

NewsLetter Vol.23 No.5

奨励賞受賞 | 第59回日本消化器免疫学会総会（2022年7月28日、29日 大阪国際会議場）

1細胞遺伝子発現解析を用いた、大腸における線維芽細胞の機能解析

萩原 裕也¹ 石原 利乃¹ 高田 祐明¹ 角田 潤也² 岩田 賢太郎¹ 松井 信平² 清島 亮²
茂田 浩平² 稲垣 豊³ 岡林 剛史² 佐藤 俊朗⁴ 三上 洋平¹ 金井 隆典¹

¹慶應義塾大学 医学部 内科学（消化器）、²慶應義塾大学 医学部 一般・消化器外科、

³東海大学 医学部 先端医療化学、⁴慶應義塾大学 医学部 坂口光洋記念講座 オルガノイド医学

背景・目的：腸管における慢性炎症に起因する炎症性腸疾患(IBD)の罹患者数は近年増多の一途をたどっており、それに追隨する形で治療選択肢も広がってきてている。抗炎症療法が進歩する一方で、線維化とそれに伴う狭窄症状の決定的な治療法はなく、依然として狭窄を呈した局所腸管に対して内視鏡的な拡張術なし外科的治療が選択されているのが現状である。線維化の本体は過剰な細胞外基質の蓄積とされるが、実際は上皮と血球、間葉系細胞とそれらを取り巻く腸内細菌叢あるいは種々のサイトカイン・ケモカインといった微小環境によって形成される複雑系である。線維化に対する治療薬が欠如している一因として、このような腸管線維症の根底にあるメカニズムに対して他臓器と比較しても不明点が多いことが挙げられる。これらを紐解くために、我々は間葉系細胞、の中でも線維芽細胞にスポットをあて、まず定常状態の解析を行うことで機能を特定することを考えた。また、近年急速に進歩をみせるRNA sequencingは、細胞集団ないし1細胞単位の遺伝子発現(トランск립トーム)の解析が可能であり、本研究の目的達成に極めて有用と考え同技術を併用して実施した。

方法・結果：最初にマウスの大腸における粘膜固有層單核細胞(LPMC)を採取し、フローサイトメトリ解析(FCM)において、それぞれの古典的な定義に基づいて血球細胞(CD45⁺ cells)や内皮細胞(CD31⁺)および上皮細胞(EpCAM⁺)を除外することで線維芽細胞の抽出を行った。このようにして得られた線維芽細胞集団は、他臓器においては線維芽細胞の表面マーカーとして用いられることが多いPDGFR α などの発現レベルにより細分化されることがわかり、タンパク発現レベルにおいてheterogeneityを有することが明らかとなった。より多面的かつ客観的な視点から集団の細分化やその生理学的意義にアプローチするため、広義の線維芽細胞集団をsortingした上でsingle-cell RNA sequencing(;scRNA-seq)を行なった。

このライブラリから得られたデータにprincipal component analysis(;PCA)およびUniform Manifold Approximation and Projection(;UMAP)を用いることで、細胞同士の遺伝子発現の近似性を評価し、多様な細胞の関連性を可視化した。1%未満

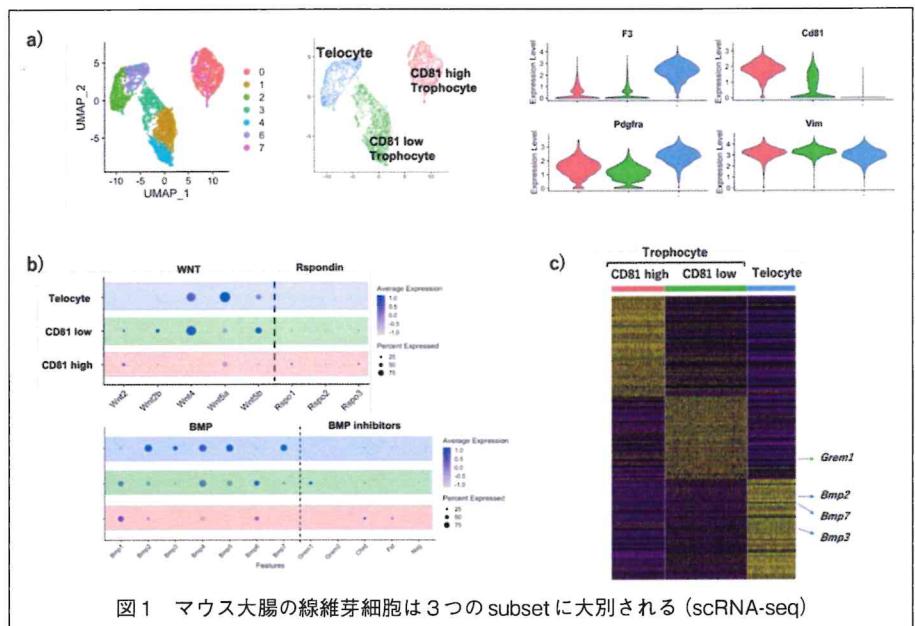


図1 マウス大腸の線維芽細胞は3つのsubsetに大別される(scRNA-seq)

のminor population, contaminationを除いて解析を行って複数のClusterが得られた。これらはF3^{high}/F3^{low}に大別、更にF3^{low}な集団はF3^{low} CD81^{high}, F3^{low} CD81^{low}といったsubsetに細分化可能であった(図1a)。腸幹細胞(ISC)の微小環境を形成する因子(Niche Factor)としてWNTやR-spondinなどが知られているが、F3^{low} CD81^{high}, F3^{low} CD81^{low} subset(Trophocyte)はいずれもR-spondin関連遺伝子を高発現していることが示された。また、F3^{high} subset(Telocyte)は上皮分化に重要なBMP family遺伝子を高発現しているのに対して、F3^{low} CD81^{high}, F3^{low} CD81^{low}集団(Trophocyte)ではBMP inhibitor遺伝子が相対的に多く発現していた。すなわち、これらの線維芽細胞集団が線維化という病的な側面のみならず、上皮再生といった側面からも腸管恒常性の維持に寄与している可能性を示した。

統いてヒト大腸においてもCD31, CD45, EpCAMをLineageマーカーとして、マウスと同様に血球、内皮、上皮細胞を除去した上で広義の線維芽細胞を抽出し、scRNA-seq解析を行なった。前述の手順で次元削

減を行なってminor population, contaminationを除外すると、6つのClusterに細分化され、2つのsubset(F3^{high}, F3^{low})として可視化された(図2a)。そしてF3^{high} subsetはマウス同様にBMP family遺伝子を高発現しており、Telocyteに近い性質と考えられた。他方F3^{low} subsetはRsp03やBMP inhibitor関連遺伝子を高発現するclusterを内包しており、Trophocyteとしての役割を担っていることが示唆された(図2a)。これらが生体内で実際に機能し得るのかを検討するため、線維芽細胞と上皮オルガノイドの共培養を実施することとした。まず、FCMを用いて汎線維芽細胞集団のうちF3^{high}, F3^{low}集団を同定、sortingによりこれらを回収し、①オルガノイド単独培養②オルガノイド+F3^{high}線維芽細胞共培養③オルガノイド+F3^{low}線維芽細胞共培養の3群を作成した。培養条件としては、1) monocultureの発育に必要な成分を全て含むmedium(optimal), 2) Optimalな条件からWntを除いたもの, 3) Optimalな条件からWntを除いてC59を添加したもの、という3種類を用いた。なお、C59はWntの分泌に重要

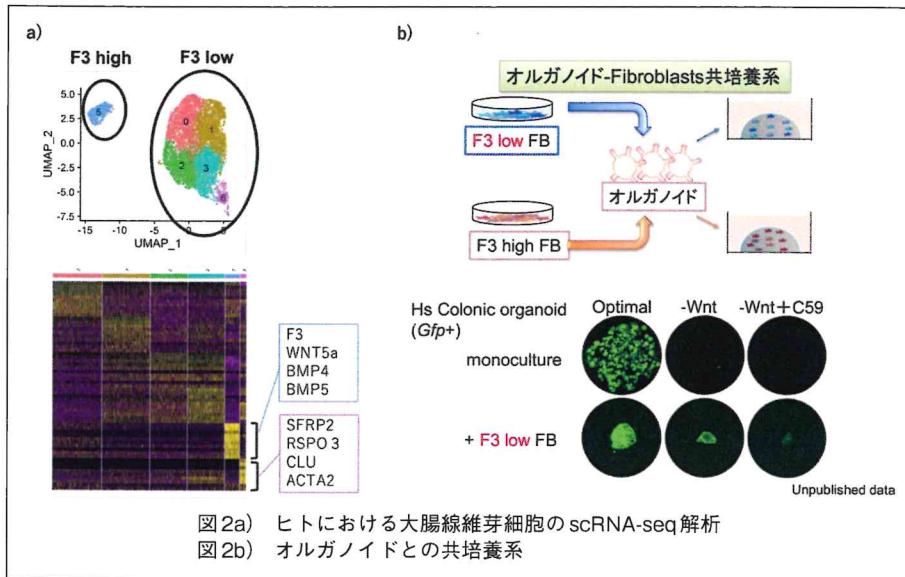


図2a) ヒトにおける大腸線維芽細胞のscRNA-seq解析
図2b) オルガノイドとの共培養系

なPORCNに対する阻害剤である。想定された通りオルガノイドの単独培養はOptimalな条件下でのみ発育可能であった。一方で、F3 low線維芽細胞とオルガノイドの共培養では、Wntを除いた培地でもオルガノイドが発育可能であり、更にC59を添加すると発育が抑制された(図2b)。すなわちF3^{low}線維芽細胞はNiche供給因

子として機能している可能性が示唆された。

結論：これまで線維芽細胞はDesmin(-) Vimentin(+)といった形で、単一の細胞集団として定義されることが多かった。今回の研究によりマウスの大腸において、実際には上皮分化に重要なBMPファミリーに豊富なTelocyteや、WNT・R-spondinなどのISCのNiche Factorを高発現する

Trophocyteといった特徴の異なる線維芽細胞集団の存在することが明らかとなった。ヒト腸管切除検体においてもscRNA-seqの解析により、マウス同様にBMP陽性の集団とWNT陽性の集団が存在することが明らかとなった。加えてTrophocyteとオルガノイドとの共培養により、同集団にNiche供給因子としての生理学的機能があることが示唆された。このように線維芽細胞が線維化という病的な側面のみならず、上皮再生といった側面からも腸管恒常性の維持に寄与している可能性を示した。これらの亜集団が定常状態以外のフェーズ、すなわち炎症周期や創傷治癒、あるいは線維化といった状況でどのような異なる役割を担うのか更なる検討が必要と考える。

この度は第59回日本消化器免疫学会において奨励賞を賜り、誠に恐縮に存じます。未熟な私に対して熱心にご指導くださいました金井教授や三上先生はじめ、研究グループの方々にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。今回の賞を励みに、引き続き全容の解明に向けて、尽力してまいります。今後ともご指導ご鞭撻の程、よろしくお願ひ申し上げます。(萩原裕也)

奨励賞受賞！第59回日本消化器免疫学会総会（2022年7月28日、29日 大阪国際会議場）

B型慢性肝疾患における液性免疫評価のための抗HBs IgG ELISPOTプロトコルの最適化に関する検討

福富 啓祐 斎田 隼人 西尾 啓 下田 彰允 福岡 誠
村井 一裕 小玉 尚宏 阪森 亮太郎 畿 智秀 竹原 徹郎

大阪大学 大学院 医学系研究科 消化器内科学

背景・目的：B型肝炎ウイルス(HBV)の母子感染予防における高容量免疫グロブリン(IVIG)の効果や、HBV既感染の血液悪性腫瘍患者における抗CD20抗体治療に伴うHBV再活性化等から、HBVの感染制御において液性免疫が重要な役割を担っていることは従前より知られているが、B型慢性肝疾患の病態形成におけるHBV特異的B細胞の役割に関しては依然として不明な点が多い。HBVの感染肝細胞からはウイルス粒子の数の10万倍に上る大量のHBs抗原粒子(Subviral particles: SVPs)が放出され、HBVに対する中和抗体である抗HBs抗体に対してデコイの役割を果たしていると考えられている。產生された抗HBs抗体は血液中に大量に存在するHBs抗原(HBsAg)に結合して抗原抗体複合体を形成するため、血清遊離HBs抗体は多くの患者で検出できない。そのため現在日常臨床で利用可能な測定系では患者の抗体產生能(液性免疫)を評価することは困難である。近年、蛍光標識抗原とフローサイトメーターを用いたHBV抗原特異的メモリーB細胞に関する研究が報告され、その免疫学的表現型等が少しづつ明らかになってきている。さらに今日、B型慢性肝疾患の新規治療戦略として、液性免疫を含めた宿主獲得免疫の賦活化を目的とした治療ワクチンの開発が進められている。B型慢性

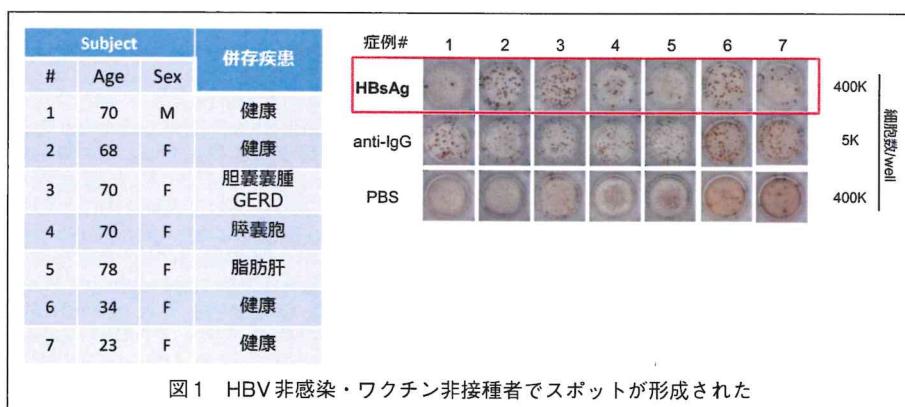


図1 HBV非感染・ワクチン非接種者でスポットが形成された

肝疾患者の液性免疫の評価系の確立は今後益々重要である。今回我々は、抗原特異的メモリーB細胞の抗体產生能を評価する方法として旧来から知られているEnzyme-linked Immunospot(ELISPOT)法を用いて抗HBs抗体產生能を評価するため、そのプロトコルの最適化を目的として本研究を行った。

方法・結果：まずははじめに、市販のIgG ELISPOT試薬ならびに酵母由來のリコンビナントHBsAgを用いて検討した。ワクチン接種後の抗HBs抗体陽性ドナー(陽性

コントロール)またはHBV未感染かつワクチン接種歴のないドナー(陰性コントロール)から単離した末梢血単核球(PBMC)を市販キットに添付のプロトコルに沿ってR848(TLR7/8アゴニスト)ならびにリコンビナントIL-2にて4日間刺激培養し、PBMC中のメモリーB細胞をIgG分泌細胞へと分化誘導した。一方でELISPOTプレートのPVDF膜を組み換えHBsAgまたは抗IgG抗体で被覆した。そこに刺激培養後のPBMCを添加し、4時間の培養後にHorse Radish Peroxidase(HRP)

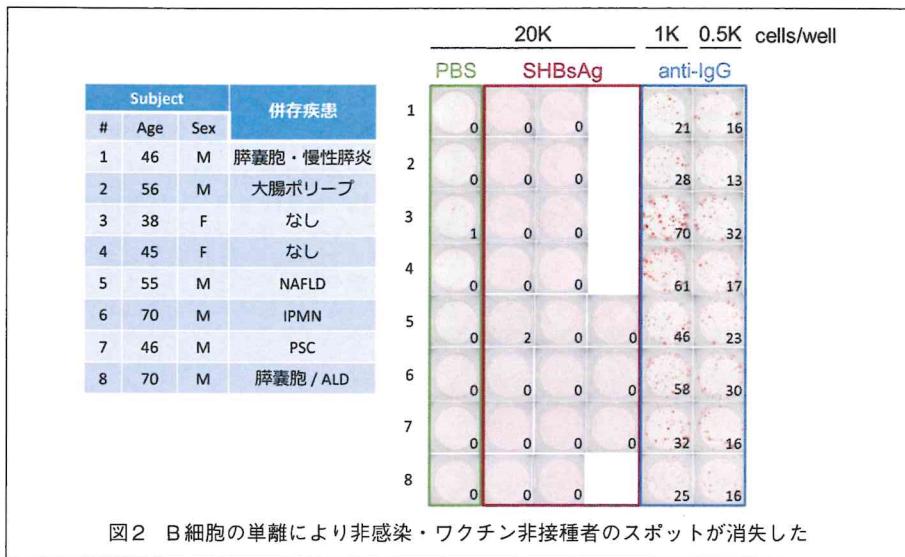


図2 B細胞の単離により非感染・ワクチン非接種者のスポットが消失した

結合抗IgG抗体ならびに3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)による反応にてスポットを発色させ、ELISPOTリーダー(エリフォトカウンター、ミネルヴァテック社)にてスポット数を計測した。陽性コントロールで良好なスポットを認めた一方で、陰性コントロールでも同様にスポットが観察され(図1)、HBsAg非特異的IgGを検出している可能性が示唆された。使用する抗原やELISPOTプレート、キットの変更などを試みるも顕著な改善は認められず、次にPBMCからのB細胞の単離の必要性について検討した。刺激培養後の細胞集団をフローサイトメトリーで解析したところ、刺激培養によるメモリーB細胞の活性化(CD27+ CD21-メモリーB細胞)と形質細

胞への分化誘導を確認した一方で、B細胞に比して圧倒的多数のT細胞が継続して存在しており、T細胞存在下でのB細胞刺激培養により非特異的抗体産生が誘導される可能性が懸念された。そこで刺激培養前に磁気ビーズにてB細胞(メモリーB細胞ならびにナイーブB細胞)をネガティブセレクションにて単離し、同様に刺激培養を行った。B細胞単離でもメモリーB細胞の活性化とIgG分泌細胞への良好な誘導を確認した。その後同様のプロトコルにてELISPOTを行ったところ、陰性コントロールでの抗HBsAg IgGスポットは消失し(図2)、陽性コントロールでの抗HBsAg IgGスポットを検出した。これによりHBsAg特異的IgG分泌を観察しているも

のと考えられた。以上のプロトコルにてワクチン接種者の血清抗体価とELISPOTでのスポット数を検討したところ有意な相関を認めず、血清抗体価で測れない抗体分泌能を評価できるものと考えられた。

考案・結論: HBV研究においてB細胞ELISPOTが行われている既報を検索すると、B細胞の単離の有無や刺激培養は諸家により異なり、非常に煩雑なプロトコルが散見された。近年ではHBsAgを蛍光物質で標識したプローブを用いてHBV特異的メモリーB細胞をソーティングし、それを培養してからELISPOTに用いるという報告が複数みられた(Salimzadeh L, et al. J Clin Invest 2018; 128: 4573-4587., Le Bert N, et al. J Hepatol 2020; 72: 34-44.)。一方で、本検討のように市販のIgG ELISPOTキットにB細胞単離を組み合わせた報告は見られなかった。HBs抗原特異的IgG ELISPOTにおいてはB細胞の単離が重要であると考えられた。

この度は奨励賞の栄誉を賜り光栄に存します。



大阪大学大学院にてご指導頂きました竹原徹郎教授、疋田隼人先生に感謝いたします。またELISPOTプロトコルに関しご助言を賜り

ました医薬基盤・健康・栄養研究所の長竹貴広先生、国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センターの由雄祥代先生、吉川詩織先生に深謝申し上げます。私は現在、米国NIHにてB型・D型肝炎ウイルスに対する宿主免疫応答の解明をテーマに研究に従事しております。今回の受賞を励みに引き続き精進して参ります。

(福富啓祐)

奨励賞受賞 | 第59回日本消化器免疫学会総会 (2022年7月28日, 29日 大阪国際会議場)

肝マクロファージのオートファジー障害はLSECのケモカイン遺伝子発現亢進を伴いNASH病態進展に寄与する

福本 賢二 斎田 隼人 明神 悠太 坂根 貞嗣 村井 一裕 牧野 裕紀
西尾 啓 小玉 尚宏 阪森 亮太郎 義 智秀 竹原 徹郎

大阪大学 大学院 医学系研究科 消化器内科学

背景・目的: オートファジーはリソソームによってオルガネラを消化するメカニズムであり、飢餓時の生存システムとして細胞保護的に機能する。様々な疾患においてオートファジー障害の関与が注目されており、我々は肝細胞オートファジー障害がNASH病態進展に寄与することを報告してきた(Tanaka S, et al. Hepatology 2016)。NASHを含む肝炎においてマクロファージは中心的な役割を担うが、マクロファージのオートファジーがNASH病態に与える影響について詳細は分かっていない。これを明らかにする目的で肝類洞内皮細胞(LSEC)との相互作用に注目し検討を行った。

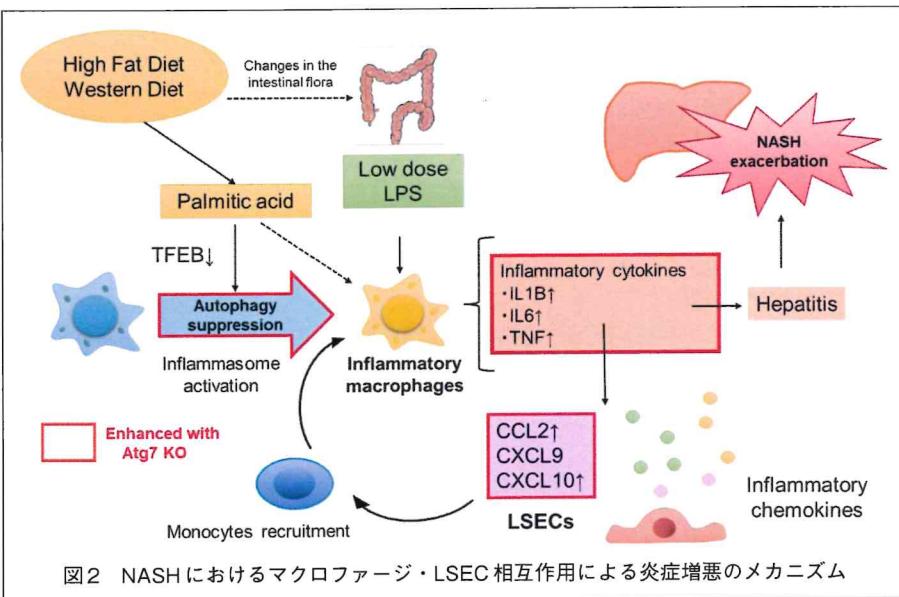
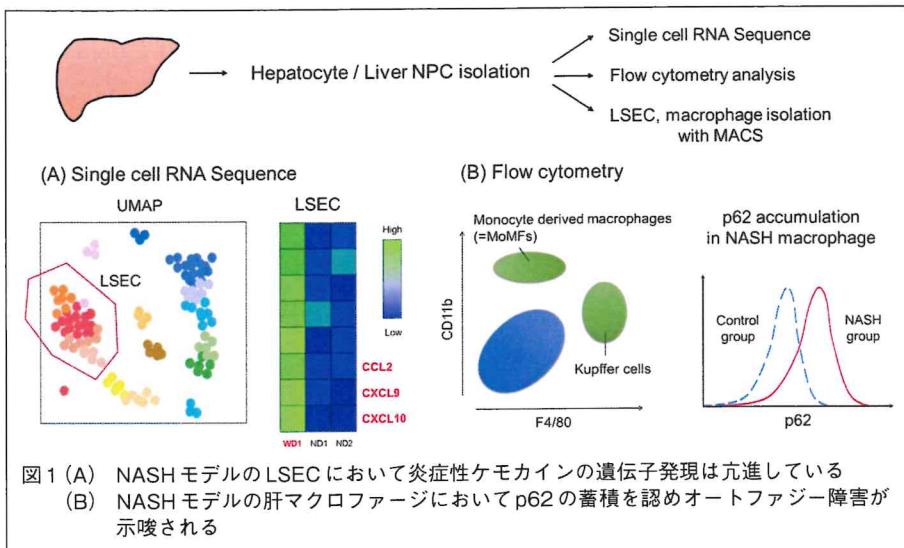
方法: In Vivo実験として野生型マウスにHigh Fat Diet(HFD)・Western Diet(WD)を12週間あるいは24週間投与しNASHを誘導した。また野生型あるいは骨髄由来細胞特異的Atg7 KO(LysM-Cre Atg7 KO)マウスに対してLPS腹腔内投与により肝炎を惹起し、MACSにて肝マク

ロファージ(F4/80陽性細胞)とLSEC(CD146陽性細胞)を回収し検討した。In Vitro実験としてヒト単球細胞株THP-1由来マクロファージを用い、パルミチン酸がマクロファージへ与える影響を検討した。またCRISPR-Cas9 systemによりオートファジー必須遺伝子であるAtg7をKOしたTHP-1細胞を作成した。またLSEC株であるTMNK-1を用い、マクロファージの液性因子がLSECに与える影響を検討した。

結果: HFD/WD群におけるマウス肝組織のTNF α , CCL2, CXCL10等の炎症関連遺伝子発現はNormal Diet(ND)群と比較し亢進した。肝組織Single cell RNA sequenceではWD群の肝類洞内皮細胞においてCXCL10やCCL2をはじめとする炎症性ケモカイン遺伝子発現が亢進していた(図1A)。転写因子EB(TFEB)はリソソーム生合成やオートファジーを制御するタンパクである。Western Blottingによる評価ではWD群で肝組織におけるTFEBの減弱とp62の増加を認めた。またFCMで測

定した肝マクロファージの細胞内p62量もWD群で増加を認め(図1B)、オートファジー障害による蓄積が示唆された。

THP-1由来マクロファージにパルミチン酸を投与すると、核内TFEB量は減少しLC3やp62蓄積を伴うオートファジー障害を認めた。パルミチン酸やバフィロマイシンの投与、あるいはAtg7 KOによるオートファジー障害は、インフラマソームの活性化を伴いLPS刺激時のマクロファージのIL1 β やTNF α などの炎症性サイトカイン分泌を亢進させた。LPS刺激下THP-1由来マクロファージのConditioned medium(CM)を作成しTMNK-1へ添加し培養したところ、Atg7 KOマクロファージで作成したCM添加群ではTMNK-1のCCL2, CXCL10などのケモカイン遺伝子発現がコントロールと比較し著明に亢進した。この効果はIL1レセプター阻害薬や抗TNF α 抗体の併用で減弱を認め、マクロファージCM中の炎症性サイトカインの影響が考えられた。また機序としてはJNK



やNF- κ B活性化による転写の亢進が考えられた。

LPS腹腔内投与モデルにおいてLysM-Cre Atg7 KOマウスは野生型と比較しALTや血清Caspase-3/7活性値は増加し、肝障害は増悪した。またLysM-Cre Atg7 KOマウスの肝組織ではインフラマソームの活性化とともに分泌型IL1 β タンパク量は増加し、MACSで回収したLSECにおいてCCL2やCXCL10などのケモカイン遺伝

子発現は亢進した。またLysM-Cre Atg7 KOマウスの肝組織において炎症性マクロファージマーカーのNOS2は亢進しており、上記ケモカイン亢進による単球・マクロファージの動員による影響が考えられた。

結論：NASHにおいて肝マクロファージはTFEB減弱によるオートファジー障害を来しており、インフラマソームの活性化に伴い炎症性サイトカイン分泌が惹起されている可能性が示唆された。またマクロ

ファージ由来の炎症性サイトカインはLSECのケモカイン遺伝子発現亢進をさせ、さらに肝内への炎症性細胞を動員することでNASH病態増悪のサイクルを起こしている可能性が示唆された(図2)。今回マウスを用いた検討ではマクロファージへの介入により炎症増悪のメカニズムを検討した。LSECとの相互作用についてより理解を深めるために、今後はLSECに介入したNASHモデルでの検討を予定している。また炎症や肝障害のみではなく線維化や発癌などへの関与についても検討したいと考えている。

オートファジーは細胞の恒常性維持のため重要な役割を持っているが、生体におけるオートファジーの評価法は確立しておらず臨床との関連の立証は非常に難しい。しかし本検討のように間接的にオートファジー障害と疾患の関連を示す根拠は蓄積されており、オートファジーをターゲットとした創薬の開発が期待されている。近年ではアルツハイマー病をはじめ様々な疾患におけるリソーム機能障害の関与が注目されている。リソーム機能はオートファジーとも密接に関与しており、今後は肝疾患においてもリソーム機能を中心とした解析も行う予定である。

Single cell RNA sequenceを用いた解析の登場により、肝疾患において肝内非実質細胞それぞれのもつ特性が徐々に明らかになりつつある。一方で細胞間相互作用については共培養や培養上清を用いたin vitroでの検討が中心となっており、オートファジーと同様にin vivoでの検証が難しい。現在臨床組織サンプルを用いた空間的解析についても技術開発が進んでおり、今後新たな視点からの肝疾患メカニズム解明が期待される。

この度は第59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。日頃よりご指導いただいております竹原教授、疋田先生はじめ研究室の



先生方に厚く感謝申し上げます。試行錯誤が続く中で今回の受賞は大変励みになりました。研究を続ける自信となりました。肝微小環境における疾患メカニズムについては分からぬことが多い、引き続き解明に向け精進してまいりますので今後ともご指導ご鞭撻のほど何卒よろしくお願ひいたします。

(福本賢二)