

NewsLetter Vol.24 No.4

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)

腸管粘膜免疫系老化フェノタイプの同定とその制御因子の探索

米本 有輝 森川 亮 根本 泰宏 永石 宇司 大島 茂 岡本 隆一
東京医科歯科大学 消化器内科

背景・目的：世界的な高齢化社会の到来により老化研究は重要性を増している。近年の老化研究の進展により、老化とは自然現象ではなく、制御可能な炎症性疾患としての側面を有することが示唆されている。免疫系は慢性炎症を介して、老化現象において重要な役割を有すると考えられており、特に炎症性蛋白を分泌し、増殖能が低く、自己反応性の高い、老化T細胞が老化における潜在的な治療標的として注目されている。一方で、多くの面で全身免疫系とは異なるユニークな特色を持つ腸管粘膜免疫系の老化に関してはほとんど報告がない。本研究では腸管免疫系、特に腸管独自のユニークな分画である上皮間リンパ球 (IEL) の加齢に伴う機能的変化について解析を行った。

方法・結果：オスのC57BL/6マウスを用いて、5~9週齢を若年、18ヵ月齢以降を老齢マウスと定義し検証を行った。フローサイトメトリーを用いて、若年マウスと老齢マウスの脾臓、腸管膜リンパ節、パイエル板、小腸、大腸各臓器におけるT細胞の割合と、老化に関連した表面マーカーの変化を検討した。最も大きな変化がみられたのは、小腸 IEL の CD4⁺ 分画であり、老齢マウスにおいて同分画の割合は著明に増加し(図1a)、老化T細胞の特徴とされる共刺激分子CD27及びCD28の発現低下がみられた(図1b)。加齢に伴い大きな変化がみられた小腸 IEL-CD4⁺ 分画に着目し、脾臓の CD4⁺ T細胞を全身免疫系のコントロールとして、若年と老齢マウスよりそれぞれの分画を cell sorting し機能解析を行った。PMA+ionomycin 刺激後の増

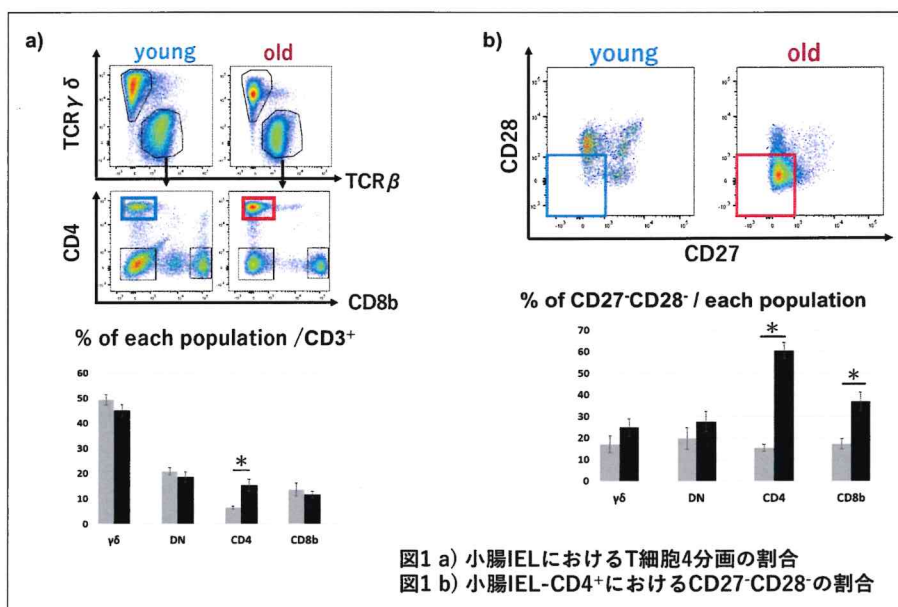


図1 a) 小腸IELにおけるT細胞4分画の割合
図1 b) 小腸IEL-CD4⁺におけるCD27-CD28⁺の割合

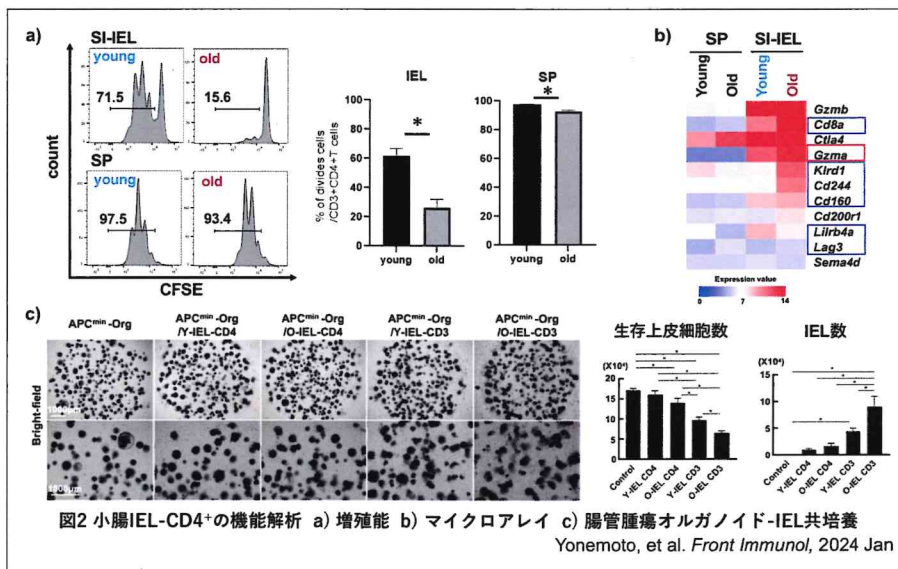


図2 小腸 IEL-CD4⁺ の機能解析 a) 増殖能 b) マイクロアレイ c) 腸管腫瘍オルガノイド-IEL共培養
Yonemoto, et al. Front Immunol, 2024 Jan

殖能を検証したところ、全身免疫系の老化T細胞と比較して老化 IEL-CD4⁺ で増殖能が著しく低下した(図2a)。マイクロアレイ

による網羅的なトランスクリプトーム解析では、老化 IEL-CD4⁺ において、*Cd8a* や、*Klrk1*、*Cd244* といったNKレセプターの

発現が上昇し、 $\gamma\delta$ T細胞やCD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ T細胞などの腸管特異的な分画に類似した特徴を有していた(図2b)。またGzmaなどのcytotoxicマーカーを高発現するなど、全身免疫における老化T細胞とは異なるユニークな特徴を有していた(図2b)。CD8 $\alpha\alpha$ 陽性のIEL-CD4分画は、抑制性の機能を有することが知られているため、老齢マウスのIEL-CD4の抑制能に関して検証した。RAG KOマウスを用いたCD45RB^{high}移入慢性大腸炎モデルへ、老齢と若年マウス由来IEL-CD4の共移入することによりそれぞれの抑制能を検証したところ、*in vitro*, *in vivo*において抑制能は確認できなかった。

次に、老化した小腸IEL-CD4⁺におけるcytotoxicマーカーの発現上昇に着目した。通常、高齢者では大腸癌は増加するが、老化した個体の腸管CD4⁺ T細胞は増加する腫瘍リスクに対して細胞障害活性を高めて対応している可能性がある。この仮説を検証するために腸管腫瘍由来オルガノイドとIELの*in vitro*共培養モデルを用いた。APC^{min}マウスの腸管腫瘍からオルガノイドを作成し、若年マウスおよび老齢マウスの小腸IEL-CD4⁺及びCD3⁺とそれぞれ共

培養し、共培養7日目における腫瘍オルガノイドの上皮細胞数をフローサイトメトリーで解析した。IEL-CD4⁺単独の共培養では上皮細胞数の減少は軽度であったが、老化IEL-CD3⁺は若年IEL-CD3⁺よりも腫瘍オルガノイドに対して高い細胞障害活性を有していた(図2c)。

考察・結論：今回の結果から、加齢に伴い増加する小腸IEL-CD4⁺分画は、共刺激分子CD27, CD28の発現低下や増殖能低下といった全身系の老化T細胞と類似した変化がみられる一方、CD8 $\alpha\alpha$ やcytotoxicマーカーの発現上昇といったユニークな特徴を有していた。以上の特性から、老化したIEL-CD4⁺がnatural IELやCD8 $\alpha\alpha$ ⁺CD4⁺ T細胞と同様に細胞障害活性、あるいは過剰な免疫応答の抑制によって抗腫瘍免疫や腸管免疫恒常性の維持において重要な役割を有すると考え、IEL-CD4⁺の機能解析を行った。抑制能に関しては有意な結果は得られず、また腫瘍オルガノイドとIEL-CD4⁺単独の共培養においては、細胞障害活性は軽度であった。しかし、IEL-CD3⁺の共培養においては、老齢マウス由来のIELは高い細胞傷害活性を有しており、CD8⁺や $\gamma\delta$ T細胞といった腫瘍免疫にお

いて役割を持つ他分画へ関与することで細胞障害活性を高めている可能性が示唆された。このような非常にユニークで捉え所のない腸管老化CD4⁺ T細胞の特性を通常のパルク細胞解析で明らかにすることは困難と思われ、今後はscRNAseqによるシングルセルレベルでの遺伝子発現解析やレパトワ解析によりこの分画の生体内での意義を追求したい。

※ 尚、一部の実験結果について、学会発表後の実験データを集計し、十分な実験数、n数を満たした最終版に差し替えさせていただきます。

この度は第60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。日頃より御指導頂いております岡本教授、根本先生はじめ研究室の方々に厚く感謝申し上げます。今回の受賞を励みに、引き続き腸管免疫老化の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宜しくお願い致します。(米本有輝)



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)

中枢神経系ミトコンドリア異常が脳腸相関における腸管炎症と行動異常に及ぼす影響の検討

良原 丈夫 辻井 悠里 朝倉 亜希子 田代 拓 天野 孝広 上間 遼太郎
谷 瑞季 大竹 由利子 辻井 芳樹 井上 隆弘 林 義人 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：炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease: IBD)は主として潰瘍性大腸炎とクローン病に大別され、主に若年者に発症し再燃と寛解を繰り返すことで患者の生活の質を著しく損なう消化管慢性炎症性疾患である。IBDの発症メカニズムは徐々に解明されてきており、遺伝的な素因に加えて後天的な環境因子や腸内細菌叢の変化などの複合的な因子により発症すると考えられている。精神ストレスや精神症状はその発症に寄与する環境因子の一つとされ、IBDにおける脳腸相関として着目され研究が進められている。

我々はIBD患者とその精神状態について以前より着目しており、当教室および関

連施設における約千名のIBD患者に対する調査研究において、ストレスによりIBDの自覚症状の増悪を認める患者がその約75%にのぼり、3分の1の患者で抑うつ状態をきたしていることを明らかにした(Araki M, et al. *PLoS ONE*. 2020)。また抑うつ状態や不安症状を呈するIBD患者の割合は増加傾向を示しており、精神症状を有する患者ではその後の腸炎再燃率が有意に高いことも報告されている(Gracie DJ, et al. *Gastroenterology*. 2018)ことから、IBD患者における精神症状は解決すべき腸管外合併症である。他の腸管外合併症として関節炎や皮膚炎などが知られているが、IBD患者の精神症状は発症や増悪に寄与し

る点で他の腸管外合併症とは一線を画す重要な課題であると考えられる。本研究ではうつ病発症仮説としてミトコンドリア機能障害について着目し、マウスにおける行動異常と腸管炎症の関連について検討した。

方法：8~12週齢の組織アデノシン三リン酸(ATP)濃度が測定可能なマウス(GOATマウス)を用いて、拘束ストレス(2h/day, 連続10日間)による抑うつモデルマウス(Restraintマウス)、中枢神経特異的にミトコンドリアDNA異常を示すマウス(mutant Mitochondria-DNAマウス:mMtDNA)に2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を1週間自由飲水させ腸炎を誘導した。腸炎の評価は体重の変化、腸管長、

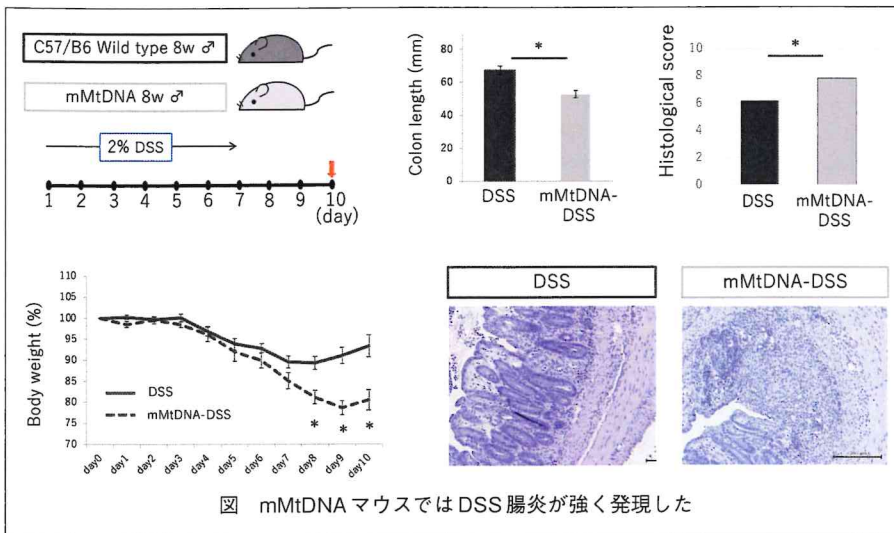


図 mMtDNA マウスではDSS腸炎が強く発現した

病理学的評価、炎症性サイトカインの解析によって行った。中枢神経系でのミトコンドリア機能異常の評価はGOATマウスを用いた組織ATP濃度の測定と透過型電子顕微鏡を用いて中枢神経系ニューロンでのミトコンドリア形態を評価により行なった。マウスの行動異常を行動テストバッテリー(明暗選択テスト, ショ糖嗜好テスト, 強制水泳テスト, 尾懸垂テスト)で検討した。迷走神経を介した抗炎症経路であるコリン作動性抗炎症経路が果たす役割を脾臓組織中ノルアドレナリン濃度・血中アセチルコリン濃度の測定, コリンエステラーゼ阻害薬のネオスチグミンの投与(day1-7, 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔内投与)によって検討した。

結果: Restraintマウスに対してDSS腸炎を誘導すると(Restraint-DSS群), コントロール群と比して有意な体重減少・腸管の短縮・病理組織炎症像の悪化を認めた。

またRestraint-DSS群では中枢神経ニューロンのミトコンドリア形態異常と脳組織ATP濃度の低下を認め脳でのミトコンドリア異常が示唆された。中枢神経系ニューロンでのミトコンドリア機能異常が腸炎の増悪に与える影響について検討するために, mMtDNAマウスに対してDSS腸炎を誘導すると(mMtDNA-DSS群), DSS群と比較して有意に体重減少・腸管の短縮・病理組織炎症像の悪化を認め, 脾細胞, 腸間膜リンパ節, 粘膜固有層リンパ球における炎症性サイトカインの発現亢進を認めた。mMtDNA-DSS群では脾臓組織中のノルアドレナリン濃度の低下と血中アセチルコリンの低下を認め, コリン作動性抗炎症経路の機能低下が示唆された。

mMtDNAマウスに対してコリンエステラーゼ阻害薬のネオスチグミンの投与を行ってコリン作動性抗炎症経路を賦活化さ

せるとDSSによって誘導される腸炎の改善を認めた。また行動テストバッテリーによる行動評価では, 8~12週齢のmMTDNAマウスは不安様行動を示さず, DSS腸炎の誘導により野生型マウスと比較して強い不安様行動を認めた。

考察・結論: 炎症性腸疾患における脳腸相関に自律神経系が関与していることは示唆されていたが, 中枢神経系での器質的異常についてはこれまでよく分かっていなかった。本検討では拘束ストレスと腸管炎症の負荷により中枢神経系でミトコンドリア異常をきたすことが示され, 中枢神経系でのミトコンドリア異常は自律神経系を介した腸炎増悪機構の一端を担っていることが示唆された。また中枢神経系でのミトコンドリア異常は腸炎に伴う行動異常へも寄与していることが示唆され, 今後IBD患者における精神症状や精神ストレス負荷による腸炎増悪のメカニズムの解明の端緒となることが期待される。

この度は第60回日本消化器免疫学会総会におきまして奨励賞を賜り光栄に存じます。この場をお借りしましてご指導いただきました竹原徹郎教授をはじめとする諸先生方に感謝を申し上げます。学会の開催・運営に携わられた先生方, 賞の選考委員の先生方にも深謝いたします。炎症性腸疾患と精神症状で苦しむ患者さんたちの実際に役に立つ研究となるよう, この受賞を励みにさらに研究を進めてまいります。(良原丈夫)



第61回日本消化器免疫学会総会のご案内

第61回日本消化器免疫学会総会は、2024年12月5日～6日に、長崎駅に直結した「出島メッセ」で行われます。第53回日本免疫学会学術集会（12月3日～5日）との合同開催で、日本消化器免疫学会総会に参加登録頂けば、日本免疫学会学術集会の全日程に参加可能です。基礎と臨床の融合を目指した本大会に奮ってご参加いただければ幸いです。よろしくお願い申し上げます。

第61回

日本消化器免疫学会総会

The 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Mucosal Immunology

呉越同舟～切磋琢磨～雲外蒼天



2024年
12月5日(木)～6日(金)

December 5-6, 2024

出島メッセ長崎
DEJIMA MESSE NAGASAKI

※12月3日(火)～5日(木)に第53回日本免疫学会学術集会が同会場で開催されます。

演題投稿期間

2024年
6月3日(月)～7月12日(金)

Abstract Submission:
June 3- July 12, 2024

会長
President

大野 博司 (理化学研究所生命医科学研究センター)
Hiroshi Ohno (RIKEN Center for Integrative Medical Sciences)

事務局長
Secretary
General

佐藤 尚子 (理化学研究所)
Naoko Satoh-Takayama (RIKEN)

第61回日本消化器免疫学会総会事務局
〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-14-14 新大阪グランドビル6F
株式会社エー・イー企画内
TEL:06-6350-7163 FAX:06-6350-7164 E-mail:jsmi2024@aeplan.co.jp

The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
A & E Planning, Co., Ltd., 6th floor, Shin-Osaka Grand Bldg., 2-14-14,
Miyahara, Yodogawa-ku, Osaka, 532-0003, JAPAN
TEL: +81-6-6350-7163 FAX: +81-6-6350-7164 E-mail:jsmi2024@aeplan.co.jp