

NewsLetter Vol.25 No.2

奨励賞受賞 | 第61回日本消化器免疫学会総会 (2024年12月5日, 6日 出島メッセ長崎)

肥満進展における CCR9–CCL25 axis の検討

春日 良介 中本 伸宏 中代 幸江 岡田 はるか 田淵 貴也
谷木 信仁 碓井 真吾 尾城 啓輔 金井 隆典
慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器)

背景・目的：肥満およびそれに続発するメタボリックシンドロームは、多臓器間の相互作用を伴う慢性炎症性疾患であるが、その詳細な機序の多くは未解明である。近年、高度肥満患者に対する減量手術の有効性が報告されており、術後の患者では胆汁酸組成や腸内細菌叢の変化が観察されている。これらの腸内環境の変化が病態の改善に寄与する可能性が示唆されている。本研究では、肥満病態の解明を目的とし、ハイボリュームセンターと連携して減量手術を受ける高度肥満患者の検体解析を行った。その結果、病態関連因子としてCCL25を同定した。CCL25はGut-homing レセプターとして知られるCCR9のリガンドであり、我々のグループはこれまでにCCR9–CCL25 axisの阻害が糖尿病 (Diabetologia, 2021) およびNASH (J Hepatol, 2021) の改善に寄与することを報告している。本研究では、高度肥満患者検体およびマウスの給餌モデルを用いて、CCR9–CCL25 axisが肥満病態に与える影響を検討した。

方法：減量手術を施行された高度肥満患者32例の血清検体を対象に、マルチプレックスアッセイを用いたサイトカイン・ケモカインの網羅的解析を実施し、健常人との比較および術前後での変動を評価した。また、臨床パラメーターとの相関解析を行い、病態関連因子の同定を試みた。CCL25の病態メカニズムを解明するため、野生型マウス (C57BL/6J; WT) およびCCR9欠損マウス (Ccr9KO) に高脂肪食 (HFD) を12週間給餌し、肥満病態を誘導し、その表現型を評価した。さらに、小腸および内臓脂肪 (副睾丸脂肪, eWAT) を解析対象とし、免疫細胞の分布および表現型の評価を行うとともに、組織学的解析を実施し、肥満に伴う組織変化を検討した。

結果：高度肥満患者では血清CCL25値が健常人と比較して有意に高値を示し、減量手術により著明に低下した。また、血清CCL25値は内臓脂肪面積と有意に相関関係を示した (A)。次にWTの給餌肥満モデルにおいて各臓器のRT-PCR解析を行った

ところ、CCL25の発現は小腸特異的であり肥満病態で上昇することが確認された (B)。また、肥満病態において小腸で増加するCCR9陽性の免疫細胞の一つとして2型自然リンパ球 (ILC2) を同定した。さらに消化管各臓器および脂肪組織でのILC2を評価したところ肥満病態におけるILC2の増加は小腸特異的であり、対照的にeWATでは有意に減少していた (C)。RNA-seq解析の結果、肥満状態の小腸ILC2 (SI-ILC2) では、従来のILC2の転写因子であるGata3および産生サイトカインであるIL5の発現が低下した一方、通常のILC2では発現しないTbx21およびIfngの発現が増加しており、フローサイトメトリー解析においても肥満状態でのIFN- γ 産生が確認された (D)。

Ccr9KOはHFD給餌によりWTと同等の体重増加を示したものの、耐糖能指標であるOGTT及びITTにおいて有意に改善が認められた。Ccr9KOの小腸及びeWATのILC2をWTと比較したところ小腸にお

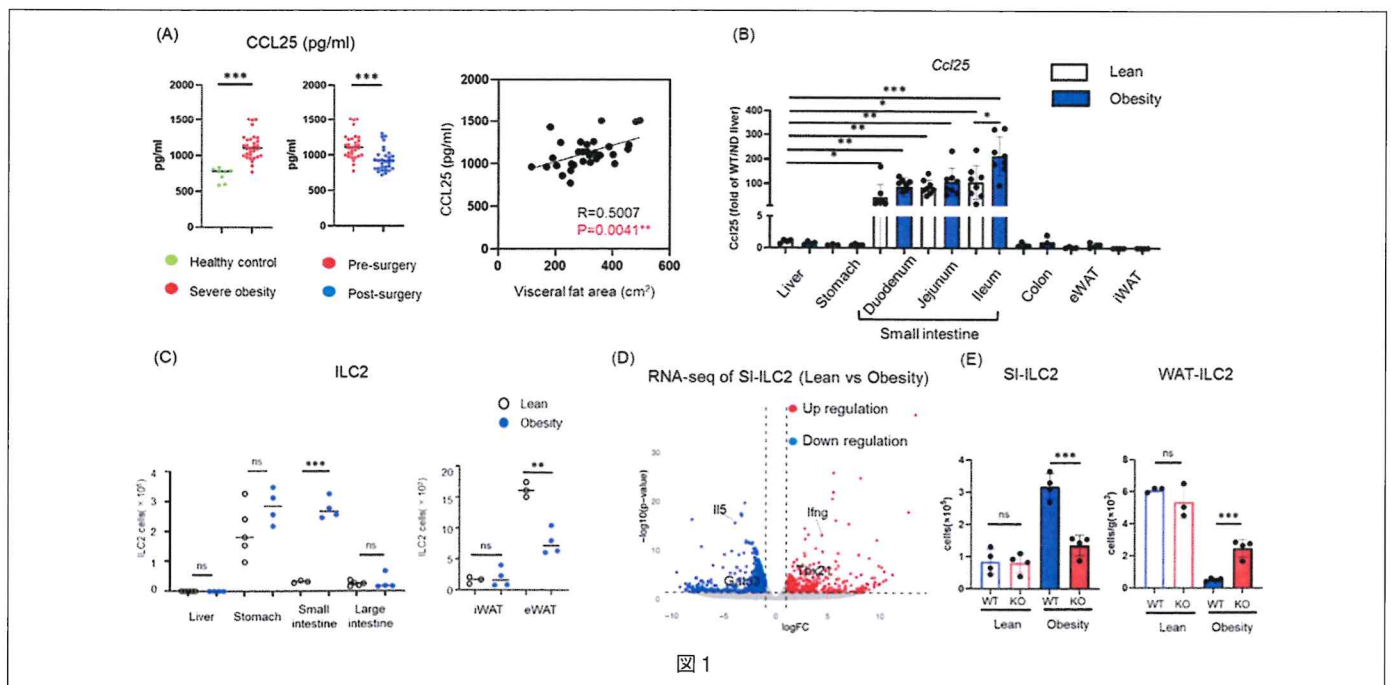


図 1

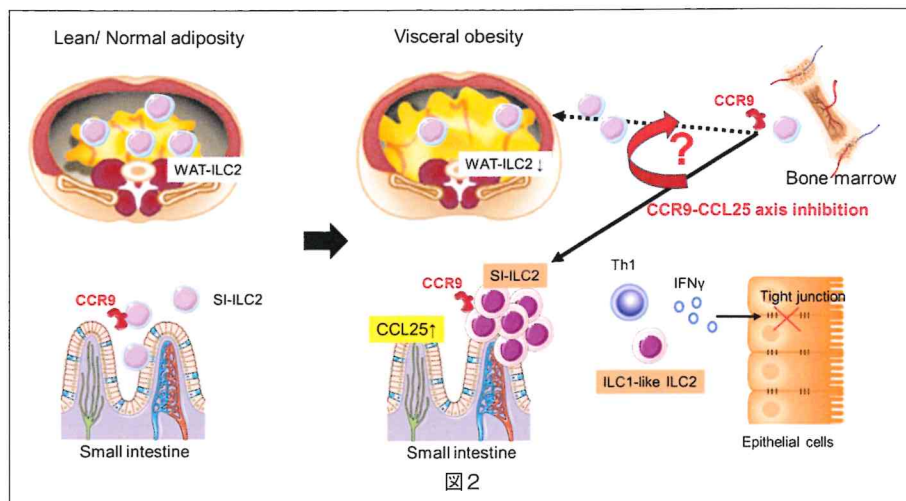


図2

いてはWTでみられる肥満に伴う ILC2 の増加が緩和され、eWAT では肥満に伴う ILC2 の減少が有意に抑制されていた (E)。加えて、Ccr9KO では ILC2 と関連の深い脂肪組織炎症抑制性の好酸球および Treg が有意に増加しており炎症促進性のマクロファージは減少していた。組織学的評価の結果、Ccr9KO の eWAT では肥満状態の WT で観察される adipocyte の不均一な大型化や Crown like structure などの炎症所

見、および Masson trichrome 染色陽性となる線維化所見が改善していた。さらに、RNA-seq 解析では、Tnf および Col1a1 をはじめとする線維化関連因子の肥満に伴う発現増加が有意に抑制されていた。

結論：肥満に伴い小腸で発現が上昇する CCL25 が、内臓脂肪型肥満の病態形成に関与する可能性が示唆された。肥満状態では ILC2 が小腸で増加し、内臓脂肪 (eWAT) では減少していたが、小腸の ILC2 は IFN-

γ 産生を伴う ILC1 様の性質を示し、腸炎および leaky gut の進展に関与する病態促進性の役割を果たすと考えられた。一方で、CCR9-CCL25 axis の阻害により、ILC2 の臓器間分布が病態促進性の小腸から、病態抑制性の内臓脂肪へとシフトする可能性が示唆された。これにより、ILC2 の動態を制御することが、肥満関連炎症の制御につながる可能性があり、CCR9-CCL25 axis は新たな治療標的としての有望性を持つと考えられる。

このたびは、第61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。日頃よりご指導を賜っております金井隆典教授ならびに指導医の中本伸宏先生に、この場をお借りして深く感謝申し上げます。発表の際には、多くの示唆に富むご質問やご意見をいただき、肥満の治療におけるブレークスルーが腸管病態の解明にあることを改めて実感いたしました。本研究がさらなる発展へとつながるよう、引き続き精進してまいります。今後ともご指導ご鞭撻のほど、何卒よろしくお願い申し上げます。

(春日良介)



奨励賞受賞 | 第61回日本消化器免疫学会総会 (2024年12月5日, 6日 出島メッセ長崎)

腸管神経叢を介した大腸炎制御メカニズムの解析

佐藤 真那美^{1,2} 長田 律² 橘 直子² 大野 博司²

¹横浜市立大学大学院生命医科学研究科修士課程 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

背景・目的：潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; UC) は、大腸の粘膜に慢性的な炎症や潰瘍を引き起こす炎症性腸疾患の一つであり、便秘異常や腹痛、体重減少などの症状を呈する。UC の病態に関与する免疫細胞として2型ヘルパー T (T helper type 2; Th2) 細胞、17型ヘルパー (T helper type 17; Th17) 細胞や制御性 T 細胞 (Regulatory T cell; Treg) が知られている。UC 患者の腸管粘膜内では Th2 細胞や Th17 細胞の活性が優勢となり、炎症を制御する Treg が機能不全になることで腸管粘膜は慢性的な炎症状態に陥る。腸管の腹腔側には腸管の運動や生理活性物質の分泌を制御する独自のネットワークを有する腸管神経叢 (Enteric Nervous System; ENS) が存在し、UC 発症時の ENS の制御不全は腸管運動障害による便秘異常を引き起こす。近年、UC 患者の ENS 内に免疫細胞が浸潤することが明らかとなったが (Michael S. et al., *Journal of Crohn's and Colitis*, 2023), UC 発症時の ENS 内での免疫応答が腸管運動障害に影響を及ぼす可能性については不明である。そこで本研究では、UC モデルマウスの ENS 内免疫細胞に着目することで、大腸炎発症時の ENS を介した新規の病態制御機構について探索を試みた。

方法：UC 病態を模倣するモデルマウスとして Oxazolone マウスを使用した。コンベンショナル環境下にて飼育した BALB/c マウスの肩甲骨付近に3% Oxazolone 溶液を皮膚感作させた5日後に0.5% Oxazolone 溶液もしくは水 (コントロール群) を直腸投与した。腸管運動能を評価するために、0.5%メチルセルロースに溶解した6%カルミン (赤色色素) をマウスに経口投与し、最初に赤色の便が出てくるまでの時間を Transit time として計測した。観察は10時間で打ち切った。また、細胞抽出実験時には、色素を経口投与し2時間後の解剖時に、小腸から色素到達点までの距離を測定し、小腸から肛門までの全長で割った Transit rate (%) を算出し、腸管運動能を評価した。マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後、大腸を摘出し、綿棒で大腸表面を慎重に擦ることで ENS を剥離した。剥離した ENS を4% PFA で固定し、Blocking buffer で膜透過処理した後、TUBB3 および CD3ε 抗体溶液を添加し、染色した。また、剥がした ENS を細断し、酵素処理した後、フィルターに通して残存組織片を取り除き、単一細胞に調整した。単一細胞に調整した細胞の細胞表面分子、核内転写因子を染色し、

フローサイトメトリーによる解析を行った。

結果：Oxazolone 投与による大腸炎誘導マウス (Oxa マウス) の病態を調べるため、体重を計測したところ、2日目に体重が減少した。腸管運動能を Transit time により評価した結果、コントロール群と比べ、2日目の Oxa マウスでは Transit time が有意に遅くなり、腸管運動が障害されていた。しかし、4日目ではコントロール群との間に有意な差は見られなかった。また、腸管運動機能障害が認められた直腸投与2日目の Oxa マウスの大腸において、UC の病態と関連のあるサイトカインとして知られている *Il4*, *Il10*, *Il13*, *Il17* および *Tnf* の遺伝子発現が有意に増加していた。以上より、本研究で用いる大腸炎誘導マウスの病態は Oxazolone 投与2日目では悪化すると考えられた。

先行研究により、潰瘍性大腸炎の病態に Th2 細胞や Th17 細胞、Treg が関与していることが報告されているため、病態が悪化する大腸炎誘導2日後における ENS 内の T 細胞の局在を確認した。ENS を神経細胞のマーカーである TUBB3 と T 細胞マーカーである CD3ε で免疫染色した結果、Oxa マウスでは TUBB3 の近くに CD3ε が

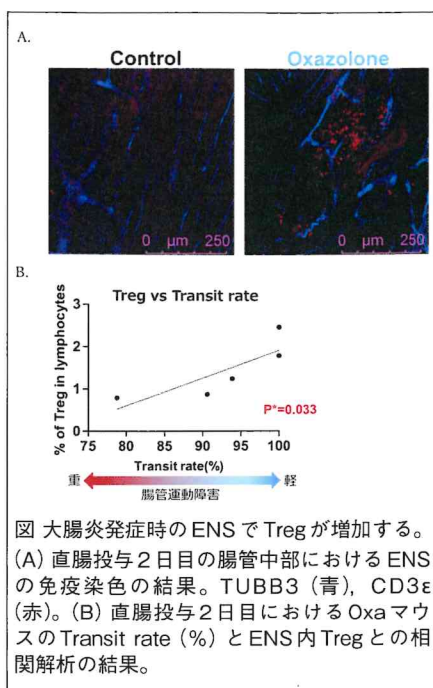


図 大腸炎発症時のENSでTregが増加する。(A) 直腸投与2日目における腸管中部におけるENSの免疫染色の結果。TUBB3 (青), CD3ε (赤)。(B) 直腸投与2日目におけるOxaマウスのTransit rate (%)とENS内Tregとの相関解析の結果。

近接している様子が確認された。興味深いことに、腸管中部ではCD3εの凝集がいくつか認められた(図A)。

また、ENSから免疫細胞を採取し、フローサイトメトリーによりT細胞のサブセット解析を行った。その結果、OxaマウスのENSでTregが有意に増加していた。一方で、Th2細胞に有意な差は見られず、Th17細胞は認められなかった。腸管運動機能が障害される直腸投与2日目にENS

でTregが増加していたため、次に、Oxaマウスの腸管運動能とENS内Tregとの関連を調べた。細胞抽出実験時に、赤色素を経口投与し腸管全体に対する色素到達点の距離の割合Transit rate (%)を測定し、ENS内TregとTransit rateとの相関を調べた。その結果、腸管運動障害が軽度(色素到達点の距離が長く、Transit rateが高い)のマウスでは、ENS内Tregの増加傾向が認められ、Transit rate (%)とENS内Tregは有意に正に相関していた(図B)。以上より、Tregが腸管運動の調節に関与する可能性が示唆された。

Tregは主にIL-10を産生し炎症を抑制する。そこでIL-10が大腸炎発症時の腸管運動障害に及ぼす影響を検証するため、IL-10の中和抗体(Anti IL-10)を腹腔内投与し、大腸炎誘導後のTransit timeを測定した。その結果、Isotype control群に比べてAnti IL-10投与群では、病態が悪化する直腸投与2日目において、打ち切り時間である10時間以上となる個体が多く見られた。以上より、大腸炎発症時にENS内のTregがIL-10を産生して腸管運動障害を阻害している可能性が示唆された。

結論：これまでに、健常時のENS内のTregの存在は極めて少数であることが報告されているが(Benoist C. et al., *Immunity*, 2021)、本研究により腸炎発症時のENS内でTregが増加することが初めて明らかとなった。また、ENS内Tregと腸管運動障害に関連付けた研究報告はなく、ENSを介した新規の大腸炎制御メカニズムの存在が示唆された。OxaマウスのENS

内において、神経系マーカーであるTUBB3の発現部位とCD3ε陽性T細胞が近接し、さらに、Anti IL-10抗体をOxaマウスに投与すると腸管運動能が障害された。神経細胞にはIL-10の受容体も発現することが報告されているため、ENS内のTregが直接腸管神経細胞に影響を及ぼし、腸管運動障害を阻害している可能性も考えられる。

ENSではマクロファージの存在量が多く(Boeckxstaens G. et al., *Cell*, 2018)、マクロファージにはIL-10を産生する表現型が存在するため、マクロファージ由来のIL-10が腸管運動能に影響を及ぼしている可能性も考えられる。今後、Treg特異的欠損マウスを用いて、腸管運動能や腸管神経細胞の解析を行うことで、Tregと腸管運動障害との関連を明らかにすることが期待される。

この度は、第61回日本消化器免疫学会において奨励賞を賜り、大変光栄に存じます。日頃よりご指導とご支援をいただいている大野博司先生をはじめとする研究室の皆様がこの場をお借りして心より感謝申し上げます。これまでの成果がこのよう形で評価されたことは大きな励みとなるとともに、本研究がUC研究のさらなる発展に寄与できることを願っております。(佐藤真那美)



奨励賞受賞 | 第61回日本消化器免疫学会総会(2024年12月5日, 6日 出島メッセ長崎)

脳脊髄炎モデルにおける小腸環境、免疫応答の重要性

鈴木 祥平¹ 宮本 健太郎^{1,3} 東條 杏奈¹ 筋野 智久² 金井 隆典¹

¹慶應義塾大学医学部 内科学(消化器), ²慶應義塾大学内視鏡センター, ³ミヤリサン製薬株式会社

我々は、多発性硬化症(Multiple sclerosis: MS)の発症に腸内細菌叢が関与している可能性について検討した。近年、腸内細菌がMSの病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、その詳細なメカニズムは十分に解明されていない(Noto D et al., 2022; Shahi SK et al., 2017; Cekanaviciute E et al., 2017)。本研究では、小腸上皮が産生するキヌレン酸(Kynurenine acid: KYNA)がMSのモデルである実験的自身免疫性脳脊髄炎(Experimentally autoimmune encephalomyelitis: EAE)の発症を促進することを明らかにした(Miyamoto K, Suzuki S et al., 2023)。

我々は、EAEマウスにおける腸内環境の変化を検討するために、脾臓、腸間膜リンパ節、小腸、大腸における免疫細胞の増減を確認した。EAEモデルでは、Th17細胞が中枢神経系(Central nervous system:

CNS)に浸潤して神経炎症を引き起こすことが知られており(A McGinley et al., 2018)、特にTh17細胞に着目した。興味深いことに、EAEモデルにおける抗原であるミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(Myelin oligodendrocyte glycoprotein: MOG)に反応するTh17細胞は小腸に蓄積しており、小腸の中でも回腸で最も多かった(図1A, 図1B)。

さらに、EAEマウスの小腸で増加したCD4陽性T細胞のTCRクローンを解析したところ、脊髄のCD4陽性T細胞と類似性があることが分かり(図1C)、腸管内のTh17細胞が脊髄へ移動し、EAEの発症に寄与する可能性が示唆された。

さらに、我々はカエデトランスジェニックマウスを用いた追跡実験を行い、小腸で生じたTh17細胞がどのように脊髄へ移動するかを解析した。カエデマウスは、特定の細胞を光照射により蛍光標識

できるモデルであり、腸で標識したCD4陽性T細胞が他臓器へ移動する様子を追跡することが可能である(Tomura M et al., 2009; Nakanishi Y et al., 2018)。我々の実験により、腸管膜リンパ節に存在するTh17細胞の一部が脊髄に移動し、炎症を引き起こすことが確認された(図1D, 図1E, 図1F)。この結果は、小腸におけるTh17細胞の動態がEAEの進行に寄与することを強く示唆している。

その他の免疫細胞の検討では、EAEマウスの小腸においてCX3CR1+Ly6C+マクロファージが増加していることを発見した(図2A, 図2B)。さらに、in vitroでの共培養によってこれらのマクロファージがNaïve CD4陽性T細胞のTh17細胞分化を促進していることを確認した(図2C, 図2D)。

これらのマクロファージがEAEマウスの小腸に蓄積する理由としては、GPR35

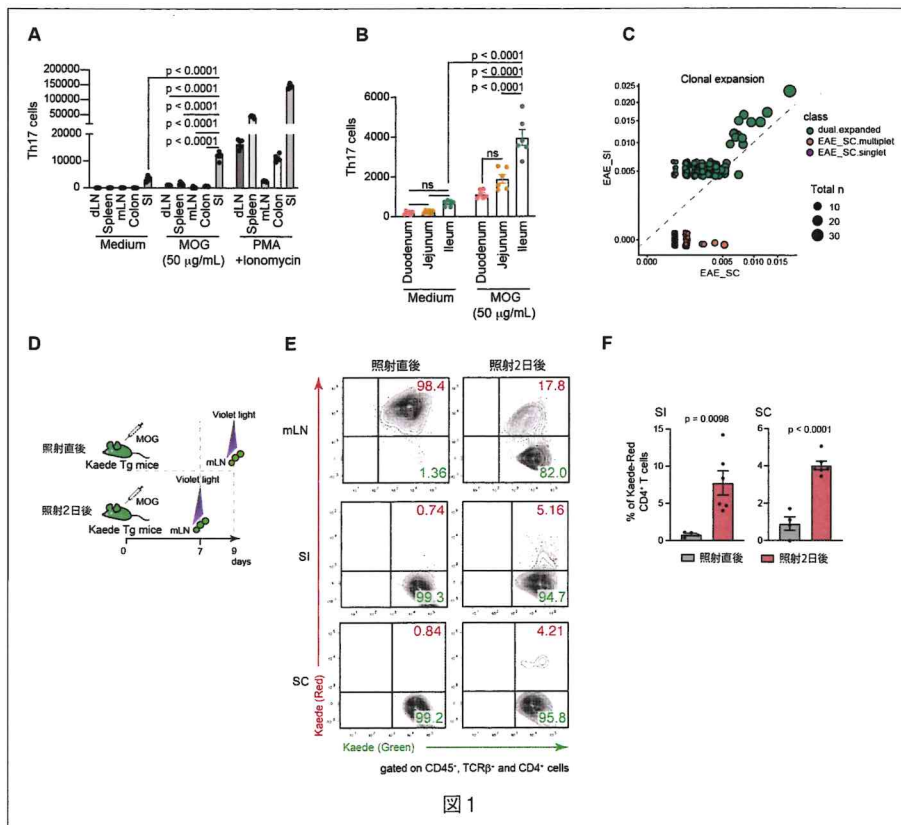


図 1

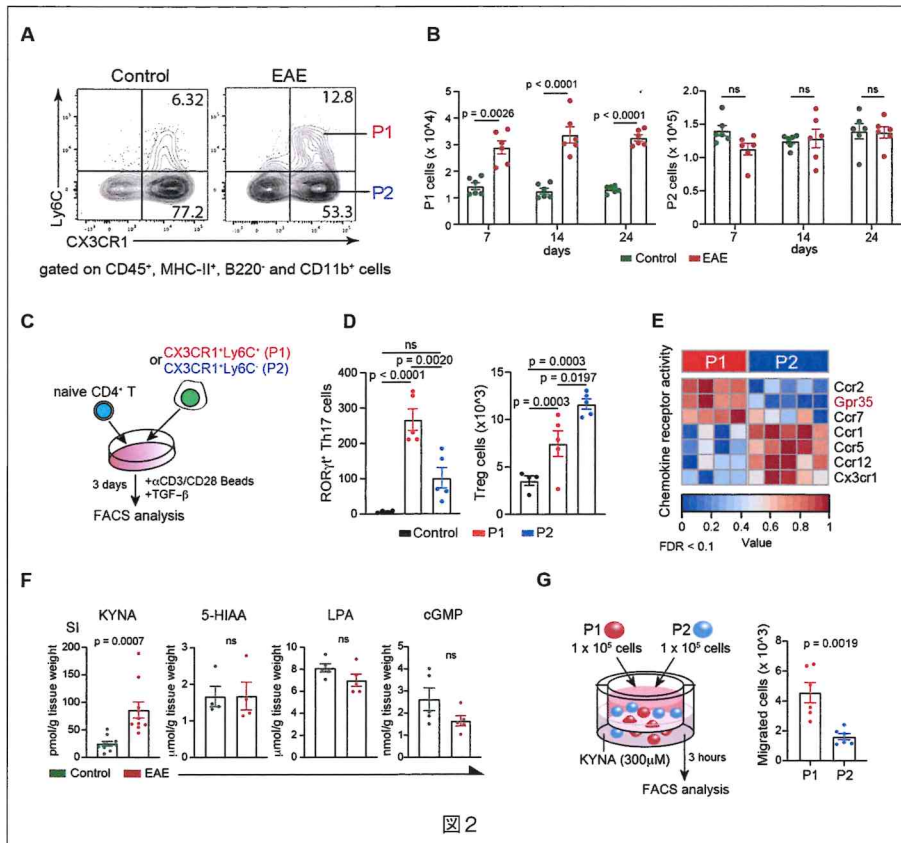


図 2

を高発現していることに着目した (図2E)。GPR35は好中球ではケモカインレセプター様に働き、細胞遊走を制御していることが報告されている (De Giovanni M et al., 2022)。EAEマウスの小腸におけるGPR35のリガンドを解析すると、その中でKYNAの濃度が上昇していることを見出した (図2F)。

実際に、in vitroでのMigration assayを行うことによって、KYNAによって炎症性マクロファージが集積していることを確認した (図2G)。

さらに、GPR35拮抗薬を投与することでEAEの病態が改善することを確認し、小腸のKYNA-GPR35シグナルがEAEの進行において重要な役割を果たしている

ことを明らかにした。

次に、KYNAの産生に関与する腸内細菌について解析を行ったところ、EAEマウスの腸内ではKYNA合成に関与するEC:1.13.11.11遺伝子を持つ細菌の割合が増加していることが判明した。我々はこれらの細菌がトリプトファン代謝を介してKYNAの前駆体であるN-ホルミルキヌレンを産生し、腸管上皮細胞がこれをKYNAへと変換することでKYNA濃度が上昇することを明らかにした。また、プロバイオティクスであるClostridium butyricumを投与することで腸内細菌叢に介入すると、KYNAの腸内濃度が低下し、GPR35+Ly6C+マクロファージの蓄積を抑制した。その結果、Clostridium butyricumはEAEマウスにおける小腸Th17細胞の誘導を阻害することで、病態を改善することが示された。この結果は、腸内細菌を標的とした新たな治療戦略の可能性を示唆している。

このような腸内細菌と免疫系の相互作用は、MSに限らず、他の自己免疫疾患の病態形成にも関与する可能性がある。例えば、腸管のCD4陽性T細胞は自己免疫性腎炎モデルマウスにおいても、小腸から腎臓へ移動していることが報告されている (Krebs et al., 2016)。我々の研究は、腸内環境の調整が神経炎症性疾患の予防や治療に有効であることを示唆している。特に、プロバイオティクスや腸内代謝物を標的とした治療法の開発は、新たな治療戦略として期待される (Chen H et al., 2019; Hayashi A et al., 2021)。

本研究の結果から、腸内細菌が産生するKYNAがGPR35+Ly6C+マクロファージの蓄積を促し、Th17細胞を誘導することでEAEの発症に寄与することが明らかになった。我々の研究は、腸内細菌叢と脳神経免疫系との相互作用がMSの病態形成において重要な役割を果たすことを示し、KYNAの産生を抑制するプロバイオティクスの使用が新たな治療戦略となる可能性を見出した。現在、我々は小腸-CNS連関におけるさらなる免疫学的機序を解析しており、本研究がMSの病態解明と新規治療開発に繋がることを期待する。

この度は第61回日本消化器免疫学会総会において奨励賞を賜り誠に有り難うございます。研究と臨床を並行して行う中で、十分な時間を確保できず苦しい思いをした時期もありましたが、努力を続けた結果このような賞を受賞できたことは非常に励みとなりました。まだまだ未解明のことが多い領域を研究テーマとしておりますので、今後より一層研究に邁進し、総会のテーマの1つでもあった「雲外蒼天」が待っていることを信じて精進していきたいと思っております。



金井教授をはじめ、日頃より研究についてご指導頂いている先生方にこの場を借りて深く感謝を申し上げます。今後ともご指導ご鞭撻の程何卒よろしくお願い申し上げます。(鈴木祥平)