



日本消化器免疫学会事務局  
〒162-0822 東京都新宿区下宮比町 2-28-703  
TEL: 03-3268-6501 FAX: 03-6280-8850

# NewsLetter Vol.24 No.2

## 第2回「若手学術賞」

### Lysophosphatidylserines derived from microbiota in Crohn's disease elicit pathological TH1 response

大竹 由利子 (大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学)



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(SIP)の腸炎増悪作用が報告されており、腸内細菌および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。我々は先行研究にて炎症性腸疾患患者の血漿中脂質代謝物の網羅的解析を行い、特にクローン病患者血漿中でlysophosphatidylserine(LysoPS)が健康対照者に比し有意に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った。本研究では、クローン病患者糞便中の腸内細菌叢の変動、および脂質代謝物濃度の変化を解析し、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。

まず、クローン病患者および健康対照者糞便中の脂質濃度を網羅的に解析したところ、クローン病患者糞便中において15種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。さらに腸内細菌からのLysoPS産生の可能性を考え、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量の変化を検討した。その結果、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、確かにdysbiosisが生じていることが示され、またクローン病患者腸内細菌叢においてLysoPS産生酵素であるphospholipase A(PLA)をコードする遺伝子である*ESCF\_3660*の有意な増加を認めた。さらにこの遺伝子は大部分が大腸菌由来であることも示された。

そこで、次に*in vivo*マウス腸炎モデル

におけるLysoPSの腸炎への作用検討を行った。クローン病類似モデルとして2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS)腸炎モデル、および*Rag2*<sup>-/-</sup>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を連日腹腔内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<sup>+</sup>T細胞集団のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、いずれのモデルでも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。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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞が増加していた(図1)。以上より、LysoPSは腸管Th1細胞を活性化させることにより、Th1病態であるクローン病の増悪に深く関与することが示唆された。

さらに、LysoPSがどのようにTh1細胞を活性化するのかについて検討するため、*in vitro*での検討を行った。まず、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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞割合の変化をフローサイトメトリー法で解析したところ、LysoPS添加によりTh1誘導が促進されることが示された。次に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結果、非添加Th1細胞と比較しLysoPS添加Th1細胞では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。そこでさらにLysoPS添加に伴うTh1細胞内代謝の変化について細胞外フラックスアナライザーを用いて解析したところ、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。

最後に、LysoPS受容体についての検討

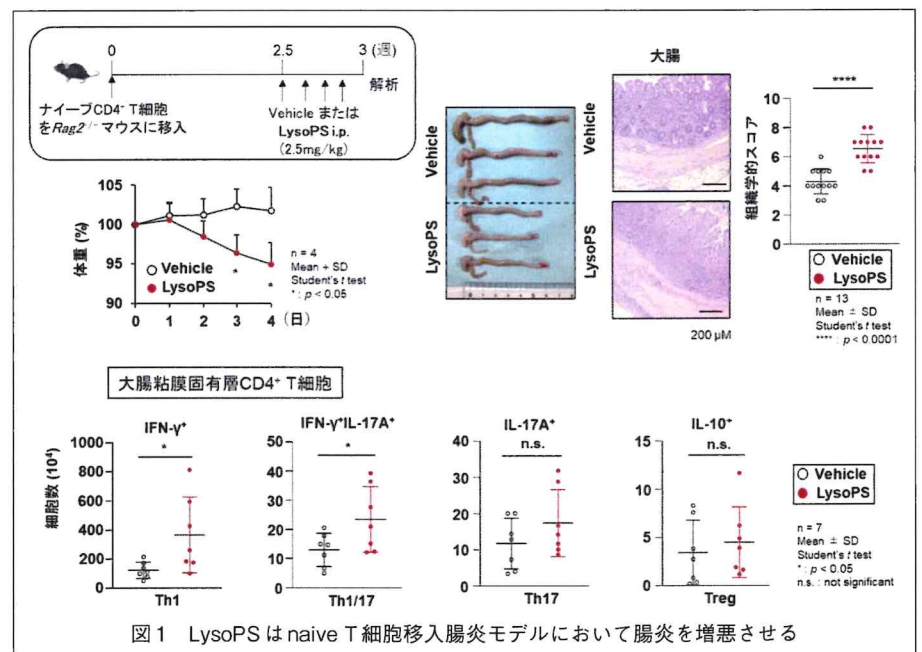


図1 LysoPSはnaive T細胞移入腸炎モデルにおいて腸炎を増悪させる



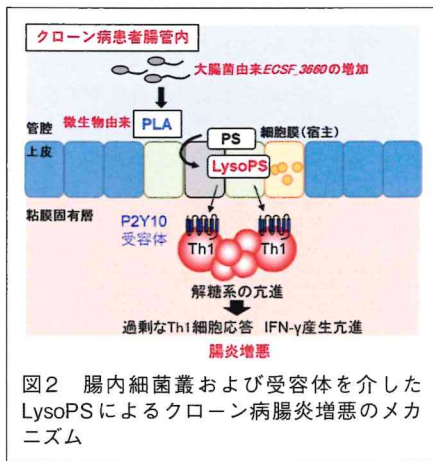


図2 腸内細菌叢および受容体を介したLysoPSによるクローン病腸炎増悪のメカニズム

を行った。LysoPS受容体については、既知の受容体の中でP2ry10遺伝子が最もTh1細胞に発現が多いことが確認されたため、LysoPSのTh1細胞への作用に深く関与している可能性を考え、P2Y10受容体欠損マウスを作成した。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<sup>-/-</sup>マウスにおいては、LysoPS投与を行っても野生型でみられたような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。

以上の結果を総合すると、クローン病患者ではLysoPS産生酵素遺伝子を有する腸内細菌が増加し、便中・血漿中のLysoPS濃度が上昇していたことから、腸内細菌依存的にLysoPS濃度上昇が起こっていることが示唆された。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。これらの結果より、クローン病患者においてはdysbiosisにより生じたLysoPSがTh1細胞を介し腸炎の増悪に関与していることが示唆された(図2)。LysoPSの吸着・除去や腸内細菌叢へのアプローチ、あるいは

LysoPS受容体の阻害などが、クローン病の免疫病態に関与する新規治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

この度は2023年度日本消化器免疫学会若手学術賞という栄誉ある賞を賜り、恐れ多くも誠に光栄に存じます。理事長の金井隆典先生、ご選考頂いた先生方、および日頃よりご指導頂いております竹原徹郎先生、竹田潔先生をはじめ諸先生方、また今回ご推薦頂いた飯島英樹先生に、この場をお借りして心より感謝を申し上げます。脂質代謝物と炎症性腸疾患の関連はまだまだ解明されていないことが多く、今回の受賞を励みに、より一層この分野の研究を発展させていきたいと考えております。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)

## 第2回「土屋賞」

### 腸内細菌叢が宿主の免疫系・生体防御に及ぼす影響の研究

大野 博司 (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)



当学会設立に中心的役割を担われた初代理事長である土屋雅春先生の名を冠する第2回土屋賞を受賞することができ、光栄であると共に身の引き締まる思いです。ご推薦下さいました穂苅量太先生にも心より感謝申し上げます。

1999年に金沢大学がん研究所教授として研究室を主宰するに際し、大学院での免疫学研究と留学先での細胞生物学の融合を目指し、腸内細菌やウイルスなどの巨大抗原の取り込みに特化した腸管上皮M細胞の研究から、私の消化器免疫学研究が始まりました。その後理化学研究所への転出を機に、今回の受賞研究テーマである、腸内細菌叢が宿主の免疫系・生体防御に及ぼす影響の研究へと展開しました。

動物の腸内には膨大な数の腸内細菌叢が存在しています。次世代シーケンサーの普及により腸内細菌叢の網羅的メタゲノム研究が急速に進み、様々な疾患で腸内細菌叢の異常を伴うことが明らかとなりました。しかしゲノム・メタゲノム解析のみでは腸内細菌叢の機能には迫れません。そこでエピゲノム(網羅的遺伝子発現制御解析)、トランスクリプトーム(網羅的遺伝子発現定量的解析)、メタボローム(網羅的代謝物定量的解析)など異なる階層の網羅的解析を組み合わせた「統合オミクス解析」(図1)を世界に先駆けて提唱し、無菌マウス技術

と組み合わせることで、腸管免疫系の作用機序や疾患の発症や病態における腸内細菌叢の役割の分子機序について明らかにしてきました。

腸内細菌叢の主要な代謝産物として酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸(図2)が知られています。私たちは、腸内細菌由来の酢酸が、大腸上皮細胞のエネルギー代謝や抗炎症作用に関わる遺伝子発現を増強することで腸管出血性大腸菌に対する感染に抵抗性を付与することや(Nature 2011; 469: 543)、リポ多糖などの腸内細菌由来の免疫活性物質と協働することで濾胞ヘルパーT細胞の活性化を介して腸内細菌に対するIgAの質・量を制御していること(Nature 2021; 595: 560)を報告しました。また、酪酸がヒストン脱アセチル化酵素阻害というエピゲノム制御を介して制御性T細胞分化のマスター転写因子Foxp3の遺伝子発現を増強し大腸粘膜固有層の末梢性制御性T細胞の分化を促進することも明らかにしました(Nature 2013; 504: 446)。

比較的最近その存在が明らかとなったinnate lymphoid cell(ILC)に関しても新たな知見を見出しています。ILCにはILC1, ILC2, ILC3の3型が知られています。腸管寄生虫の排除には、寄生虫により傷害された腸管上皮細胞から分泌されるアラミンであるサイトカインinterleukin-

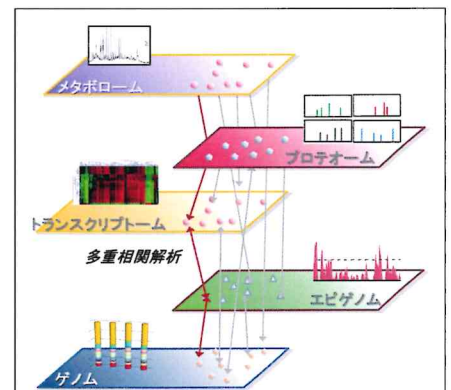
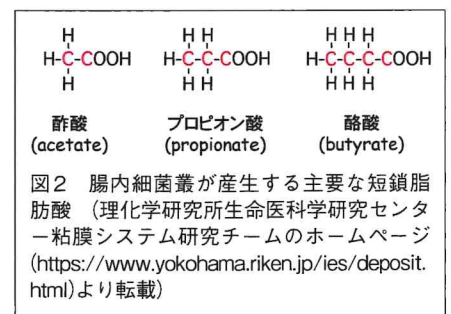


図1 統合オミクス解析手法(理化学研究所生命医科学研究センター粘膜システム研究チームのホームページ(<https://www.yokohama.riken.jp/ies/deposit.html>)より転載)



33(IL-33)によるILC2の活性化が重要と考えられてきました。私たちは、IL-33に先だって腸管上皮細胞から分泌される同じく



アラミンであるATP刺激によりマスト細胞から分泌されるIL-33が感染初期のILC2活性化に重要であることを明らかにしました(Immunity 2017; 46: 863)。また、3種類のILCが腸内細菌叢非依存的に同程度に存在する腸と異なり、それまでほとんど解析されてこなかった胃のILCにおいてはILC2が大多数を占め、かつ胃の細菌叢に依存的であることや、ILC2から分泌される2型サイトカインIL-5、IL-13依存的に産生されるIgAがピロリ菌感染排除に重要であることを明らかにしました(Immunity 2020; 52: 635.e4)。

腸内細菌叢が疾患に及ぼす影響の分子メカニズムに関しても、特に自己免疫疾患について新たな成果を見出しています。近年のアレルギーや自己免疫疾患の急増は衛生状態の改善に伴う細菌や寄生虫感染の激減に起因するという「衛生仮説」があります。私達は1型糖尿病のモデルであるストレプトゾトシン投与マウスを用いて、腸管寄生

虫が分泌するトレハロースに反応して増加する *Ruminococcus* 属菌がCD8陽性制御性T細胞を増進し、膵β細胞の自己免疫性破壊を抑制することを見出しました(Nat Commun. 2020; 11: 1922)。また、中枢神経系の自己免疫性炎症性脱髄疾患ある多発性硬化症の研究には、動物モデルである experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)がよく用いられます。EAEは抗原ペプチドである myelin-oligodendrocyte glycoprotein(MOG)ペプチドをマウスに免疫することで発症させます。私達はEAEを用いて、小腸の常在細菌2菌種の相乗効果により中枢神経炎症を増悪することを明らかにしました(Nature 2020; 585: 102)。MOG特異的T細胞が小腸に遊走して来た際に、炎症性細胞であるTh17の分化誘導能を持つ *Erysipelotrichaceae* 科菌が存在すると、MOG特異的T細胞がTh17細胞へと分化し、中枢神経系に移行することで中枢神経炎症を誘導します。一方、

MOG抗原と交叉性を示すペプチドを持つ *Lactobacillus reuteri*が存在すると交叉反応によりMOG特異的T細胞の増殖を促すが、これだけではTh17細胞への分化とそれに引き続く中枢神経炎症は起こりません。しかし両者が共存すると、増殖したMOG特異的T細胞からより多くのTh17細胞が分化することでより重篤な中枢神経炎症が惹起されます。これらの知見は腸内細菌叢をターゲットとした新たな治療法・予防法の開発に繋がるものと期待されます。

今回の受賞は私一人の力でなし得たものではなく、多くの共同研究者、研究室の新旧メンバー、大学院時代の恩師、谷口克、斉藤隆両先生、留学先のJuan S. Bonifacio先生に深く感謝申し上げます。今後も土屋賞に恥じぬよう精進する所存ですので、今後ともより一層のご指導ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

奨励賞受賞 | 第60回日本消化器免疫学会総会 (2023年10月5日, 6日 ホテルイースト21東京)

## 病態理解に基づく潰瘍性大腸炎関連腫瘍診療の最前線

杉本 真也<sup>1</sup> 高林 馨<sup>2</sup> 岩男 泰<sup>3</sup> 脇坂 悠介<sup>1</sup> 榊原 亮哉<sup>1</sup> 海江田 祐太<sup>1</sup> 吉松 裕介<sup>1</sup> 清原 裕貴<sup>1</sup>  
筋野 智久<sup>2</sup> 細江 直樹<sup>3</sup> 加藤 元彦<sup>2</sup> 三上 洋平<sup>1</sup> 金井 隆典<sup>1</sup>

<sup>1</sup>慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器), <sup>2</sup>慶應義塾大学医学部 内科学 内視鏡センター, <sup>3</sup>慶應義塾大学医学部 予防医療センター

背景・目的：潰瘍性大腸炎(UC)では慢性炎症による大腸粘膜の傷害、再生のプロセスが繰り返され、上皮細胞へのダメージの蓄積によってinflammation-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequenceを介した炎症性発がんに至る。内視鏡的および組織学的な炎症の蓄積は潰瘍性大腸炎関連腫瘍(UC-associated neoplasia; UCAN)の発生につながることを示されており、内視鏡的寛解が治療目標となっている。発がん経路の違いは腫瘍形態の違いともなり、通常のadenoma-carcinoma sequenceを介した散発性腫瘍ではAPC変異を早期に獲得することで隆起した形態をとることが多い一方、UCANではTP53変異を早期に獲得することで平坦な初期像を呈し、内視鏡検査による早期発見が時に困難である(Sugimoto S et al. *Gastrointest Endosc* 2017)。当院では左側大腸を中心とした注意深いサーベイランスと、インジゴカルミン散布による関心領域周辺の平坦領域の観察およびp53免疫組織化学を含む組織学的評価により、早期段階のUCANの発見を目指したサーベイランスを行っている。近年の遺伝子解析技術の進歩により、UC患者の大腸上皮には、IL-17シグナル関連の炎症耐性変異を

はじめとした、種々のクローン拡大が起こっていることが明らかとなってきた。また、炎症の蓄積によって、UC長期罹患例では、健常者に比して上皮細胞への変異蓄積速度が速まることも分かっている(Nanki K et al. *Nature* 2020)。傷害部位の再生時には、隣接する上皮が傷害を被覆し、領域を形成しながら修復していく。しかし、UC患者におけるクローン形成がどのようにして形成され、拡大していくのかについての理解は不十分である。このような組織修復メカニズムに着目した基礎的知見を生かし、UC患者におけるサーベイランスの質をさらに高める独自の臨床的アプローチの確立を目的とした。

方法・結果：我々はEDTA処理と擦過を組み合わせた上皮の剥離手法によって、マウスの大腸上皮の一部を経肛門的に除去して傷害し、その部位にヒト腸管上皮オルガノイドを移植することで、上皮のみを移植上皮細胞に置換する技術を開発した(Sugimoto S et al. *Cell Stem Cell* 2018, Sugimoto S et al. *Nature* 2021)。これにより、マウス腸管内でヒトの正常大腸、遺伝子改変人工大腸腫瘍、大腸腫瘍、正常小腸、びまん性胃癌など、多様なヒト消化管組

織の再構築が可能となり、新たな *in vivo* 研究ツールとなっている。これは視点を変えれば、組織傷害時には異なる種類の細胞によって上皮置換が起こりうることを意味している。この技術開発の過程で、上皮を剥離した後に、肛門付近の元々は潰瘍性大腸炎が存在した部位が扁平上皮に置換されて再生されたマウス個体に偶然遭遇した。扁平上皮の領域は、肛門から連続して著明に口側進展していたが、再生した扁平上皮は、肛門の元の扁平上皮とは異なり、陰窩様構造を示す部分が存在した(図1)。そこで、この現象は陰窩が完全に除去された際の粘膜傷害を修復するために、隣接する肛門由来の扁平上皮が大腸由来の単層円柱上皮と競合しながら修復する過程で、上皮置換されたのではないかと仮説をたてた。実際にマウスにおいて、肛門から連続した上皮傷害を作成する群と、肛門から離れた上皮傷害を作成した群で前向きに検証すると、肛門から連続する傷害を作成した際に、扁平上皮が肛門から伸展することが内視鏡的、病理組織学的に確認できた(Sugimoto S et al. *Gastroenterology* 2022)。

マウスにおいて直腸扁平上皮化を再現で



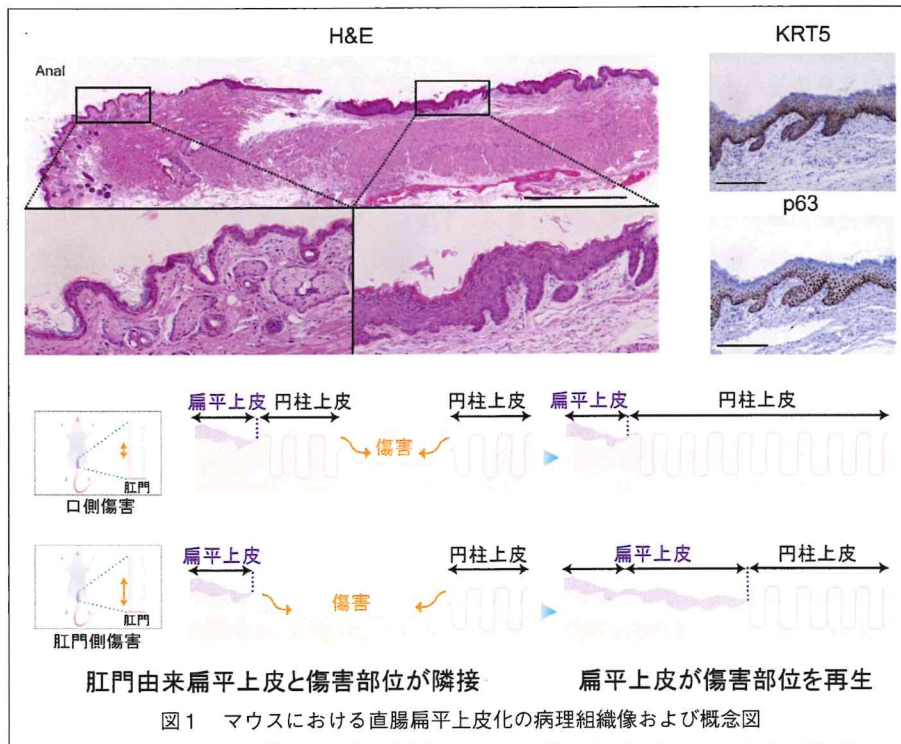


図1 マウスにおける直腸扁平上皮化の病理組織像および概念図

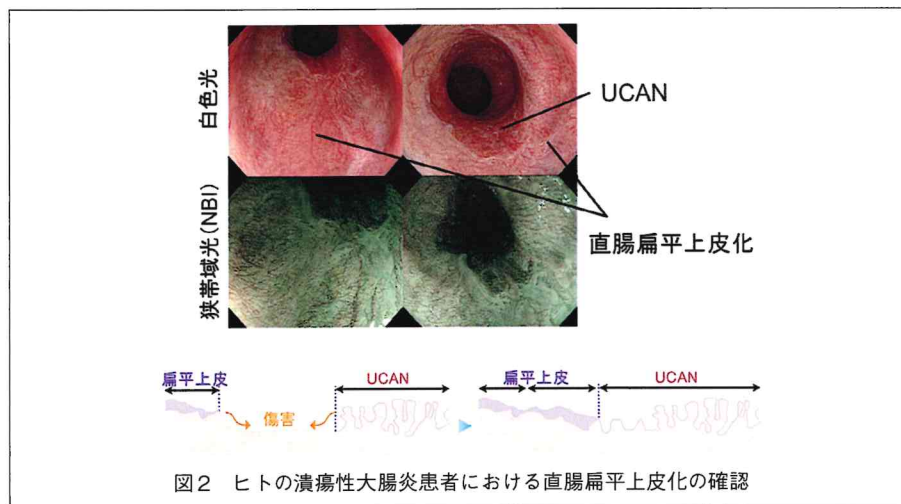


図2 ヒトの潰瘍性大腸炎患者における直腸扁平上皮化の確認

きたことから、粘膜傷害をきたす疾患であるUC患者においても同様の現象が起こっているかどうかを検証した。UCAN患者を対象として、当院のUCANコホートから後ろ向きに検索したところ、肛門から連続した直腸扁平上皮化が内視鏡的に明確に

存在する患者が同定された(図2)。顕著な症例では、扁平上皮化が肛門管から4 cm, high-grade dysplasiaが直腸S状結腸まで6 cmにも及んでいた。病理学的にも、p63<sup>+</sup>KRT5<sup>+</sup>KRT17<sup>+</sup>の移行性扁平上皮がp53<sup>+</sup>の腫瘍性上皮と境界を形成していた。p53<sup>+</sup>の

UCAN上皮の一部では、上皮の単層が再生し、陰窩構造を形成していない部位があり、p53<sup>+</sup>細胞が上皮の再生過程で領域を形成しながら拡大している様子が示唆された(Sugimoto S et al. *Gastroenterology* 2022)。

このような認識をもとに、2021年の1年間に当院で大腸内視鏡検査でUCANを指摘された患者20例を対象に、肛門直腸移行部の詳細な内視鏡評価を行った。すると、本来はまれな現象であるにも関わらず、半数以上の症例で本来の肛門縁から1 cm以上の直腸扁平上皮化を伴っていることが明らかとなった。本現象の存在を腫瘍高リスク群と捉え、最新の画像強調内視鏡技術を組み合わせた注意深い肛門直腸移行部の観察を行うことで新たな平坦型のUCANの発見に至った症例も存在した。発見時には生物学的製剤の奏功により寛解粘膜であっても、過去には強い慢性炎症の存在が確認され、傷害再生と上皮細胞への炎症蓄積の寄与が示唆された。

結論：このように上皮再生の基礎的知見、UCANの臨床的知見に基づく多角的な病理理解が、上皮の移行帯であるにも関わらず従来は関心の低かった肛門直腸移行部における現象のUCAN診断における新しい生物学的意義へとつながっている。過去の炎症の蓄積を反映する直腸扁平上皮化を認めた場合には、特に注意深いUCANの内視鏡サーベイランスが必要である。

この度は記念すべき第60回総会において栄誉ある奨励賞を賜り、大変光栄に存じます。日頃お世話になっている金井隆典教授をはじめ、各関連部門でご指導、ご協力いただいている皆様、この場をお借りして御礼申し上げます。本受賞を励みに、基礎・臨床双方のアプローチから潰瘍性大腸炎関連腫瘍をはじめとする消化管疾患の病態解明に一層励んでまいります。今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。(杉本真也)

