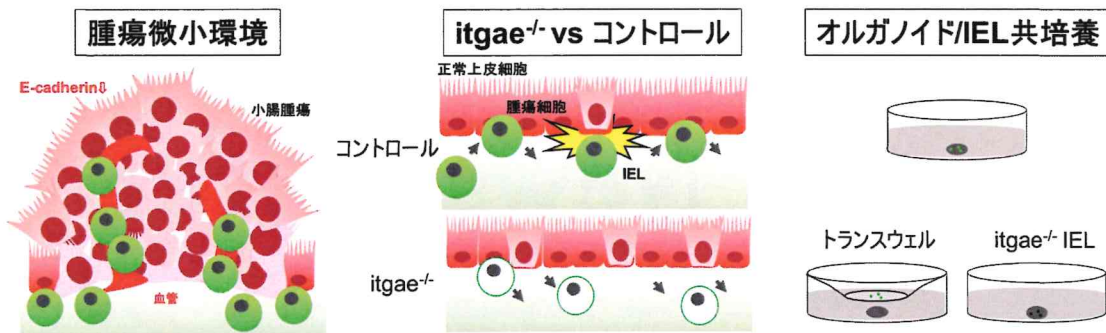


図2 IELと上皮細胞のCD103を介した接触が腫瘍の発育抑制に関与している。

Morikawa et al. CMGH 2021(一部改変).

能性が示唆された。しかしその一方で、CD103が欠損することによるIEL以外の細胞による影響を排除し切ることができないと考えられた。

そこで次に、IELと小腸腫瘍の直接的関係を解析するために、IEL-オルガノイド共培養系を用いる方針とした。IELとAPC^{min/+}マウスの小腸腫瘍から樹立したオルガノイドを共培養したところ、単独培養群と比較して生存上皮細胞数が減少し、IELと野生型マウス小腸より樹立したオルガノイドの共培養群と比較してIEL数が増加していた(図1C)。次にトランスウェルで小腸腫瘍由来オルガノイドとIELを隔てた上で共培養を行なったところ、単独培養群と比較して生存上皮細胞数の減少は見られなかった。次にitgae^{-/-}マウス由来のIELを用いて小腸腫瘍オルガノイドと共培養を行なったところ、単独培養群と比較し

て生存上皮細胞数は減少せず、野生型由来のIELを用いた共培養群と比較してIEL数は少なかった。

結論：小腸腫瘍微小環境ではT細胞の数が減少し、その分布は血管周囲に局限していること、T細胞と上皮細胞の接触が減少していること、上皮細胞におけるE-cadherinの発現が低下していることが証明され、消化管腫瘍マウスにおいてCD103を欠損させたところ腫瘍が増加した。そこでIELと腫瘍の直接的関係を検証するために小腸腫瘍オルガノイドとIELの共培養を行なったところ、IELが腫瘍オルガノイドの発育を抑制し、それには接触およびCD103が重要であることが証明された(図2)。以上よりIELと上皮細胞のCD103/E-cadherinを介した接触が腫瘍免疫に関与していることが証明された。今後は本メカニズムに注目し、E-cadherinの発現を増加

させる薬剤などを用いた抗腫瘍療法の開発を検討してゆきたいと考えている。

この度は、第58回日本消化器免疫学会総会において奨励賞を賜り、誠に恐縮に存じます。この場をお借りしまして日頃よりご指導いただいている渡辺教授、岡本教授をはじめ研究室の先生方に厚く御礼を申し上げます。今回の受賞を励みに今後も消化管粘膜免疫の研究に、より一層尽力してまいりたいと思いますので、引き続きご指導・鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。(森川 亮)



奨励賞受賞 | 第58回日本消化器免疫学会総会(2021年7月2日, 3日 京都ホテルオークラ)

肝臓線維化を主徴とする稀少疾患患者から同定されたNLRP1変異の機能解析

安東 泰希^{1,2} 前原 秋絵¹ 安戸 裕貴^{1,3,4} 安藤 智暁¹ 伊沢 久未¹ 田村 直人² 北浦 次郎^{1,5}

¹順天堂大学 大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター / ²順天堂大学 膠原病・リウマチ内科

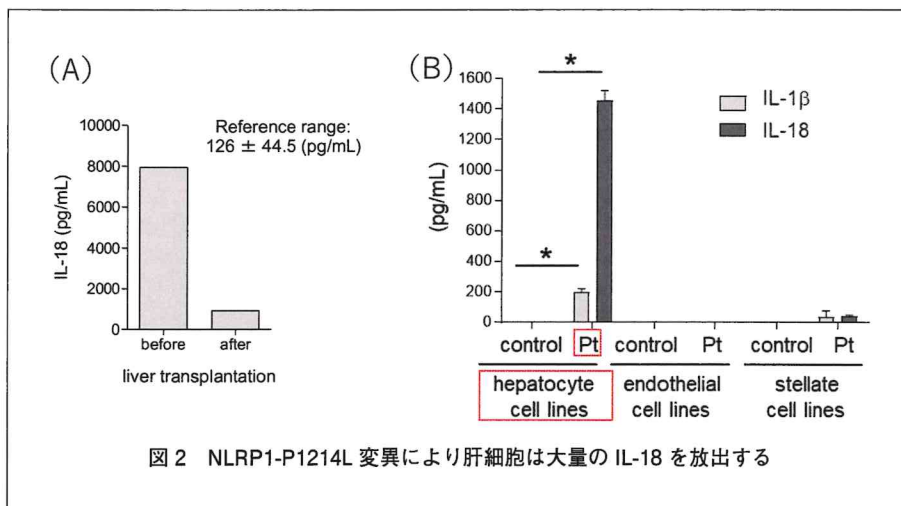
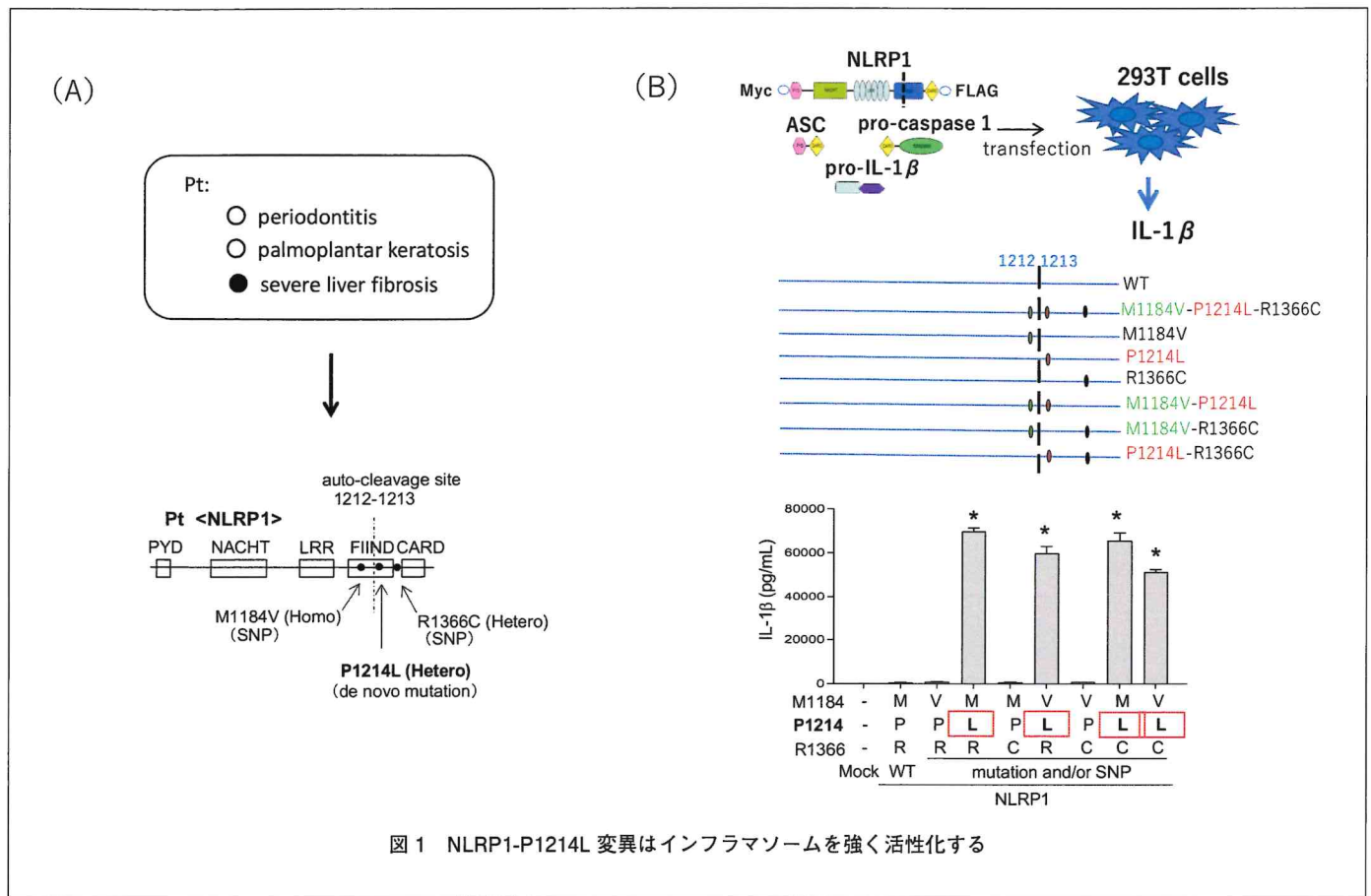
³東京大学 小児科 / ⁴山口大学 小児科 / ⁵順天堂大学 大学院医学研究科 アレルギー・炎症制御学

背景・目的：ヒトNLRP1はN末からPYD・NACHT・LRR・FIIND・CARDと呼ばれるドメインをもつ。NLRP1はASCやpro-caspase-1とインフラマソームを形成して、caspase-1を活性化させる。その結果、pro-IL-1 β やpro-IL-18は成熟型のIL-1 β やIL-18に変換される。細胞外に放出されるIL-1 β ・IL-18が炎症を惹起する。また、インフラマソームにより活性化したcaspase-1はパイロトーシスと呼ばれるプログラム細胞死を誘導する。野生型NLRP1の活性化にはFIINDにおける自己切断やC末のCARDの存在が必要である。近年、NLRP1変異が皮膚の角化異常を主とする自己炎症性疾患の原因となることが明らかになった。今回、我々の研究グループは、重度の肝臓線維化を主徴とする(他、掌蹠角化症、歯牙欠損を伴う歯周病などを有する)稀少疾患患者から、NLRP1のSNP変異(NLRP1-M1184VとNLRP1-R1366C)と

ともに新規の点変異(NLRP1-P1214L)を同定した。尚、P1214LはFIINDの自己切断部位直下に位置した(図1A)。本患者は肝硬変が進行したために生体部分肝移植を受けたが、術後の急性肝不全で死亡した。本研究の目的は、NLRP1変異の機能を明らかにして、本稀少疾患の病態を解明することである。

方法：NLRP1の野生型(NLRP1-WT)あるいはNLRP1変異とASC、pro-caspase-1、pro-IL-1 β (あるいはpro-IL-18)をHEK293T細胞に一過性に発現させてIL-1 β (あるいはIL-18)産生量を測定した(NLRP1によるインフラマソーム活性化能を解析した)。NLRP1-WTあるいはNLRP1-P1214Lに種々の変異(点・欠失変異)を加えて、NLRP1によるインフラマソーム活性化能を解析した。肝臓移植前後の患者血清中のIL-1 β ・IL-18値を測定した。患者の肝臓組織を免疫染色した。患者の肝臓組織から分離した肝細胞・星細胞・血管内皮細胞及びそのコントロール細胞を不死化し、細胞株の産生するIL-1 β ・IL-18量を測定した。また、患者由来肝細胞株のNLRP1あるいはNLRP3をsiRNAで特異的にノックダウンして、肝細胞株の産生するIL-1 β ・IL-18量を測定した。

結果：NLRP1-WTあるいはP1214L、M1184V、R1366Cを一つあるいは複数有するNLRP1変異を解析した結果、P1214Lを有するNLRP1が著しく大量のIL-1 β (あるいはIL-18)の産生を誘導すること、つまり、NLRP1-P1214がNLRP1インフラマソームを極めて強く活性化することが判明した(図1B)。また、NLRP1-WTの場合と同様に、NLRP1-P1214Lによるインフラマソームの活性化には自己切断及びCARDの存在が不可欠であることが示された。次に、肝臓移植前の患者血清を解析したところ、血清IL-18は異常高値(IL-1 β は正常範囲内)を示した。興味深いことに、肝臓移



植により血清 IL-18 値は著減した(図2A)。また、患者の肝臓組織を免疫染色すると、IL-18 の高い発現が主に肝細胞と一致して認められた。さらに、患者由来の肝細胞株だけが強く活性化した caspase-1 を発現し、著しく大量の IL-18 (及び大量の IL-1 β) を恒常的に産生することが示された(図2B)。さらに、患者由来の肝細胞株の NLRP1 を特異的にノックダウンすると、これらのサイトカインの産生は低下することが判明した。これらの結果から、本患者では、肝細胞の NLRP1-P1214L が NLRP1 インフラマ

ソームを著しく強く活性化し、その結果、肝細胞で活性化した caspase-1 が大量の IL-18 と IL-1 β (特に、IL-18) の放出を促進したと考えられる。

結論：P1214L 変異は NLRP1 インフラマソームを強く活性化する。本患者では、肝細胞で NLRP1 インフラマソームが強く活性化して、肝細胞から大量の IL-18 が産生・放出されたと考えられる。IL-1 β と比較して IL-18 の産生量が異常に高いのは、何らかの原因で本患者の肝細胞では pro-IL-18 の産生が上昇していたためかもしれ

ない。肝細胞における NLRP3 インフラマソームの活性化が肝臓繊維化を誘導することが報告されているので、肝細胞における NLRP1 インフラマソームの異常活性化が炎症性サイトカインの産生とパイロトーシスを亢進させて、肝臓繊維化(肝硬変)を誘導したと推定される。本研究により、NLRP1-P1214L が肝臓繊維化を主徴とする自己炎症性疾患を引き起こすことが示された。今後、肝臓繊維化以外の病態にも着目して、本稀少疾患の病態解明を続ける予定である。

この度は第58回消化器免疫学会総会、奨励賞を頂戴し大変光栄に思います。このテーマはまだ未知の部分も多く、新たな疾患群として提唱される可能性もあり今後ますます注目されていく分野であると考えており、研究を進めていく自信をいただきました。未熟な自分をご指導くださいました北浦先生、前原先生をはじめ、研究グループの先生方にも厚く御礼申し上げます。引き続き全容解明を進めて、いい報告ができるよう精進してまいります。

(安東泰希)



腸管炎症における Lysophosphatidylserine の作用解析

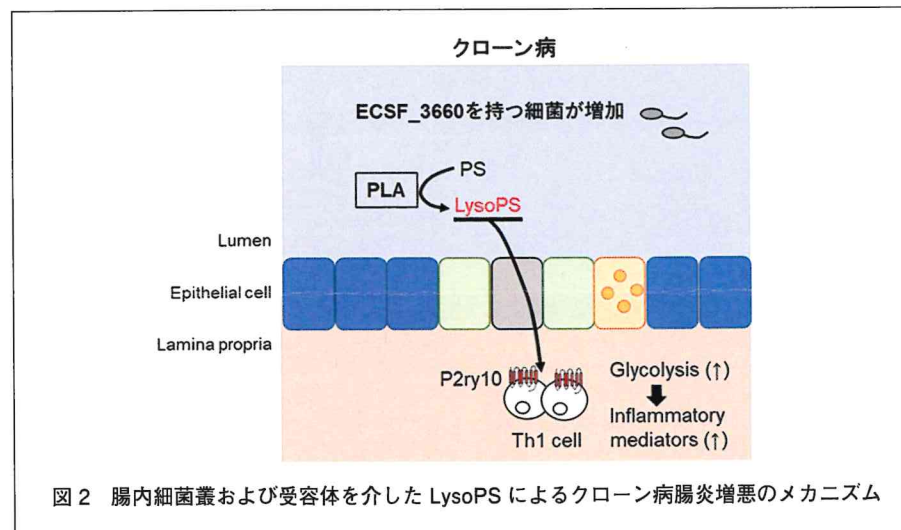
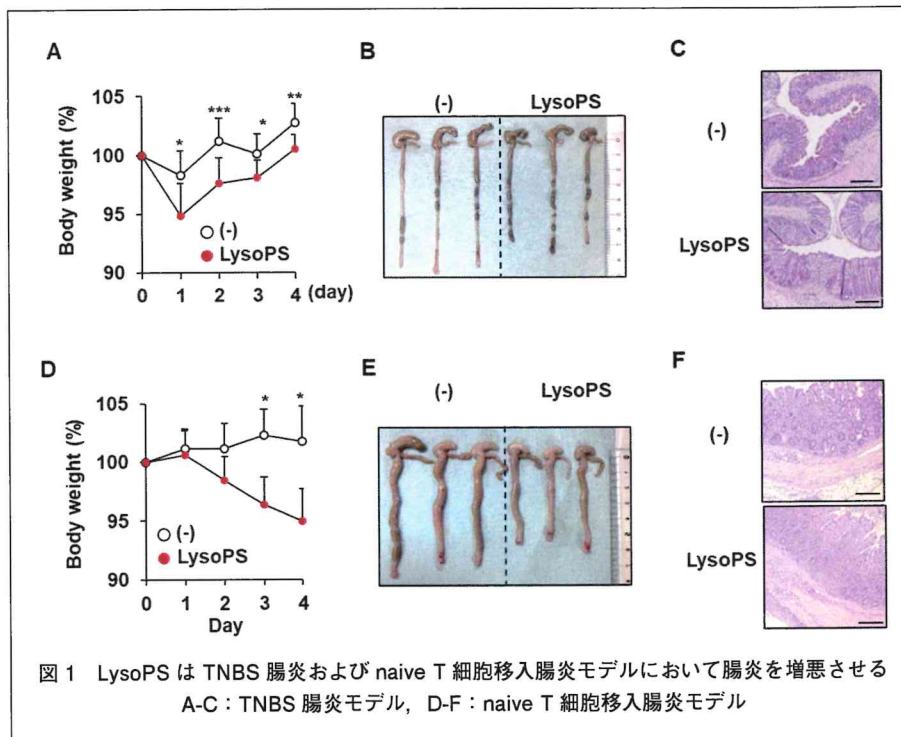
大竹 由利子¹ 香山 尚子^{2,4} 岸川 敏博³ 田代 拓¹ 良原 丈夫¹ 新崎 信一郎¹ 岡田 随象³ 奥崎 大介^{4,5}
 元岡 大祐^{4,5,6} 中村 昇太^{4,5,6} 林 昭夫⁷ 藤田 節子⁷ 飯島 英樹¹ 竹田 潔^{2,4} 竹原 徹郎¹

¹大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 / ²大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学 / ³大阪大学大学院医学系研究科 遺伝統計学 / ⁴大阪大学 免疫学フロンティア研究センター / ⁵大阪大学 微生物病研究所 遺伝情報実験センター / ⁶大阪大学 微生物病研究所 感染症メタゲノム研究分野 / ⁷小野薬品工業株式会社

目的: 近年, 腸内細菌の産生する酪酸による制御性T細胞増殖・腸炎抑制作用や, 脂質代謝物の一つであるスフィンゴシン-1-リン脂質 (S1P) の慢性腸炎増悪作用が報告されており, 脂質代謝物と炎症性腸疾患の関連が注目されている。その他, 種々の脂質代謝物が細胞間のメディエーター分子として生体内で機能する可能性が示唆されているが, その役割は十分に解明されていない。我々はこれまでにクローン病患者血漿中の脂質代謝物の網羅的解析により, lysophosphatidylserine (LysoPS) が健康対照者に比し上昇していることを明らかにしたが, LysoPSの腸管炎症における作用は不明である。本検討では, クローン病患者糞便中の脂質代謝物濃度や腸内細菌叢が健康対照者と比較しどのように変動しているかを検討し, さらに腸炎モデルマウスおよび *in vitro* で培養したT細胞を用いて LysoPSの作用を明らかにすることを目的とした。

方法: クローン病患者および健康対照者糞便中の脂質濃度測定を行い解析した。また, クローン病患者および健康対照者の糞便を用いてショットガンシーケンシング法を行い, クローン病患者の腸内細菌叢における遺伝子発現の変化を検討した。 *In vivo* では, 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 腸炎モデルおよび *Rag2*^{-/-}マウスに野生型naive T細胞を移入したT細胞依存型腸炎モデルを用い, LysoPSを連日投与することによる腸炎への影響を検討した。腸炎の重症度は体重変化, 腸管長, 組織学的炎症スコアにより評価し, 腸管粘膜固有層リンパ球 (LPL) におけるCD4⁺T細胞集団のフローサイトメトリー解析を行った。 *In vitro* では, マウス脾細胞由来naive T細胞をTh1誘導条件下で培養し, LysoPS添加に伴うIFN- γ ⁺CD4⁺T細胞誘導割合の変化をフローサイトメトリー法で解析し, またLysoPS添加に伴う遺伝子発現の変化をRNAシーケンシング法で解析した。LysoPS添加に伴うTh1細胞内代謝の変化については細胞外フラックスアナライザーを用いて解析した。さらにLysoPS受容体欠損マウスを作成し, LysoPS投与による腸炎への影響を検討した。

結果: クローン病患者糞便中において15種類の脂質代謝物の有意な濃度上昇を認め, そのうち血漿でも同様に増加が認められたものはLysoPS分子種のみであった。ショットガンシーケンシング法においては, クローン病患者糞便において α 多様性減少と β 多様性の変動が示され, dysbiosisが生じていることが示され, また腸内細菌叢においてLysoPS産生酵素であるPLAをコードするECSF_3660の有意な発



現増加を認めた。さらにこの遺伝子は大部分が大腸菌由来であると考えられた。TNBS腸炎モデルおよび *Rag2*^{-/-}マウスへのT細胞移入腸炎モデルマウスにLysoPSを腹腔内投与したところ, いずれもLysoPS投与群で腸管長の短縮および腸炎組織学的スコアの上昇を認め, 腸炎が増悪することが示された(図1)。また, T細胞移入モデルのLPLにおけるフローサイトメトリー解析ではIFN- γ ⁺CD4⁺T細胞が増

加しており, Th1病態であるクローン病の発症・重篤化に深く関与することが示唆された。 *In vitro* では, マウスnaive T細胞をTh1誘導条件下でLysoPSを添加し培養したところ, IFN- γ ⁺CD4⁺T細胞の誘導が促進されることが示された。またLysoPS添加Th1細胞におけるRNAシーケンシング解析では, 非添加Th1細胞と比較し代謝関連パスウェイの亢進が示され, LysoPSのTh1細胞内代謝への影響が示唆

された。細胞内代謝アッセイにおいては、LysoPS添加Th1細胞において解糖系、ミトコンドリア呼吸がいずれも促進していることが示された。LysoPS受容体については、既知の受容体の中でP2Y10遺伝子が最もTh1細胞に発現が多く、LysoPSのTh1細胞への作用に深く関与している可能性が考えられた。P2Y10欠損マウスの脾細胞から得たP2Y10欠損naive T細胞を移入したRag2^{-/-}マウスでは、LysoPS投与を行っても有意な体重減少が生じず、Th1細胞増加は抑制され、組織学的にも腸炎の増悪が抑制された。

結論：クローン病患者では便中・血漿中のLysoPS濃度が上昇しており、また糞便

中ではLysoPS産生酵素遺伝子を有する腸内細菌が増加していたことから、クローン病患者糞便中では腸内細菌依存的にLysoPS濃度上昇がみられることが示された。また、LysoPSはその受容体の一つであるP2Y10を介しTh1細胞内代謝を亢進させ、マウスモデルにおける大腸炎増悪に関与することが示された。以上より、クローン病においてはdysbiosisにより生じたLysoPSが腸炎の増悪に関与していることが示唆された(図2)。クローン病の腸内細菌叢へのアプローチ、あるいはLysoPS受容体を介する作用がクローン病の免疫病態に関与する治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

この度は第58回日本消化器免疫学会総会において奨励賞を賜り、誠に光栄に存じます。コロナ禍で困難が多い中、ハイブリッド形式での学会開催に多大なご尽力を頂きました諸先生方に厚く御礼を申し上げます。また、日頃よりご指導頂いております竹原徹郎教授、竹田潔教授をはじめ消化器内科学・免疫制御学の諸先生方にこの場をお借りして心より感謝を申し上げます。今回の受賞を励みに、より一層研究を進展させていきたいと思っております。今後ともご指導、ご鞭撻のほど宜しくお願い申し上げます。(大竹由利子)



奨励賞受賞 | 第58回日本消化器免疫学会総会 (2021年7月2日, 3日 京都ホテルオークラ)

モノクローナルW27 IgA抗体を用いた炎症性腸疾患の腸炎惹起菌の探索

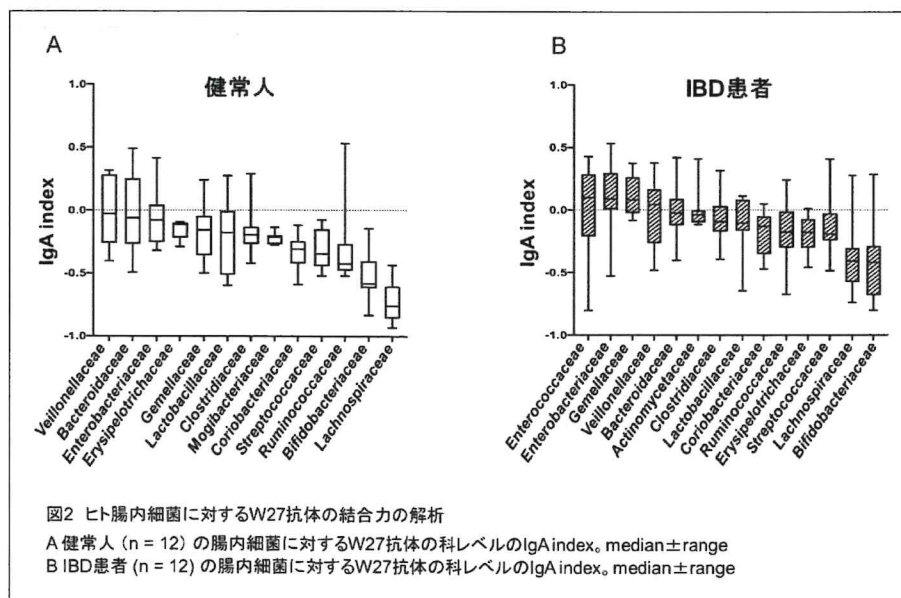
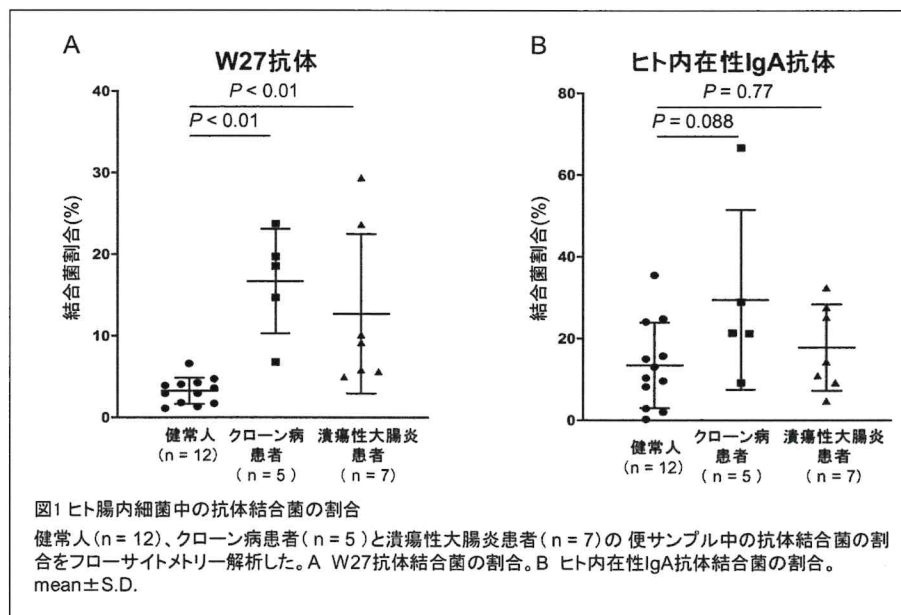
高橋 慧崇¹ 森田 直樹¹ 森 智行¹ 飯田 宗穂² 安藤 朗³ 新藏 礼子¹

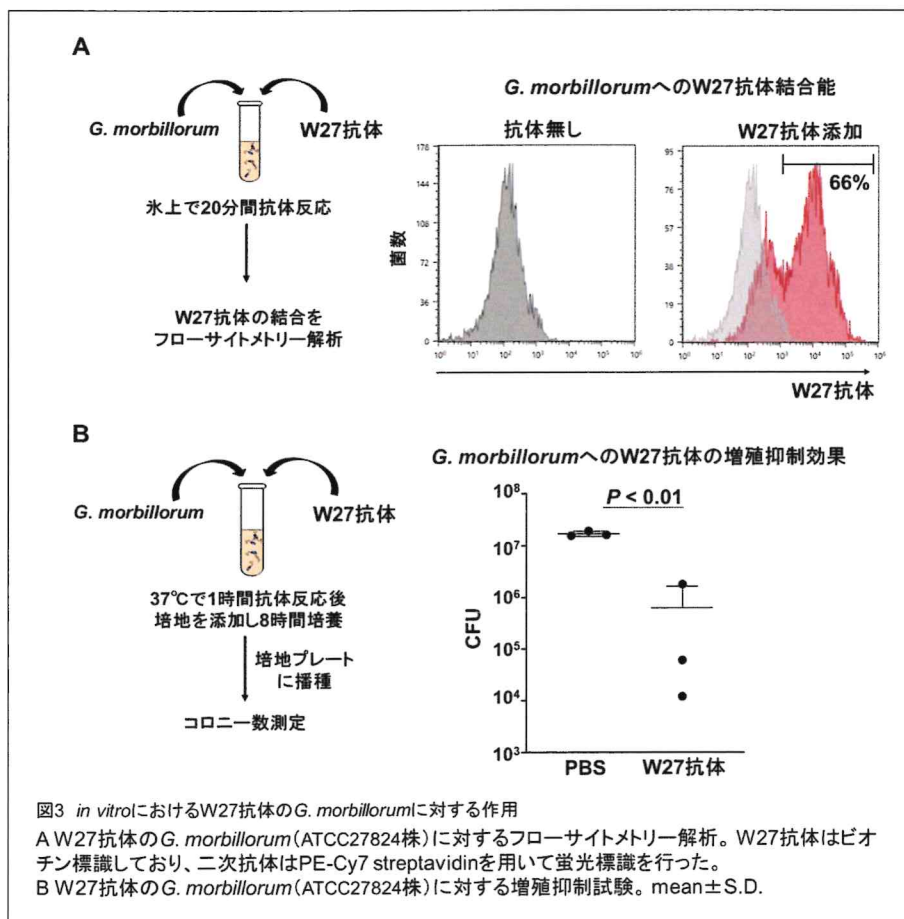
¹東京大学定量生命科学研究 免疫・感染制御研究分野 / ²金沢大学 消化器内科学 / ³滋賀医科大学 消化器内科

背景・目的：炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease: IBD)では腸内細菌叢が乱れており、それらが疾患の発症や増悪に関与していることが報告されている。また、患者ごとで腸内細菌叢が異なるため、腸炎を惹起する原因菌を特定するのは難しい。正常な腸内細菌叢を維持する分子の一つとしてimmunoglobulin A (IgA)抗体が知られている。腸管IgA抗体は腸炎惹起菌の排除や腸管への侵入を防ぐことで腸炎の発症を予防すると考えられる。IBD患者では、健康人と比べて腸内細菌に対するヒト内在性IgA抗体結合菌の割合が増加することが報告され、抗体結合菌の中に腸炎惹起菌が含まれていることが実験的に示されている(Palm et al., Cell, 2014)。しかし、ヒト内在性IgA抗体は発酵菌にも結合しているため、ヒト内在性IgA抗体結合菌から腸炎惹起菌を特定するには限界があると考えられる。

当研究室では、マウス小腸由来のハイブリドーマを作成し、モノクローナルIgA (W27)抗体を同定している(Okai et al., Nature microbiology, 2016)。この抗体は、様々な細菌の中でも、乳酸菌を含む発酵菌よりも大腸菌のような腸炎惹起菌に強く結合するという、病原菌を選別できる特徴を持っている。さらに、W27抗体は大腸菌の増殖を抑制する効果を持つ。そこで、私たちは、マウス由来W27抗体を用いることでヒト内在性IgA抗体結合菌では絞り込みが難しいIBD患者の腸炎惹起菌の探索を行った。

方法・結果：まず、私たちはマウス由来W27抗体がヒトの腸内細菌に結合できるかを評価した。W27抗体結合菌の割合は、健康人と比べIBD患者で有意に増加していた(図1A)。一方で、ヒト内在性IgA抗体結合菌の割合は、健康人とIBD患者間では差は見られなかった(図1B)。既にヒト内在性IgA抗体が結合しているにもかかわらず、W27抗体はヒトの腸内細菌にも結合でき、さらにIBD患者の腸内細菌





には有意により多く結合することが確認された(図1A)。この結果から、W27抗体はIBD患者の腸炎惹起菌に特異的に結合するのではないかと考え、健康人およびIBD患者の便サンプルからヒト内在性IgA抗体結合菌、およびW27抗体結合菌の分離を行った。抗体結合菌の分離は、磁気細胞分離とセルソーターを用いた。ヒト内在性IgA抗体結合菌には発酵菌と腸炎惹起菌の両方が含まれ、一方でW27抗体結合菌には腸炎惹起菌だけが選択的に含まれると予想し、DNAを抽出後、16S ribosomal RNA解析を行った。

得られた解析結果をもとに、IgA indexを算出し、抗体結合菌の同定を試みた。IgA indexは、ある細菌に対して抗体結合菌と非結合菌内の存在量を比較し、抗体結合菌の方により多く濃縮されている場合、IgA indexが正の値を示し、抗体が強く結合した細菌であることを意味する。科レベルで

IgA indexを算出したところ、ヒト内在性IgA抗体が強く結合した細菌は、健康人では腸炎惹起菌を多く含むEnterobacteriaceae科(中央値=0.362)であった(data not shown)。一方、IBD患者ではEnterobacteriaceae科(中央値=0.165)やEnterococaceae科(中央値=0.208)に結合することが確認されたが、発酵菌を含むLactobacillaceae科(中央値=0.385)に最も強く結合することが確認された(data not shown)。

次にW27抗体結合菌の解析では、健康人の腸内細菌に対しては総じて弱い結合を示した(中央値<0, 図2A)。一方、IBD患者では既報の腸炎惹起菌に加え、Gemellaceae科(中央値=0.081)やVeillonellaceae科(中央値=0.045)というこれまで腸炎との関連が特定されていない細菌への結合が確認された(図2B)。この結果から、W27抗体はIBD患者のヒト内在性IgA抗体が結合できない腸炎惹起菌に対して、それを補うよう

に結合することが示唆された。

上記の解析結果で得られたGemellaceae科の菌をOTUレベルで解析したところ、*G. morbillorum*という菌種が健康人では12中4人から1種のみが検出された。一方で、IBD患者では12人中5人から4種の*G. morbillorum*が検出された。そこで、この*G. morbillorum*の基準株(ATCC27824株)に対するW27抗体の結合能をフローサイトメトリーで評価したところ、W27抗体は*G. morbillorum*に対して高い結合能を示した(図3A)。また、W27抗体の特徴である増殖抑制効果を評価したところ、W27抗体は*G. morbillorum*の増殖を抑制することが確認された(図3B)。

結論：マウス由来W27抗体はヒトの腸内細菌に結合し、健康人の腸内細菌と比べてIBD患者の腸内細菌に高い結合能を示した。ヒト内在性IgA抗体結合菌を解析したところ、IBD患者と健康人で強く結合する菌種が異なっていた。IBD患者のヒト内在性IgA抗体は、その抗原認識能が変化していることが疑われた。

W27抗体結合菌の解析により、既報の腸炎惹起菌だけでなく、新規の腸炎惹起菌候補としてGemellaceae科やVeillonellaceae科の菌を見出し、実際にW27抗体が*G. morbillorum*に強く結合し、その増殖を抑制することも確認した。これらの結果から、W27抗体はIBD患者のヒト内在性IgA抗体が結合できない腸炎惹起菌にそれを補うように結合する可能性が示唆された。

今後、IBDの病因の一つとして腸内細菌叢の変化だけでなく、患者の免疫異常、すなわちIgA抗体の質の変化も考慮すべきであると考えられる。また、W27抗体が個々の患者の腸内細菌叢の診断や治療に応用できると期待される。

この度は、第58回日本消化器免疫学会総会にて奨励賞を賜り、大変光栄に存じます。共同研究で大変お世話になっております滋賀医科大学の安藤朗先生、金沢大学の飯田宗穂先生、また、日頃よりご指導いただいております新藏礼子先生をはじめ、研究室の諸先生方にこの場をお借りして、厚く感謝申し上げます。今回の受賞を励みに、より一層研究に尽力して参りますので、今後ともご指導ご鞭撻のほど宜しくお願い致します。(高橋 慧崇)



奨励賞受賞 | 第58回日本消化器免疫学会総会 (2021年7月2日, 3日 京都ホテルオークラ)

脂肪組織期から見た腹膜炎制御メカニズムの解明

長田 律^{1,2} 佐藤 尚子^{1,2} 影山 友子² 赤間 悠一³ 島岡 要³ 大野 博司^{1,2}

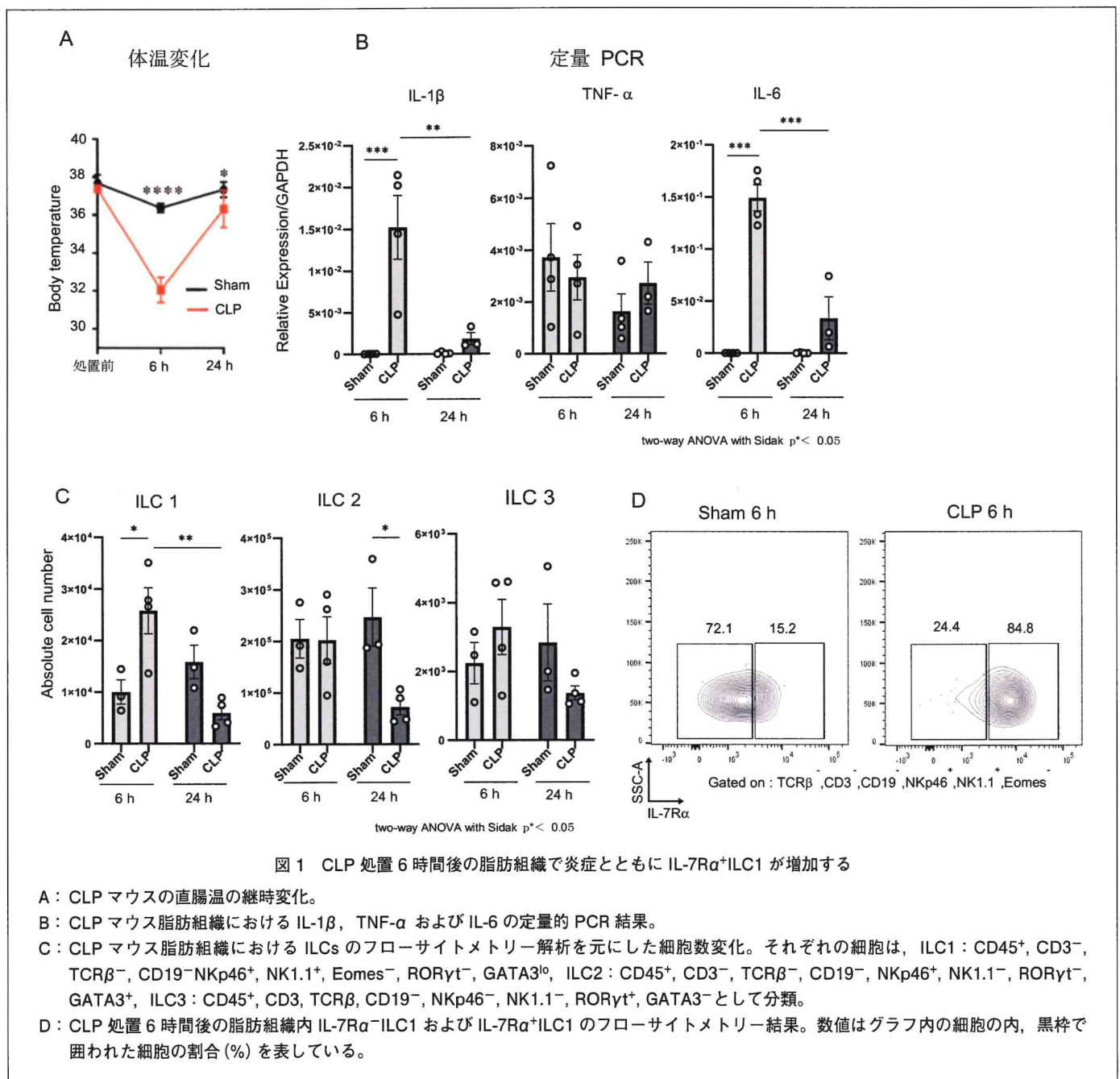
¹横浜市立大学大学院 生命科学研究科 免疫生物学研究室 / ²理化学研究所 生命医科学研究センター 粘膜システム研究チーム /

³三重大学大学院 医学系研究科 分子病態学研究室

背景・目的：敗血症は、感染に対する生体反応の制御不全により多臓器機能不全を引き起こす病態であり、有効な治療法は未だ確立されていない。敗血症発症の一因に

なる腹膜炎は、腸管穿孔により漏出した腸内細菌が腹腔内で増殖して血中に侵入し、炎症が全身に広がることで生じる。細菌感染が引き金となり進行する敗血症は、過剰

な炎症誘導後に生じる免疫抑制期を経て重症化することが知られているが、炎症期から免疫抑制期への移行メカニズムは未だ明らかとなっていない。腸管と脂肪組織は密



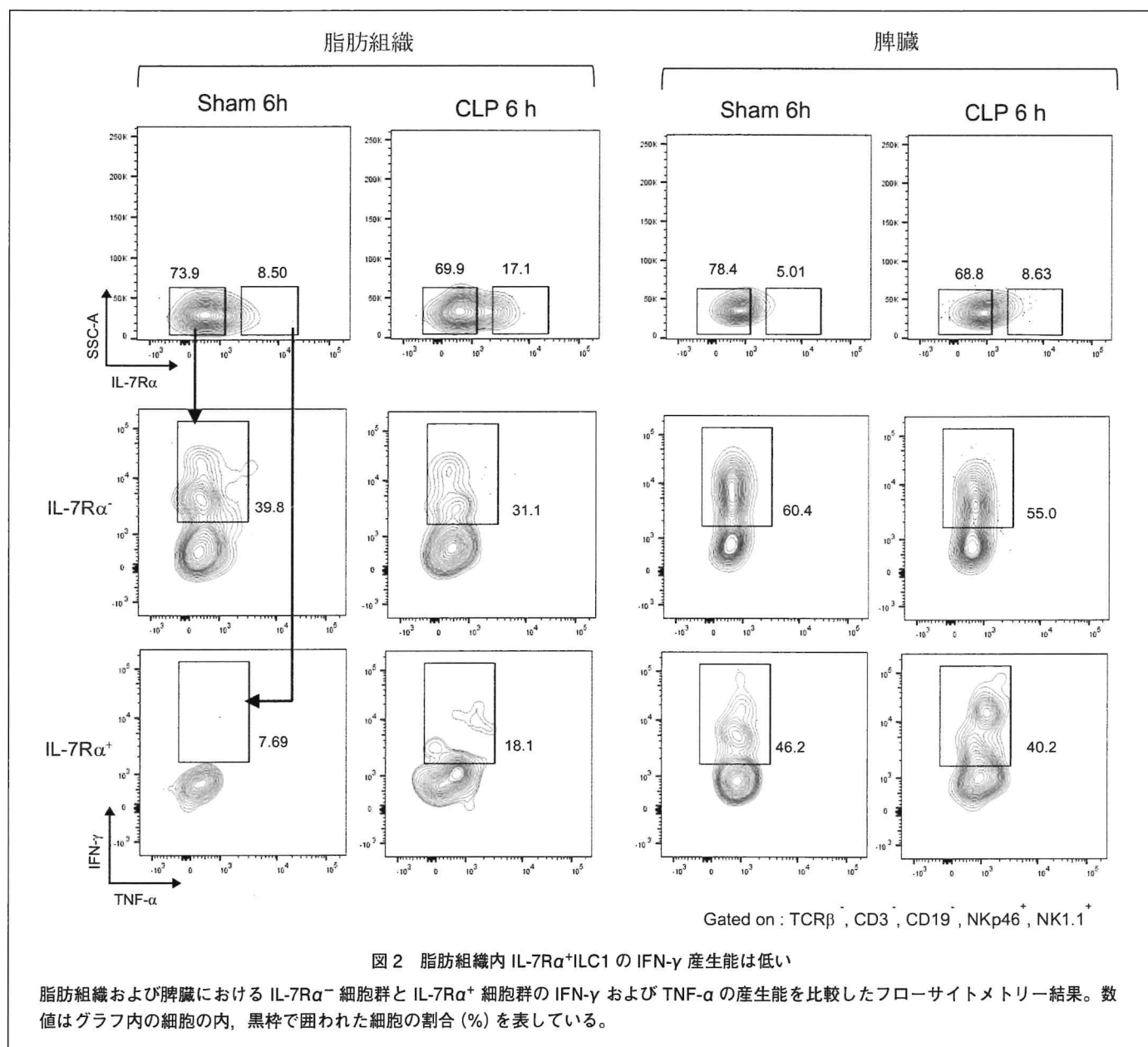
接していることから、腸管穿孔により生じた腸管内容物が腹腔内の脂肪組織にも侵入し腹膜炎の誘導に関与している可能性が考えられるが、敗血症と脂肪組織の関連性について免疫応答の観点から調べた報告はこれまでなかった。

エネルギー貯蔵器官として知られてきた脂肪組織であるが、多数の免疫細胞が存在し、免疫器官としても機能することが、近年明らかとなってきた。実際に、脂肪組織には自然リンパ球(Innate lymphoid cells; ILCs)が存在することが報告され、脂肪組織は様々な疾患への関与の可能性と共に近年注目されている。そこで本研究では、腸管穿孔時における腸間膜脂肪組織の役割について、盲腸を結紮し穴を開ける方法(Cecal ligation puncture; CLP)で腹膜炎を誘導したマウスモデル(CLPMマウス)を用い、特にILCsに着目して解析した。

方法・結果: CLPMマウスは、マウス盲腸

を結紮し注射針で穿孔することにより作製した。また、開腹のみ行ったマウス(Sham)をコントロールとして使用している。まず、CLPMマウスの病態の経時変化を調べるため、CLP処置6または24時間経過時点における直腸温を測定したところ、6時間後に低下し処置後24時間にはShamに近い値まで回復した(図1A)。また、脂肪組織の炎症動態を調べるため炎症性サイトカインであるIL-1 β 、IL-6およびTNF- α の発現量を定量PCRにて測定したところ、IL-1 β およびIL-6の発現量がCLP処置6時間後に有意に増加し、24時間後にはCLP前の値に回復していた(図1B)。以上のことからCLPMマウス脂肪組織における炎症はCLP処置後6時間までに惹起され、24時間までに収束することが示唆された。そこで次に、この炎症の経時変化に脂肪組織内ILCsが関与しているのかを検討する為、CLP 6時間後と24時間後の脂肪組織の解

析を行った。ILCsにはILC1、ILC2およびILC3の3つのサブセットが存在し、共通の前駆細胞から分化する。ILC1は核内転写因子であるT-bet依存的に分化しNatural cytotoxicity receptor(NCR)を発現するためNatural killer(NK)細胞と混同されやすいが、NK細胞とは異なり核内転写因子であるEomesを発現していない。また、ILC2およびILC3はそれぞれ、核内転写因子であるGATA3およびROR γ t依存的に分化する。そこで、脂肪組織から単離した細胞をこれら核内転写因子および細胞表面マーカーの抗体を用いてフローサイトメトリーにより分類し、細胞数変化を解析した。その結果、ILC1(NKp46⁺NK1.1⁺Eomes⁻ROR γ t⁻GATA3^{lo})がCLP処置後6時間で増加し、一方ILC2(NKp46⁻NK1.1⁻ROR γ t⁻GATA3⁺)は6時間後には変化は見られないが24時間後には減少していた(図1C)。この時、ILC3(NKp46⁻NK1.1⁻ROR γ t⁺



GATA3^{hi})に有意な差は見られなかった(図1C)。また、一般的にILCsはIL-7受容体(IL-7 receptor-α; IL-7Ra)の発現が高いことが知られているが、脂肪組織のILC1はIL-7Raを発現していないことがすでに報告されている。しかしながら、CLP処置により増加したILC1のほとんどがIL-7Raを強く発現しており、CLP処置によりILC1のIL-7Raの発現が誘導されることが明らかとなった(図1D)。

ILC1は感染時にIFN-γやTNF-αを産生し炎症誘導に関与することが知られているため、次にCLPにより増加したIL-7Ra⁺ ILC1が産生するサイトカインについて解析した。またこの時、比較対象として脾臓のILC1が産生するサイトカインも同時に解析した。その結果、脾臓では、IL-7Ra⁻およびIL-7Ra⁺ ILC1の両方でIFN-γが産生されていたのに対し、脂肪組織では、興味深いことにIL-7Ra⁻ ILC1はIFN-γを産生しているが、CLPにより誘導されるIL-7Ra⁺ ILC1はIFN-γをほとんど産生していなかった(図2)。以上より、CLP 6時間後の炎症

誘導期にはIFN-γを産生しないIL-7Ra⁺ ILC1が増加することが明らかとなった。

結論：これまで、Single-cell RNA-seq(scRNAseq)を用いた解析によりCLP処置マウスの脂肪組織で免疫細胞の数や種類が変化することは知られていたが、ILCsの数を含めたその詳細な免疫応答についての報告はなかった。本研究で用いたCLP腹膜炎モデルマウスでは、6時間後に炎症が誘導され24時間後にはほとんど収束していた。また、このCLPマウスでは腹膜炎誘導6時間後の脂肪組織内においてIFN-γを産生しないIL-7Ra⁺ ILC1が増加していた。これらの結果は、脂肪組織の炎症時に通常では存在しないILC1が誘導され、病態制御に関与することを示唆している。しかしながら、CLPマウス脂肪組織の炎症制御におけるこのIL-7Ra⁺ ILC1の制御メカニズムおよび詳細な機能は、未だ不明である。ILCsには可逆性があることが知られており、ILC1がILC2やILC3から移行し増加した可能性も考えられるため、今後はscRNAseqなどの手法を用いてILC1の

機能・増加機序を明らかにする必要がある。

以上より、脂肪組織におけるILCsをターゲットとした本研究による結果は、腹膜炎発症時における免疫制御メカニズムの理解に繋がると考えられ、最終的には新たな腹膜炎制御法を考えるうえで重要な知見になり得ると考えられる。

この度は第58回日本消化器免疫学会総会において奨励賞を頂戴し、大変光栄に存じます。大変な時世にも拘わらず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に深く感謝申し上げます。また、日頃からご指導してくださっている大野博司先生、佐藤尚子専任研究員、また共同研究でお世話になっております三重大学の赤間悠一先生、島岡要先生に改めて感謝申し上げます。今回の受賞を励みに一層精進していく所存です。今後ともご指導ご鞭撻の程、よろしくお願い申し上げます。(長田 律)

